

HOJA DE INFORMACIÓN

1. Datos del estudiante

Estudiante: Alejandra Romero Morales
Carné: 200669906
Cédula: 4-200-384
Correo electrónico: alejandraromerom@gmail.com
Teléfono (s): 8893-45-89 2269-9847

2. Información del Proyecto:

Nombre del Proyecto: “Estudio del Efecto Citoprotector y Proliferativo del Extracto Hidroalcohólico de Semillas de *Mucuna urens* sobre un Cultivo *in Vitro* de Células PC-12 Tratadas con Dosis Crecientes de 6-Hidroxidopamina.”
Profesor Asesor: Dr. Miguel Rojas Chavez, Ph.D

3. Datos de la empresa o institución

Nombre: Programa de Investigación de Neurociencias.
Enfoque: Investigación científica en áreas relacionadas con la neurociencia como neurogenética, neuroquímica, psicobiología y farmacología.
Dirección: Frente a Facultad de Artes Plásticas, Universidad de Costa Rica.
Teléfono: 2207 4450 / 4903
Web: <http://www.vinv.ucr.ac.cr/pin/index.html>
Correo electrónico: neuroscicr@gmail.com

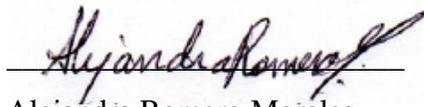
CARTA DE ENTENDIMIENTO

Señores

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Biblioteca José Figueres Ferrer

Yo Alejandra Romero Morales, carné 20069906, autorizo a la Biblioteca José Figueres del Instituto Tecnológico de Costa Rica disponer del Trabajo Final realizado por mi persona, con el título “Estudio del Efecto Citoprotector y Proliferativo del Extracto Hidroalcohólico de Semillas de *Mucuna urens* sobre un Cultivo *in vitro* de Células PC-12 Tratadas con Dosis Crecientes de 6-Hidroxidopamina.” para ser ubicado en la Biblioteca Digital y ser accedido a través de la red Internet.



Alejandra Romero Morales

Cédula 4-200-384

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**ESTUDIO DEL EFECTO CITOPROTECTOR Y PROLIFERATIVO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE SEMILLAS DE *MUCUNA URENS*
SOBRE UN CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS PC-12 TRATADAS CON
DOSIS CRECIENTES DE 6-HIDROXIDOPAMINA.**

INFORME PRESENTADO A LA ESCUELA DE BIOLOGÍA DEL
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE BACHILLER EN INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA.

Alejandra Romero Morales

Cartago, 2010

Estudio del efecto citoprotector y proliferativo del extracto hidroalcohólico de semillas de *Mucuna urens* sobre un cultivo *in vitro* de células PC-12 tratadas con dosis crecientes de 6-hidroxidopamina.

Alejandra Romero Morales

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa producida por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y la disfunción de los circuitos neuronales relacionados con el control de los movimientos. *Mucuna urens* es una planta (Fabaceae) cuya semillas contienen altas concentraciones de levodopa, utilizada desde hace más de 5000 años para el tratamiento de enfermedades como el Parkinson. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto citoprotector y proliferativo de diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de las semillas de *M. urens* sobre un cultivo *in vitro* de células PC-12 tratadas con dosis crecientes de 6-OHDA. Entre los principales hallazgos obtenidos se encuentra una proliferación considerable (superior a 30% sobre el control positivo) de las células incubadas a concentraciones de 0.05 y 1mg/mL del extracto. Además, se observó un efecto de citoprotección, presumiblemente de carácter antioxidante, en células preincubadas con 0.25mg/mL de extracto ante concentraciones de 0.20 y 0.30 mmol/L de neurotoxina. Con este estudio se logró comprobar la capacidad proliferativa y citoprotectora *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *M. urens*; el cual podría tener implicaciones en tanto en el tratamiento regenerativo como en el preventivo; respectivamente. Así mismo se logró estandarizar el modelo experimental de la línea celular PC-12, ampliamente utilizada a nivel internacional para la investigación de los mecanismos moleculares y celulares de las enfermedades neurodegenerativas y la búsqueda de nuevos tratamientos contra las mismas.

Palabras clave: L-dopa, cultivo celular, estrés oxidativo, PC-12, proliferación, citoprotección.

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010.

Study of the cytoprotective and proliferative effect of a hydroalcoholic extract of seeds of *Mucuna urens* on an *in vitro* culture of PC-12 cells treated with increasing doses of 6-hydroxydopamine.

Alejandra Romero Morales

ABSTRACT

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder caused by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the dysfunction of neural circuitry related to the control of movements. *Mucuna urens* is a plant (Fabaceae) whose seeds contain high concentrations of levodopa, used for over 5000 years to treat diseases like Parkinson's. The aim of this study was to determine the proliferative and cytoprotective effect of different concentrations of the hydroalcoholic extract of the seeds of *M. urens* on an *in vitro* culture of PC-12 cells treated with increasing doses of 6-OHDA. Among the key findings, a significant proliferation effect (above 30% of the positive control) was determined on cells incubated at concentrations of 0.05 and 1mg/ml of the extract. In addition, there was a cytoprotective effect, presumably of an antioxidant type, in cells preincubated with 0.25mg/mL of the extract before the addition of 0.20 and 0.30 mmol / L of neurotoxin. This study proves the cytoprotective and proliferative *in vitro* capability of the hydroalcoholic extract of *M. urens*, which could have implications in both regenerative and preventative therapy, respectively. Also achieved standardize the experimental model of the PC-12 cell line, widely used internationally for the investigation of the molecular and cellular mechanisms of neurodegenerative diseases and the search for new treatments against them.

Keywords: L-dopa, tissue culture, oxidative stress, PC-12, proliferation, cytoprotection.

GRADUATION FINAL WORK REPORT. Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010.

Estudio del efecto citoprotector y proliferativo del extracto hidroalcohólico de semillas de *Mucuna urens* sobre un cultivo *in vitro* de células PC-12 tratadas con dosis crecientes de 6-hidroxidopamina.

Miembros del Tribunal

Ph.D. Miguel Rojas Chávez
Profesor Asesor ITCR

Ph.D. Jaime Fornaguera Trías
Asesor Externo

Ing. Olga Rivas Solano
Lector

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por todo su apoyo durante estos cuatro años de carrera, su dedicación y paciencia.

A mis abuelos, primos y tíos por su ayuda e interés en mi crecimiento personal y profesional.

A mis amigos, por estar ahí y escuchar las quejas contra el mundo. Por su apoyo y su estima.

Ale

AGRADECIMIENTOS

La autora hace constar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones por la colaboración brindada durante la realización del presente trabajo:

A mis padres, hermanos y familia, por su constante apoyo, su fe en mí y en mi trabajo. Si ustedes nunca hubiese llegado a ser la profesional y el ser humano que me enorgullezco en ser en este momento.

A mis amigos de siempre, los del TEC y los de danza por el apoyo, la confianza; toda su ayuda y consejos. Ustedes siempre están en el momento específico para la catarsis.

Al Dr. Jaime Fornaguera, por su disposición, su paciencia, sus consejos y valiosa asesoría durante la realización de este trabajo. Gracias por la confianza depositada en mí, espero haber llenado sus expectativas y que mi trabajo se convierta en un grano más de arena de toda la valiosa investigación que usted y el PIN realizan.

Al Dr. Miguel Rojas por su apoyo y las altas expectativas que puso en mí y en el presente trabajo. Espero haberle cumplido a cabalidad.

A todos los miembros del Programa de Investigación en Neurociencias por su cálida acogida y su colaboración.

A Lorena, por su colaboración y amistad diaria; así como a todos los demás asistentes e investigadores del Laboratorio de Cultivo Celular.

Al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Costa Rica por la posibilidad de realizar este trabajo en sus laboratorios, en especial a la Dra. Cecilia Díaz por su apoyo y dirección en todo lo relacionado con el trabajo de laboratorio.

Y a todos los profesores de la Escuela de Biología, ya que sin su ayuda y enseñanzas no hubiese sido capaz de llegar hasta este punto. Gracias por su apoyo y preocupación por la evolución de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Enfermedad de Parkinson.....	3
<i>Bases celulares de la EP</i>	4
<i>Causas</i>	5
<i>Estrés Oxidativo</i>	6
<i>Tratamiento</i>	7
<i>Levodopa</i>	8
Plantas medicinales y su uso tradicional.....	10
<i>Mucuna urens</i>	11
Modelos de estudio de la EP.....	14
<i>Línea Celular PC-12</i>	14
Modelo Experimental de la EP inducido por Neurotoxinas: 6-hidroxidopamina.....	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Extracto Hidroalcohólico de <i>M. urens</i>	16
Cultivo Celular.....	16
Tratamientos con el extracto de <i>M. urens</i>	17
Tratamientos con 6-hidroxidopamina.....	18
Determinación de Viabilidad y Proliferación Celular.....	18
RESULTADOS	21
Estandarización del Modelo Experimental.....	21
Citoprotección celular.....	25
<i>Curva 6-OHDA</i>	25
<i>Curva Citoprotección</i>	27
<i>Comparación de las Curvas</i>	29
DISCUSIÓN	30
RECOMENDACIONES	41
LITERATURA CITADA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones de crecimiento para la línea celular PC-12	21
Cuadro 2. Promedio y porcentajes de viabilidad de la línea celular PC-12 al ser tratada con concentraciones crecientes de extracto de <i>Mucuna urens</i>	23
Cuadro 3. Promedio y porcentajes de viabilidad de la línea celular PC-12 al ser tratada con concentraciones crecientes de 6-OHDA.	25
Cuadro 4. Promedio y porcentajes de viabilidad de la línea celular PC-12 preincubadas con 0.25 mg/mL de extracto de <i>Mucuna urens</i> al ser tratada con concentraciones crecientes de 6-OHDA.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales vías neuronales en ganglios basales normales y de pacientes con EP.....	5
Figura 2. Farmacocinética de la Levodopa.....	9
Figura 3. Vías del metabolismo de la levodopa.....	9
Figura 4. Detalles morfológicos de <i>Mucuna urens</i>	12
Figura 5. Mecanismo de la 6-OHDA para inducir neurotoxicidad.....	15
Figura 6. Cuadrícula de conteo celular de la cámara de Neubauer.....	19
Figura 7. Vista en microscopio de contraste de fases de la monocapa de células PC-12 con una confluencia celular de un 95%	22
Figura 8. Vista en microscopio de contraste de fases de las células PC-12 posterior a la tripsinización de la monocapa celular.....	22
Figura 9. Curva dosis-respuesta de las células PC-12 ante concentraciones crecientes de extracto crudo de <i>Mucuna urens</i>	24
Figura 10. Porcentaje de Viabilidad de las células PC-12 ante concentraciones crecientes de 6-hidroxidopamina.	26
Figura 11. Curva dosis-respuesta de las células PC-12 preincubadas con 0.25 mg/mL de extracto de <i>Mucuna urens</i> ante concentraciones crecientes de 6-hidroxidopamina.	28
Figura 12. Curva dosis-respuesta de las células PC-12 preincubadas con 0.25 mg/mL de extracto de <i>Mucuna urens</i> ante concentraciones crecientes de 6-OHDA vrs el tratamiento con la neurotoxina en ausencia del extracto	29

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Frascos Roux 25 cm ² con crecimiento celular en monocapa.	47
ANEXO 2: Prueba Anova para los resultados de proliferación celular.	48
ANEXO 3: Prueba Anova para los resultados de Curva de 6-OHDA.	50
ANEXO 4: Prueba Anova para los resultados de Curva de tratamiento <i>M. urens</i> +6-OHDA. ...	52
ANEXO 5: Prueba t student para muestras relacionadas.	54

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa progresiva producida por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y la disfunción de los circuitos neuronales relacionados con el control de los movimientos corporales. Afecta a más de 60 000 estadounidenses cada año, generalmente a individuos con edades superiores a los 65 años (NPF, 2008, NINDS, 2009).

Actualmente existen gran cantidad de medicamentos para mitigar los síntomas de esta enfermedad. Muchos de estos medicamentos están dirigidos a compensar la pérdida de la producción de dopamina causada por la muerte de las neuronas en la sustancia negra compacta del cerebro. Entre estos compuestos la L-3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA), también conocida como levodopa, es ampliamente utilizada ya que es un precursor de la dopamina capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (NAHH, 2008). La respuesta en los pacientes al ser tratados con dicha droga es casi inmediata, sin embargo, su efectividad disminuye tras un prolongado periodo de utilización y además ha sido asociada con complicaciones motoras muy discapacitantes tales como las discinesias; y efectos secundarios como vómito y náusea (Hotton & Chaudhuri, 2008). En la actualidad, no existe en el mercado ningún fármaco sintético capaz de retrasar o detener el progreso de dicha enfermedad, por lo que nuevas sustancias de origen natural están siendo estudiadas y probadas en laboratorio como opciones alternativas (Manyam & Cryer, 2000).

Las plantas han sido utilizadas desde tiempos remotos con fines curativos para buscar nuevas sustancias bioactivas y siguen perfilándose como una alternativa en la medicina moderna (Muñoz *et al.*, 2004). En la actualidad, existe un interés creciente por el estudio y la utilización de las plantas medicinales, tanto en países desarrollados, como en aquellos en vías de desarrollo (Hoogesteger, 1994), en los cuales se ha incentivado la búsqueda e identificación de sustancias activas extraídas de plantas (Muñoz *et al.*, 2004).

Mucuna urens es una planta de la familia de las leguminosas (Fabaceae). Es una enredadera cuyo crecimiento se da en los bosques lluviosos de las zonas tropicales del planeta (Núñez, 1982). El polvo de semillas de *Mucuna* contiene altas concentraciones de levodopa y ha sido de largo uso en medicina tradicional *Ayurvédica* de la India para el tratamiento de enfermedades como el Parkinson (Manyam *et al.*, 2004[a] y Manyam *et al.*, 2004 [b]). También se ha reportado

que puede incrementar la producción de la hormona de crecimiento humana; incrementa la resiliencia tisular y mejora la coordinación (Katzenschlager *et al.*, 2004).

La composición farmacéutica del polvo de semilla de *Mucuna* o de sus extractos ha sido probada en ensayos clínicos (Katzenschlager *et al.*, 2004; Parkinson's Disease Study Group, 1995; Vayda *et al.*, 1978; Nagashayana *et al.*, 2000). En ellos, los efectos negativos relacionados con la administración a largo plazo de la L-Dopa no fueron identificados. En dichos estudios los pacientes con discinesias producidas por la terapia de L-Dopa convencional, presentaron una disminución en su incidencia y severidad (Hussain & Manyam, 1997).

A nivel nacional, el Programa de Investigación de Neurociencias de la Universidad de Costa Rica cuenta con estudios utilizando extracto crudo de *M. urens*. Los principales resultados obtenidos en modelos animales señalan que el efecto antiparkinsoniano del tratamiento con una combinación de *M. urens* + carbidopa es mejor que el producido por la administración conjunta de levodopa + carbidopa (Molina & Solís, 2003). Además, estudios aún no publicados llevados a cabo en cultivos de células PC-12, línea derivada de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata utilizadas como modelo de la EP, sugieren que el pretratamiento de dichas células con el extracto de *M. urens* tiene un efecto neuroprotector ante dosis crecientes de 6-OHDA y presentan además un leve efecto de proliferación celular (Fornaguera, J, comunicación personal, 2009). Debido a lo anterior se quería determinar si dicho extracto realmente presentaba las características citoprotectoras y proliferativas que se observaron en el cultivo celular PC-12, y si estos efectos podrían llegar a explicar los efectos antiparkinsonianos observados por Molina & Solís en modelos animales conductuales.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la capacidad citoprotectora y de proliferación de un extracto hidroalcohólico de semillas de *M. urens in vitro*. . Para dicho experimento se utilizaron células PC-12, una línea celular derivada de feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata (Attiah *et al.*, 2003). Éstas son células catecolaminérgicas muy utilizadas en los estudios sobre la EP debido a que son secretoras de dopamina (Greene, 1978). Las células PC-12 fueron tratadas con 6-hidroxidopamina, una neurotoxina ampliamente utilizada en modelos experimentales de la EP, ya que está ligada a la formación de H₂O₂, radicales libres tipo hidroxilo (OH) y quinonas que se producen en su metabolización, que se cree tienen una importante participación en la destrucción neuronal observada (Luquin, 1998).

REVISIÓN DE LITERATURA

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central. Fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson, un médico británico que publicó un ensayo llamado "Parálisis Temblorosa" (Shaking Palsy), en el que describió de manera detallada los síntomas principales de la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre (NINDS, 2009; NPF, 2007).

La EP es un desorden progresivo del SNC, que se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, parte compacta. Estas neuronas son las encargadas de producir el neurotransmisor dopamina, la cual es de gran importancia para diversas funciones cerebrales. En muchos casos en estas células se da además la aparición de inclusiones eosinófilas intracelulares, llamadas cuerpos de Lewy (Braunwald *et al*, 2001). Los cuatro síntomas principales de la EP son el temblor en reposo de extremidades y las manos la mandíbula o la cabeza; acinesia que es la rigidez de las extremidades y el tronco; bradicinesia, o lentitud en los movimientos; e inestabilidad postural, o deterioro del equilibrio (Marjama & Koller, 2001). En estadios tardíos pueden aparecer también deterioros cognitivos (NAHH, 2008; Braunwald *et al*, 2001; Marjama & Koller, 2001; NINDIS, 2009).

La dopamina es un mensajero químico responsable de transmitir señales entre la sustancia negra y el cuerpo estriado, para producir movimientos suaves y decididos (NPF, 2007). La pérdida de dopamina produce patrones anormales de activación nerviosa dentro del cerebro que causan deterioro del movimiento (NINDIS, 2009). Los estudios demuestran que la mayoría de los pacientes con EP ya han perdido del 60 al 80 por ciento de células productoras de dopamina en la sustancia negra en el momento de la aparición de los síntomas (NINDIS, 2009; NPF, 2007). Estudios recientes (Ramos, 2009; NINDS, 2009), han mostrado que dichos pacientes también tienen pérdida de las terminaciones nerviosas que producen el neurotransmisor norepinefrina el cual está estrechamente relacionado con la dopamina y es el mensajero químico principal del sistema nervioso simpático, el cual controla muchas funciones automáticas del cuerpo, como el pulso y la presión arterial (NINDS, 2009)

Bases celulares de la EP

Existen aproximadamente 500.000 células dopaminérgicas en el mesencéfalo de los adultos jóvenes, la mayoría de las cuales se encuentran en la *pars compacta* de la Sustancia Negra. Estas células contienen neuromelanina, proteína que les confiere su color característico, y sintetizan la dopamina (Alvernia, 2008).

Las neuronas de la parte compacta de la sustancia negra envían impulsos dopaminérgicos hacia el cuerpo estriado (vía nigroestriatal), el cual forma parte de los ganglios basales. El sistema nigroestriatal participa en la planeación y ejecución inconsciente de los movimientos aprendidos y se cree que la vía dopaminérgica al estriado posee una actividad moduladora en este proceso (Alvernia, 2008).

La emisión de impulsos desde el cuerpo estriado se efectúa por dos vías distintas denominadas directa e indirecta (ver Figura 1). La vía directa está formada por neuronas del cuerpo estriado que se proyectan hacia la parte reticulada de la sustancia negra y la parte medial del globo pálido. Por otro lado, la vía indirecta está compuesta por neuronas estriato-palidales que se unen con la parte lateral del globo pálido, luego otras neuronas conectan con el núcleo subtalámico, y este a su vez con el globo pálido medial (Vargas, 2007; Gerfen, 2006).

El neurotransmisor de la vía directa es el ácido γ -amino butírico (GABA), un neurotransmisor con funciones inhibitorias; cuyo efecto neto a través de la vía directa, consiste en un incremento de impulsos excitadores del tálamo hacia la corteza. Por tanto, la dopamina que se descarga en el cuerpo estriado tiende a incrementar la actividad de la vía directa y a reducir la de la vía indirecta (Vargas, 2007).

El éxito del modelo funcional de los ganglios basales, radica en que explica los síntomas observados en casos de EP, como una consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas por el efecto diferencial de la dopamina en las vías directa e indirecta (Vermeulen, 1994). Las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra (SNpc) inervan todas las partes del cuerpo estriado; sin embargo, las neuronas estriatales expresan dos tipos distintos de receptores de dopamina. Las neuronas estriatales que originan la vía directa, expresan primordialmente el receptor dopaminérgico D₁, mientras que las células que forman la vía indirecta, expresan fundamentalmente el D₂ (Marsden, 2006).

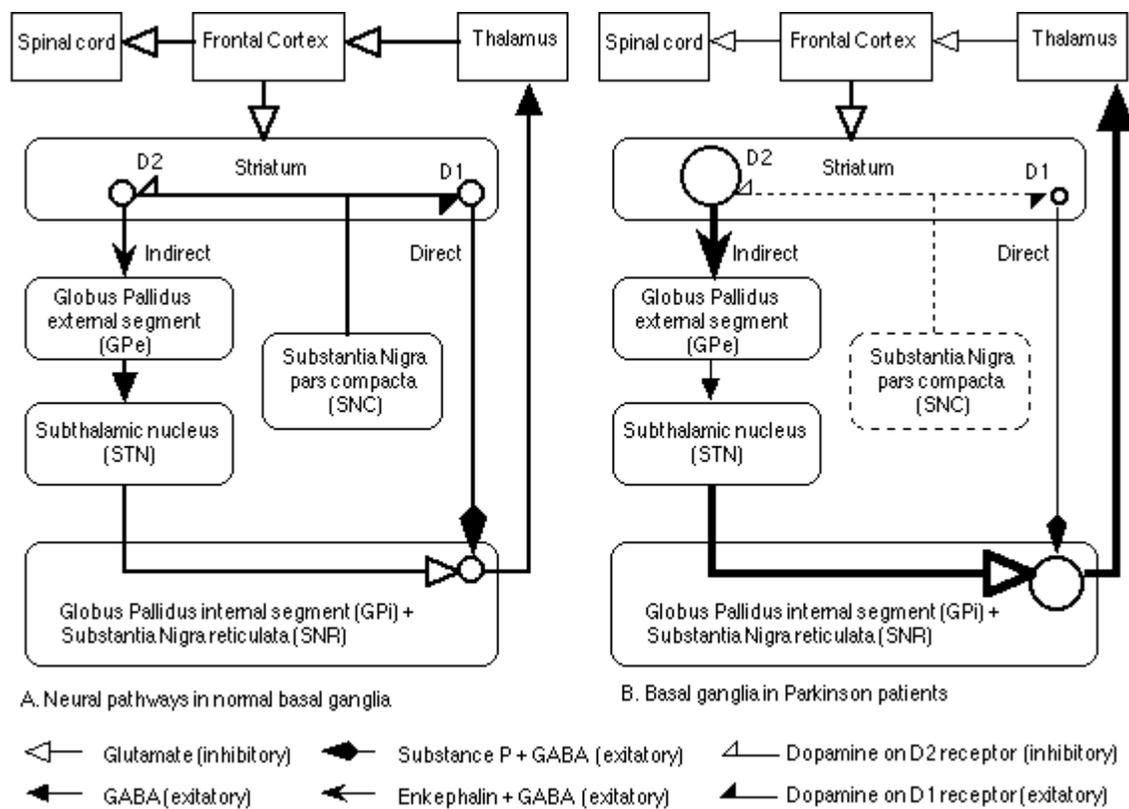


Figura 1. Principales vías neuronales en ganglios basales normales (A) y de pacientes con EP (B). El grosor de las flechas representa la intensidad de la señal, mientras que las líneas punteadas representan una disminución en la actividad de la vía (Tomado de Vermeulen, 1994).

Causas

Las causas de la EP son variadas y hasta nuestros días no ha podido identificarse el factor causal de la misma. Aunque algunos casos de Parkinson parecen ser hereditarios o tener un alto componente genético, pueden rastrearse a mutaciones genéticas específicas, la mayoría de los casos pertenecen a lo que se conoce como EP esporádica o idiopática, cuya causa es desconocida (NINDS, 2009). Es sin lugar a dudas una enfermedad multifactorial (Kidd, 2000).

Entre los principales genes causales de la EP se encuentra el gen de la α -synucleína en el brazo largo del cromosoma 4 (4q21-23), el cual codifica para una proteína presináptica involucrada en la plasticidad neuronal (Kidd, 2000). También se ha encontrado evidencia de la alteración del gen ubiquitina carboxiterminal L1 hidrolasa (UCLH) ubicada en el 4p14, el cual codifica para la enzima que despolimeriza las ubiquitinas, permitiéndoles unirse nuevamente a proteínas para conducirlos al proteosoma (Franco, 2008). Otro posible gen diana es la parkina

(6q25.2-q27), la cual codifica para una proteína de 465 aminoácidos similar a la ubiquitina, que recientemente se ha señalado funciona como ligando de las proteínas ubiquitinadas y el sistema de degradación 26 proteosoma. La parkina actúa como péptido ligando en este mecanismo, por lo que mutaciones o deleciones en esta proteína van a alterar la degradación de proteínas por esta vía (Franco, 2008).

Aunque se reconoce cada vez más la importancia de la genética en la enfermedad de Parkinson, la mayoría de los investigadores creen que algunas sustancias presentes en el ambiente aumentan el riesgo de una persona de contraer la enfermedad (NINDS, 2009). Aún en los casos familiares, la exposición a toxinas u otros factores ambientales puede influir en el momento de aparición de los síntomas o en cómo evoluciona la enfermedad. Hay un número de toxinas, como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, o MPTP (encontrada como contaminante en algunos tipos de heroína sintética), que pueden causar síntomas parkinsonianos en los humanos y en modelos animales (Luquin, 1998). Los virus, tales como el causante del herpes o de la influenza española, son otros posibles desencadenantes ambientales de esta enfermedad (NINDS, 2009).

Varias líneas de investigación sugieren que las mitocondrias podrían estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad (Schapira *et al.*, 1990; NINDS, 2009). Las mitocondrias son los componentes productores de energía de la célula y son fuentes principales de radicales libres, las moléculas que dañan las membranas, las proteínas, el ADN y otras partes de la célula; causando lo que se conoce como estrés oxidativo. En un estudio realizado por Schapira *et al.* (1990) se detectaron cambios relacionados con el estrés oxidativo, incluido el daño por radicales libres al ADN, las proteínas y las grasas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson, lo cual refuerza esta hipótesis como una de las posibles causas de dicha enfermedad.

Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se puede definir como un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico para detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (Lima, 2008). Las reacciones de oxidación-reducción son procesos biológicos esenciales que conducen a la formación de diferentes compuestos en los procesos metabólicos celulares. Estas reacciones conllevan la transferencia de electrones y pueden generar productos conocidos como radicales libres (RL) o especies reactivas

de oxígeno (ERO) como lo son el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) [Lima, 2008; Rice-Evans & Gopinathan, 1995].

La mayor fuente intracelular de RL es la mitocondria, a través del sistema de la citocromo-oxidasa que interviene en la respiración mitocondrial; por otro lado, los radicales libres pueden también generarse a través de procesos del propio metabolismo celular, como a partir de la vía sintética del ácido úrico (Rice-Evans & Gopinathan, 1995).

Los RL actúan sobre el ADN mitocondrial, que es muy susceptible al estrés oxidativo, y existe evidencia de que este mecanismo está implicado en procesos carcinogénicos (Schapira *et al.*, 1990). También los RL producen oxidación de las proteínas, con la consiguiente desconfiguración estructural de las mismas. A nivel de los lípidos, inducen peroxidación lipídica que conlleva la alteración de la permeabilidad de la membrana celular y el correspondiente daño y muerte celular. Los peróxidos lipídicos generados en estas reacciones en cadena representan un índice del daño celular por RL, y pueden medirse, por ejemplo el malonildialdehído (MDA) [Lima, 2008].

Tratamiento

Actualmente, no existe un medicamento o procedimiento quirúrgico que cure la enfermedad de Parkinson (NINDS, 2009). Cada caso de Parkinson es diferente debido a que la enfermedad progresa de manera distinta en las personas afectadas (NPF, 2007). Sin embargo, los tratamientos que alivian o controlan muchos de los síntomas, también mejoran la calidad de vida y previenen o retrasan los daños al sistema nervioso que produce la enfermedad (NAHH, 2008).

Existen tres tipos diferentes de medicamentos que son recetados para aliviar los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Entre estos se encuentran los utilizados para aumentar o simular la función de la dopamina en el cerebro como la levodopa (L-3,4-dihidroxi-fenilalanina), y los agonistas de la dopamina (Franco, 2008). También existen algunos dirigidos al mantenimiento del equilibrio químico en el cerebro, y por último los utilizados para el tratamiento de síntomas concurrentes como la depresión (NAHH, 2008).

Además de los medicamentos mencionados anteriormente existen una serie de procedimientos quirúrgicos destinados al tratamiento de la EP. Dichas intervenciones son realizadas en individuos en estados avanzados de la enfermedad que no han tenido éxito con otros medicamentos o terapias (Sarmiento & Loscertales, 1999). Entre los procedimientos más

utilizados está la palidotomía, la cual consiste en la destrucción localizada de la porción posteroventral del globo pálido. Similar a esta intervención está la talamotomía (tálamo) y la subtalamotomía (núcleo subtalámico) [Franco, 2008; Sarmiento & Loscertales, 1999].

Por otro lado, se realiza la Estimulación Cerebral Profunda, la cual consiste en introducir un electrodo que estimula a las neuronas circundantes del tálamo, el globo pálido o el núcleo subtalámico (Franco, 2008). Con ambos procedimientos se interrumpe, irreversible o reversiblemente, la actividad neuronal incontrolada que se relaciona con la presencia de los síntomas de la enfermedad (Sarmiento & Loscertales, 1999).

También se realizan los trasplantes celulares, los cuales consisten en la introducción de células propias del paciente o de procedencia externa (tejidos cultivados o de origen fetal) en el putamen y en el núcleo caudado para así aportar un tejido productor de dopamina y/o inducir la regeneración celular en el huésped (Sarmiento & Loscertales, 1999).

Levodopa.

La Levodopa (L-dopa o L- 3,4-dihidroxifenilalanina) es el fármaco más eficaz disponible en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson, introducido en la medicina a inicios de 1960 (Juri & Chaná, 2006). Éste es administrado en lugar de la dopamina debido a que esta no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, al ser administrada en forma sistémica. La L-dopa, al ser el precursor inmediato de la dopamina, es transportada al encéfalo, donde logra atravesar hacia el tejido estriatal siendo ahí descarboxilada, por la enzima dopa-decarboxilasa, en dopamina (Alvernia, 2008).

Dado que alrededor del 95% de la L-dopa administrada por vía oral es descarboxilada rápidamente en la periferia, deben administrarse grandes dosis para permitir la acumulación suficiente de levodopa en el encéfalo, en donde eleva la concentración central de dopamina (ver Figura 2 y 3). Para contrarrestar este efecto, dicho fármaco es administrado de manera conjunta con inhibidores de acción periférica de la dopa descarboxilasa, como la carbidopa o la bencerasida, con los cuales se logra una reducción en la dosis requerida (Alvernia, 2008).

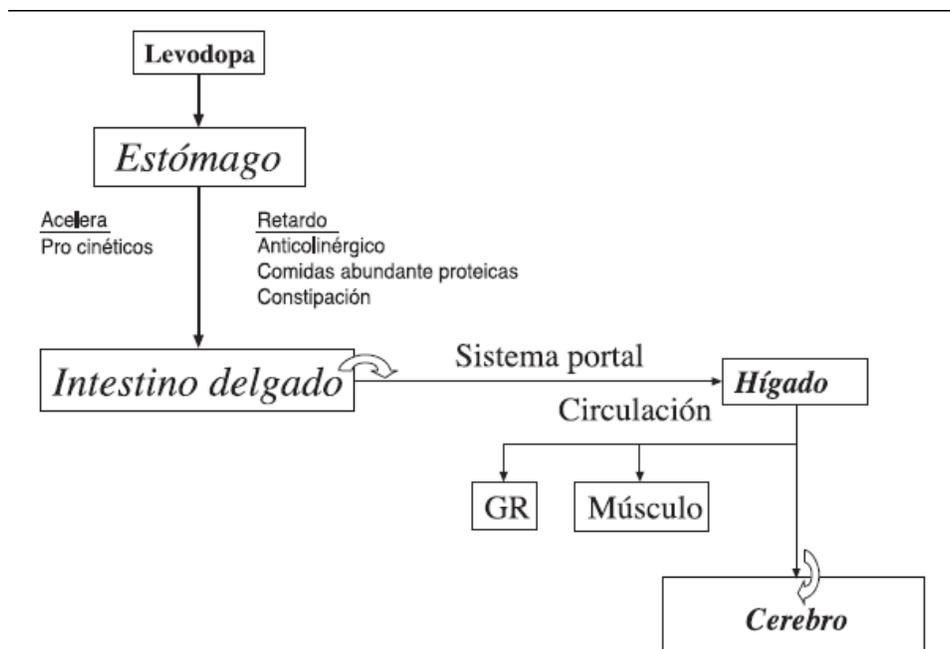


Figura 2. Farmacocinética de la Levodopa.
Fuente: Juri & Chaná, 2006

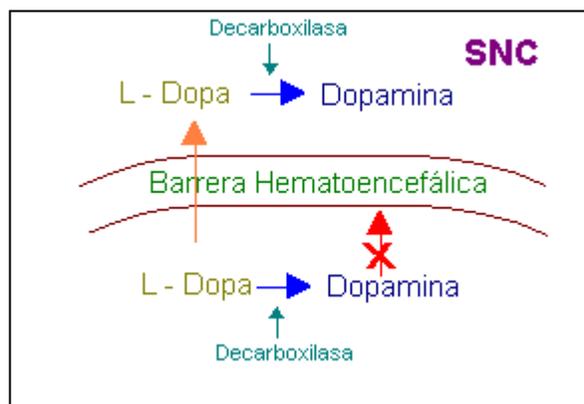


Figura 3. Vías del metabolismo de la levodopa.
Fuente: Alvernia, 2008

El efecto de la levodopa es ejercido fundamentalmente a través de la dopamina producida en la neurona. Dicho neurotransmisor actúa estimulando directamente los receptores dopaminérgicos tipo 1 y tipo 2. La dopamina liberada al espacio sináptico es recaptada por la neurona dopaminérgica a través del transportador de dopamina (DAT) y realmacenada para su liberación (Juri & Chaná, 2006).

Los resultados obtenidos tras una terapia continuada son reducciones significativas en la bradicinesia, la rigidez y el temblor (Juri & Chaná, 2006). Las manifestaciones motoras

secundarias como las alteraciones en la expresión facial, el habla, la escritura, la deglución y la respiración mejoran proporcionalmente. En muchos pacientes, la levodopa produce una mejoría en el estado anímico también (Alvernia, 2008).

A pesar de ser una droga altamente utilizada y de eficacia comprobada, la mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con L-dopa sufren efectos secundarios (Simuni & Stern, 1999; Juri & Chaná, 2006). Muchos pacientes obtienen una mejora manifiesta y sostenida durante los primeros 2 a 5 años, pero después la levodopa empieza a perder efectividad en un 50% de los casos (Alvernia, 2008).

Después de este tiempo la mayoría de los pacientes evolucionan hacia una fase descompensada de la enfermedad, caracterizada por la aparición de dos complicaciones principalmente: fluctuaciones motoras y discinesias (Alvernia, 2008; Simuni & Stern, 1999; Juri & Chaná, 2006). Se piensa que estos movimientos se deben a la "supersensibilidad" de los receptores dopaminérgicos postsinápticos y son de tipo variable (Alvernia, 2008).

Otros efectos secundarios que son comunes cuando se inicia la terapia son las náuseas y el vómito. También se presentan arritmias cardíacas y otros molestos efectos gastrointestinales. Además puede producir alucinaciones, paranoia, manía, insomnio, ansiedad, pesadillas y depresión, principalmente en los pacientes ancianos (Alvernia, 2008).

Plantas medicinales y su uso tradicional

El uso de remedios de origen vegetal se remonta a épocas ancestrales, y es una de las formas más extendidas de medicina, la industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos. Muchas de las drogas empleadas hoy en día replican sintéticamente o aíslan los principios activos de remedios vegetales tradicionales (Hoogesteger, 1994).

Los remedios a base de plantas medicinales presentan una serie de ventajas con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan, generalmente, biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables son generalmente limitados (Hoogesteger, 1994).

Mucuna urens

Es una planta de la familia de las leguminosas (Fabaceae). Es una enredadera cuyo crecimiento se da en los bosques lluviosos de las zonas tropicales del planeta; entre los 500 y 2000 msnm (STRI, 2009). En nuestro país puede ser encontrada en la costa del Pacífico húmedo, en los bosques y malezas del Valle Central, en el bosque nuboso de Monte Verde, en manglares, cerros y zonas con crecimientos secundarios (Núñez, 1982).

Esta planta es un bejuco leñoso y de extenso crecimiento, distribuida en Argentina, Bolivia, Brasil, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Rep. Dominicana, Surinam, Venezuela; así como en muchas partes de África: Nigeria, Ghana, Zambia, Malawi, República de Benín, República de Guinea y Asia: China, Malasia, Madagascar, India, Sri Lanka, Indonesia, Filipinas y Java entre otros (Eilittä *et al*, 2002; STRI, 2009).

Es una enredadera de brote anual. Las hojas son trifoliadas, grandes y de forma elíptica y anchas en la base; suavemente vellosas en el dorso; pedúnculos grandemente alargados y pendientes. Los pecíolos son largos y sedosos. Las flores se encuentran en racimos colgantes, con un color que va desde blanco hasta morado oscuro. El fruto de esta planta es una vaina gruesa y rugosa; con tres a cuatro semillas negras ovoides (ver Figura 4). La superficie total y los rebordes de la vaina están densamente cubiertos por tricomas café pálido o amarillos, los cuales causan prurito (hormigueo o irritación de la piel, comezón) en el área afectada al entrar en contacto con la piel (Rastogi & Mehrotra, 1994).



Figura 4. Detalles morfológicos de *Mucuna urens*.
Fuente: <http://grainecreation.com/oeildeboeuf.aspx>

Se utiliza como alimento humano ya sea en forma de harina, espesante para sopas o condimento. El frijol entero (semilla), también es usado en los platos cotidianos de muchos países de escasos recursos. Se usa además como alimento para animales, forraje (pastura) y abono para suelos, ya que les proporciona nutrientes y minerales (Eilittä *et al*, 2002).

Las semillas de dicha planta han sido utilizadas desde hace más de 4500 años, por los médicos de la antigua India, en el sistema médico hindú conocido como *Ayurveda* para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Análisis de laboratorio que apoyan este uso tradicional han demostrado que las semillas del género *Mucuna* contienen entre 3,6 y 4,2% de Levodopa, el mismo químico que, como se mencionó anteriormente, se emplea como componente principal de varios fármacos utilizados para tratar la enfermedad de Parkinson (Manyam & Cryer, 2000). Este compuesto es de gran importancia ya que es precursor del neurotransmisor dopamina. Otro beneficio de *Mucuna* es que puede incrementar la producción

de la hormona de crecimiento humana, siendo sus extractos comúnmente vendidos como reconstituyentes. También tiene efectos diuréticos, incrementa la resiliencia tisular y mejora la coordinación (Katzenschlager, 2004).

Existen pocas investigaciones acerca de la composición química de las semillas de *M. urens*; sin embargo se cuentan con reportes de la composición de las semillas de *Mucuna pruriens*. Esta planta del mismo género contiene una gran cantidad de compuestos en su semillas, entre ellos: L-dopa de un 1% a un 5%, glutatión, ácido gálico, bufotenina, colina, lecitina, serotonina, ácido 2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) propánico, mucunina, NADH (nicotina adenina dinucleótido), coenzima Q-10, ácidos grasos, los alcaloides prurienina, pruriénidina y ácido 1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dihidroxi-3-isoquinolinico. Es además una buena fuente de minerales como: calcio, magnesio y hierro (Manyam *et al*, 2004 [b]; Eilittä *et al*, 2002). Por otra parte, en el estudio realizado por Vega (2008) utilizando extracto hidroalcohólico de *M. urens* se determinó, mediante una serie de pruebas cualitativas; la presencia de taninos, alcaloides glicósidos y flavonoides con grupos fenoles como el revestratol. También, en estudios no publicados se determinó que ese mismo extracto de *M. urens* presentaba una concentración de L-dopa superior a otras especies de *Mucuna* estudiadas (Fornaguera, J, comunicación personal, 2009).

El polvo de semilla de *Mucuna* y sus extractos han sido probados en diversos ensayos clínicos, en ellos los efectos negativos que se observan después de la administración a largo plazo de la L-Dopa no fueron identificados (Hussain & Manyam, 1997; Parkinson's Disease Study Group, 1995; Vayda *et al.*, 1978; Nagashayana *et al.*, 2000). Dichos extractos presentan una estabilidad durante prolongados periodos; además, pacientes con discinesias producidas por la terapia de L-Dopa convencional presentaron una disminución en su incidencia y severidad (Hussain & Manyam, 1997). Además, en diversos estudios, se observó una mejoría significativa en pacientes tratados durante 12 a 20 semanas con dosis de 45 g/día de extracto de polvo de *Mucuna* (cerca de 1500 mg de L-dopa) [Parkinson's Disease Study Group, 1995; Vayda *et al.*, 1978; Nagashayana *et al.*, 2000]. Por otra parte, en un estudio de Katzenschlager *et al.* (2004), se determinó que 30g de formulación de *Mucuna* (1000 mg de L-dopa), administrada en tres ocasiones con una semana de diferencia entre dosis, presenta las mismas o mejores características de las formulaciones comerciales; además de que no produce efectos adversos como la discinesia o daños a nivel de la periferia dopaminérgica.

Modelos de estudio de la EP

En el ámbito del estudio de las enfermedades humanas, la utilización de modelos tanto animales como celulares ha contribuido sustancialmente al progreso en el conocimiento de su patogenia y ha permitido el desarrollo de técnicas diagnósticas y la validación de procedimientos preventivos y terapéuticos, tanto farmacológicos como intervencionistas (Chorro *et al*, 2009).

Aunque estos modelos nunca se asemejan completamente a la realidad observada en la clínica, sí permiten obtener información directa de determinados fenómenos, con un control adecuado de diversas variables y utilizando procedimientos precisos, con frecuencia invasivos y difícilmente aplicables en estudios clínicos (Chorro *et al*, 2009).

Las investigaciones sobre la EP, generalmente han sido realizados utilizando modelos animales o en ensayos clínicos con pacientes con diversos grados de la enfermedad (Luquin, 1998). Últimamente, se han comenzado a utilizar modelos celulares para las pruebas de fármacos y para intentar dilucidar los mecanismos celulares implicados en la degeneración celular y la regeneración (Chaudry, 2004). Esta alternativa ha mostrado tener una serie de ventajas comparativas sobre los modelos animales tales como economía en el uso de reactivos, control preciso y fino del medio ambiente y caracterización y homogeneidad de la muestra (Chaudry, 2004). Las líneas clonales que expresan propiedades neuronales son de suma utilidad para lograr un estudio del sistema nervioso a nivel molecular y unicelular. Dichas líneas han sido obtenidas como resultado del establecimiento neuroblastomas humanos y murinos, y a partir de tumores del sistema nervioso central de rata (Greene & Tischler, 1976).

Línea Celular PC-12

Las células PC-12 son una línea celular derivada de feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata (*Rattus norvegicus*) [Attiah *et al.*, 2003]. Estas células son ampliamente utilizadas como modelo de la enfermedad de Parkinson, debido a que son células catecolaminérgicas y secretoras de los neurotransmisores catecolaminérgicos, dopamina y norepinefrina. Éstas pueden ser reproducidas en un medio rico en suero y pueden ser inducidas a diferenciarse en células con un fenotipo similar a neuronas del sistema nervioso simpático al ser expuestas al Factor de Crecimiento Neuronal (NGF del inglés) [ATCC, 2008; Walkinshaw & Waters, 1995; Greene, 1976]. Esta línea ha sido utilizada para diversas pruebas de neurotoxicidad y para la evaluación de los efectos secundarios de diversas drogas sintéticas.

También han sido utilizado para pruebas de agentes neuroprotectores como la que se realizará en el presente estudio (Lin *et al.*, 2002).

Modelo Experimental de la EP inducido por Neurotoxinas: 6-hidroxi-dopamina

La 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) es una neurotoxina ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP (Luquin, 1998). Este compuesto es un análogo sintético de la dopamina, el cual presenta una similitud estructural con las catecolaminas y actúa sobre neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Ésta ingresa a la célula por medio de transportadores de membrana de dopamina y noradrenalina, los cuales reconocen la toxina y la introducen a la neurona (Simola *et al.*, 2007).

Una vez en el interior de la célula, como se puede observar en la Figura 5, la toxina provoca daño neuronal debido al aumento en el estrés oxidativo. La oxidación de la 6-OHDA por la enzima monoamino oxidasa (MAO) genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es una especie altamente citotóxica y que además desencadena la producción de otro tipo de especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo, entre otros (Luquin, 1998). Estos compuestos afectan la estructura y función del ADN, y producen la peroxidación lipídica, alterando las estructuras de las membranas celulares y de un gran número de proteínas (principalmente los puentes disulfuro). Por otro lado se ha visto que el estrés oxidativo causa la inhibición de la actividad mitocondrial del complejo I, el desacople de la fosforilación oxidativa y la alteración del potencial de membrana mitocondrial celular (Simola *et al.*, 2007).

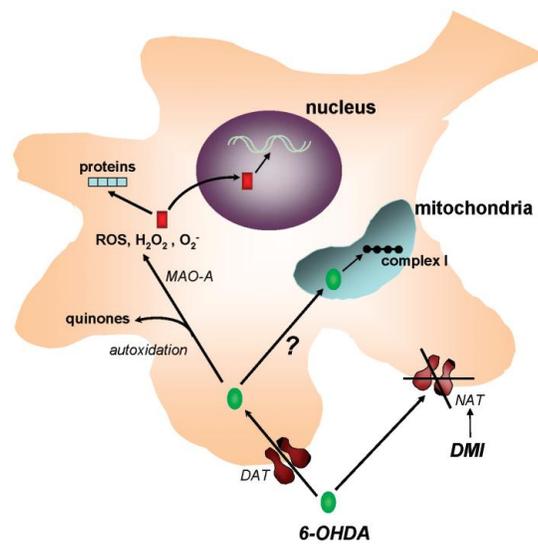


Figura 5. Mecanismo de la 6-OHDA para inducir neurotoxicidad

Fuente: Simola *et al.*, 2007

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto citoprotector y proliferativo de diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Mucuna urens* sobre un cultivo *in vitro* de células PC-12 tratadas con dosis crecientes de 6-hidroxidopamina para su potencial utilización en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar las condiciones de cultivo para la línea PC-12 como modelo *in vitro* para el estudio de la enfermedad de Parkinson.
- Evaluar el posible efecto proliferativo de la *Mucuna urens* en células tratadas con extracto crudo mediante técnicas colorimétricas.
- Determinar el efecto citoprotector de la *Mucuna urens* en células dañadas utilizando como agente nocivo concentraciones crecientes de 6-OHDA mediante la incubación de la toxina y diferentes concentraciones del extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto Hidroalcohólico de *M. urens*

El extracto de *Mucuna urens* fue suministrado por el Programa de Investigación en Neurociencias de la Universidad de Costa Rica. Este fue obtenido, purificado y fraccionado por la Licda. Liz María Vega para su tesis de licenciatura para obtener el título profesional de Doctor en Farmacia de la Universidad de Costa Rica.

En resumen las semillas se recolectaron en la localidad de Fraijanes de Poás de Alajuela, Costa Rica y fueron secadas al calor del sol. Se molieron completas hasta ser convertidas en un polvo fino, que se sometió a extracción por percolación con una mezcla de etanol (95°) y agua (8:2) por tres días. Posteriormente se liofilizó (los detalles se pueden revisar en Vega, 2008).

Cultivo Celular

Las células cultivadas fueron de la línea celular PC-12 (ATCC CRL-1721™) adquiridas por la Dra. Cecilia Díaz de la Facultad de Medicina de la Universidad de Costa Rica.

Se cultivaron en frascos Roux de 25 cm² a una temperatura de 37 °C; en atmósfera humedecida de 5% CO₂ y 95% aire. El medio de cultivo utilizado consistió en medio DMEM (Sigma D6429), complementado con 10% de suero fetal bovino (BioWhittaker). Además, se adicionaron 100 U/mL final de penicilina, 100 µg/mL final de estreptomicina y 5µg/mL de anfotericina (Sigma, en los tres casos).

Subcultivos

Para el subcultivo se empleó el siguiente protocolo.

Se decantó el medio viejo.

Se realizó 3-4 lavados con PBS hasta garantizar la completa remoción del medio de cultivo.
Decantar.

Se adicionó 2 mL de tripsina 0,1% e incubar durante 3 minutos a 37 °C; en atmósfera humedecida de 5% CO₂ y 95% aire.

Se adicionó 2 mL de medio de cultivo y transvasar a un tubo Falcon 15 mL.

Se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm.

Se decantó el sobrenadante y resuspender en 2 mL de medio de cultivo.

Se adicionó al frasco Roux 25 cm² 150-350 µL de suspensión celular.

Se adicionó 5 mL de medio de cultivo fresco. Incubar.

Dichos subcultivos se realizaron cuando la densidad celular alcanzó un 85-90% de confluencia. Se efectuó el cambio de medio de cultivo cada 2-3 días. Para estos procedimientos se utilizó una cámara de flujo laminar vertical de seguridad biológica.

Tratamientos con el extracto de *M. urens*

Para determinar el efecto citoprotector del extracto de *Mucuna* se utilizaron células con 48 horas de sembradas, con el fin de garantizar que se encontrasen en la etapa de división celular activa. Se les agregó concentraciones crecientes del extracto, para determinar si alguna de las concentraciones utilizadas podían resultar tóxicas o inhibitoras del crecimiento, así como para establecer cuáles concentraciones presentaban efectos proliferativos sobre las células. Las concentraciones que se analizaron fueron de 50, 25, 10, 5, 1, 0.50, 0.25, 0.10 y 0.05mg/mL del extracto (Tripathi & Upadhyay, 2002).

El extracto liofilizado fue disuelto en PBS +1% DMSO (Molina & Solís, 2003; Vega, 2008) que se llevó a las concentraciones deseadas y administrado directamente al cultivo celular. Para mejorar la solubilidad del extracto liofilizado se utilizó el DMSO. Como control negativo se utilizó 100 μ L de DMSO al 100% y como control positivo células sin extracto. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Tratamientos con 6-hidroxidopamina

Las concentraciones de 6-OHDA que se utilizaron fueron de 0, 10, 5, 1, 0.50, 0.40, 0.30, 0.20, 0.10 y 0.05 mmol/L de neurotoxina (Zang *et al*, 2009; Blanco & Sánchez, 2005). Las células se incubaron con la concentración de extracto probada en el apartado anterior que no hubiera mostrado efectos sobre la supervivencia, ni proliferación celular por 24 horas. Posteriormente se adicionó la toxina por 24 horas más. La viabilidad y proliferación se analizaron mediante de la prueba de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

Para los controles positivos se utilizó 10 μ L de PBS en lugar de la neurotoxina; para los controles negativos se empleó 100 μ L de DMSO al 100%. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Determinación de Viabilidad y Proliferación Celular

Para la determinación de la viabilidad y proliferación celular se utilizó la técnica colorimétrica de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán (compuesto de color azul), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Denizot & Lang, 1986).

Se utilizó el protocolo del Laboratorio de Cultivo Celular, Departamento de Bioquímica, Universidad de Costa Rica, descrito a continuación:

Se tripsinizó las células siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Resuspender las células en 2 mL de medio fresco.

Se determinó el número de células requeridas por pozo; para esto se utilizó el conteo celular con cámara de Neubauer.

Se toman 10 μL de la suspensión celular y se le adicionan 10 μL del colorante azul de tripán.

Se colocan 10 μL de la mezcla en la cámara de Neubauer y se procede al conteo de células al microscopio.

Se ubicó la cuadrícula y se contabilizó el número total de células de los cuatro recuadros señalados con una L en la figura 6.

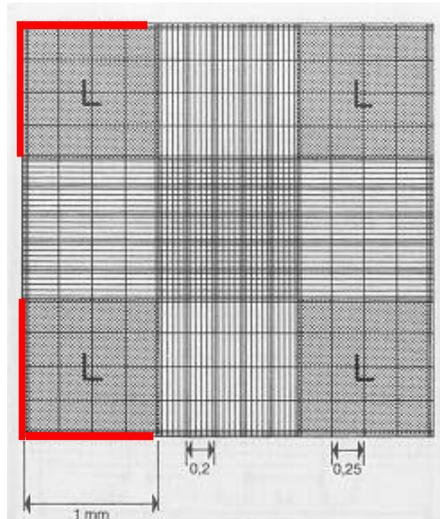


Figura 6. Cuadrícula de conteo celular de la cámara de Neubauer
Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Se contaron las células incoloras o blancas (viables), descartar las células totalmente teñidas de azul ya que estas son no viables. Las células localizadas en los márgenes externos de cada esquina (marcados en rojo) NO deberán ser incluidas en las cuentas.

Se aplicó la siguiente fórmula para determinar el número de células.

$$\# \text{ células: } \Sigma \times \text{fd} \times 104$$

Donde Σ : número de células de las cuatro cuadrículas.

fd: factor de dilución de la suspensión celular (2 mL).

Utilizando cajas de 96 pozos sembrar las células, se requieren 1,5x10⁴ células por pozo.

Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia.

Se disolvió el extracto crudo de *M. urens* en solución salina+1% DMSO, de tal manera que al añadir 10 μL al pozo tenga la concentración deseada; incubar por 48 horas en el caso de las pruebas de proliferación y 24 horas en el caso de las pruebas de citotoxicidad.

Se añadió 10 μL de la neurotoxina a la concentración deseada por pozo.

Incubar a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células.

Se descartó el medio y añadir 100 μL de MTT (0,5mg/ml) en solución PBS estéril.

Incubó 3 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán.

Eliminar el sobrenadante.

Añadir 100 µL de alcohol 95%.

Se dejó los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán sean disueltos.

Proceder a la lectura de las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100$$

Cada ensayo se realizó por triplicado, con controles negativos y positivos mencionados anteriormente. Además, se utilizó pozos blancos para realizar las correcciones de las lecturas. A todos los resultados se les realizó una prueba estadística ANOVA, seguida de una prueba *post oc* de Dunnet para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y los controles positivos.

RESULTADOS

Estandarización del Modelo Experimental

Como primer paso se procedió a estandarizar las condiciones de cultivo para la línea PC-12 debido a que fue la primera vez que se trabajaba con las mismas en el país. Tras diversas pruebas se logró el crecimiento óptimo y mantenimiento de la línea celular bajo las condiciones enlistadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones de crecimiento para la línea celular PC-12.

<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
Medio de cultivo	DMEM (Sigma D6429).
Suplementos	10% SFB. 100 U/mL penicilina. 100 µg/mL estreptomicina 5µg/mL de anfotericina 2% L-glutamina.
Temperatura	37°C.
Atmósfera	Humedecida, 5% CO ₂ ; 95% aire.
Volumen de alícuota para subcultivo	200µL.
Subcultivos	1 a la semana.
Cambios de medio	2 semanales.

La adición de L-glutamina fue opcional ya que también se observó un crecimiento normal al no ser adicionada como suplemento al medio. Lo mismo se observó con el uso del antimocótico anfotericina, pero en este caso las medidas de asepsia debieron de extremarse para evitar contaminación por levaduras y otros hongos.

Las células en monocapa presentaban una morfología muy variada, desde ovoide a alargada. En la Figura 7 y 8 se puede observar la morfología anteriormente descrita tanto antes como después del tratamiento de tripsinización (ANEXO 1). El mantenimiento de dicho fenotipo es de gran importancia; ya que cambios en el mismo pueden indicar inestabilidad genética en la línea celular, lo cual estaría inutilizando el cultivo (Tovar, 2004).

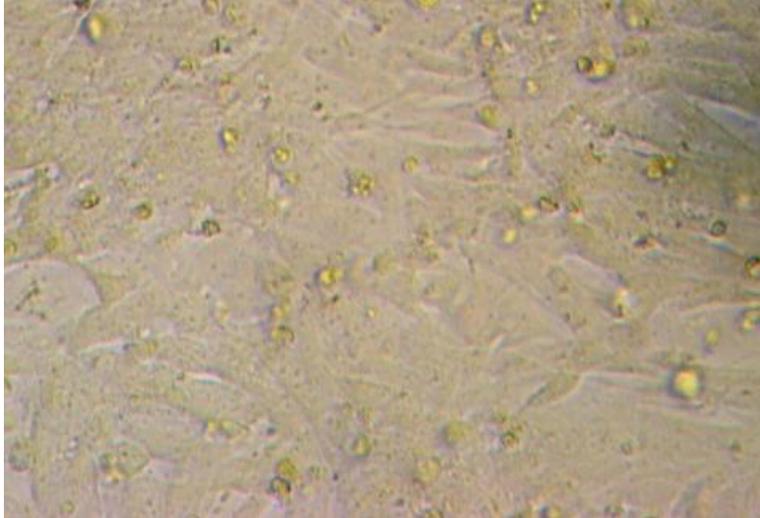


Figura 7. Vista en microscopio de contraste de fases de la monocapa de células PC-12 con una confluencia celular de un 95% (100X).

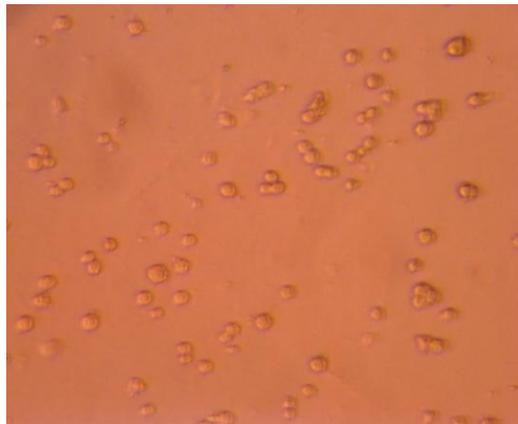


Figura 8. Vista en microscopio de contraste de fases de las células PC-12 posterior a la tripsinización de la monocapa celular (100X).

Proliferación celular

En cuanto a los resultados obtenidos en las pruebas de proliferación celular utilizando las concentraciones mencionadas en Materiales y Métodos, se estableció como indicador de proliferación celular, todo aquel porcentaje de viabilidad que superara de manera estadísticamente significativa el 100% de viabilidad determinado por el control positivo. En el Cuadro 2, se resumen los datos obtenidos y se indica el porcentaje de viabilidad para cada tratamiento.

Cuadro 2. Promedio y porcentajes de viabilidad de la línea celular PC-12 al ser tratada con concentraciones crecientes de extracto de *Mucuna urens*

Concentraciones mg/mL	Promedio	% Viabilidad
C +	0.7781	100
0.05	1.0827	139.1413
0.1	0.8398	107.9190
0.25	0.7315	94.0075
0.5	0.8211	105.5211
1.0	1.0178	130.8032
5.0	0.8298	106.6339
10.0	0.3906	50.1997
25.0	0.1232	15.8363
50.0	0.2027	26.0531
C -	0.0359	4.6173

Los datos obtenidos se graficaron obteniendo así una curva de dosis-respuesta para concentraciones crecientes de extracto (Figura 9).

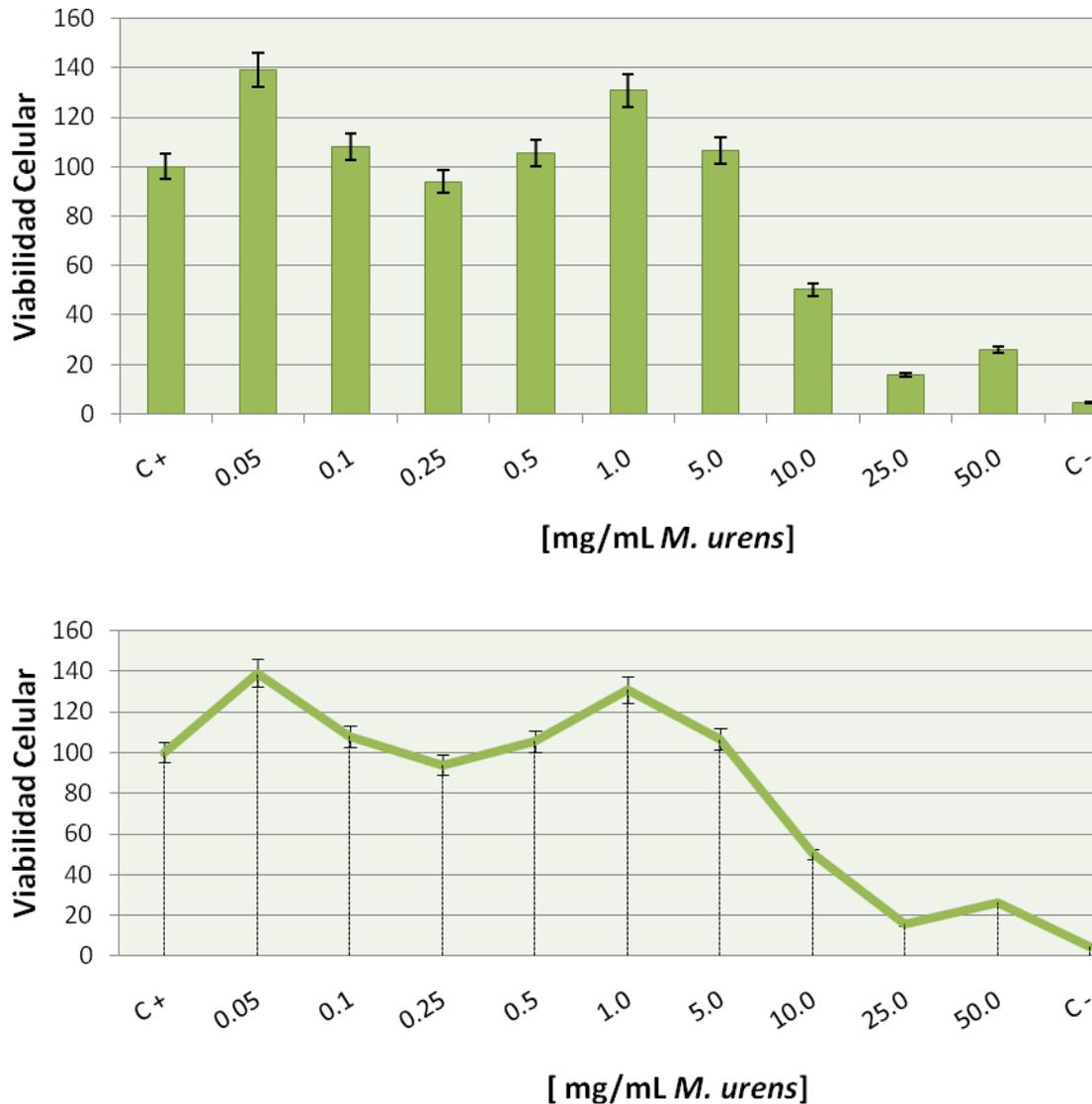


Figura 9. Curva dosis-respuesta de las células PC-12 ante concentraciones crecientes de extracto crudo de *Mucuna urens*.

Como se observa en la gráfica, el extracto presenta un efecto proliferativo a concentraciones de 0.05 y 1mg/mL de 39.1413% y 30.8032%, respectivamente en estos puntos el efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$); comparado con el control positivo. Tras el análisis de los resultados obtenidos mediante un ANOVA, se determinó que no existieron diferencias significativas entre el control positivo y los tratamientos de 5, 0.50, 0.25 y 0.10mg/mL ($p < 0.05$). Como se requería una concentración no proliferativa para las pruebas de citoprotección, para garantizar que las lecturas de viabilidad se debieran únicamente al efecto que se deseaba medir,

se seleccionó la concentración de 0.25mg/mL ya que presentaba un porcentaje de viabilidad de 94.01% (ANEXO 2).

Citoprotección celular

Curva 6-OHDA

Con la finalidad de determinar si la supervivencia de las células ante los tratamientos con 6-OHDA se debía a la acción citoprotectora del extracto de *M. urens*, se realizó una curva tratando a las células únicamente con la neurotoxina. Los resultados obtenidos son presentados en el Cuadro 3 y posteriormente fueron utilizados para realizar comparaciones con los datos obtenidos a partir de células preincubadas con extracto.

Cuadro 3. Promedio y porcentajes de viabilidad de la línea celular PC-12 al ser tratada con concentraciones crecientes de 6-OHDA

Concentración mmol/L	Promedio	% Viabilidad
0	0.3883	100
0.05	0.4000	103.0264
0.10	0.3623	93.3033
0.20	0.3686	94.9453
0.30	0.3714	95.6536
0.40	0.3926	101.1269
0.50	0.4228	108.8860
1.0	0.3943	101.5454
5.0	0.1119	28.8152
10.0	0.0505	13.0071
Control -	0.0050	1.2878

Los datos obtenidos se graficaron y se observan en la Figura 10.

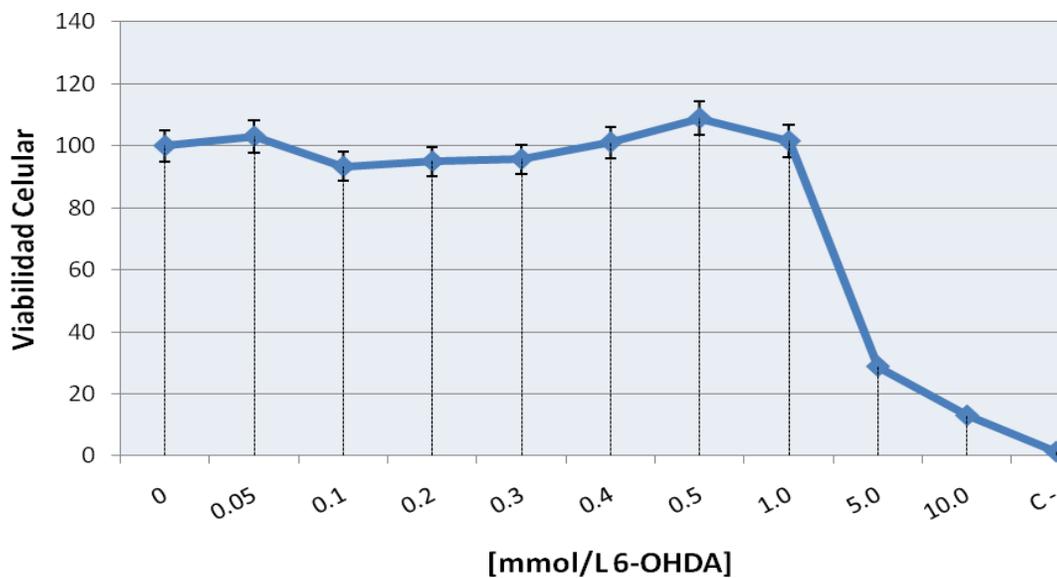
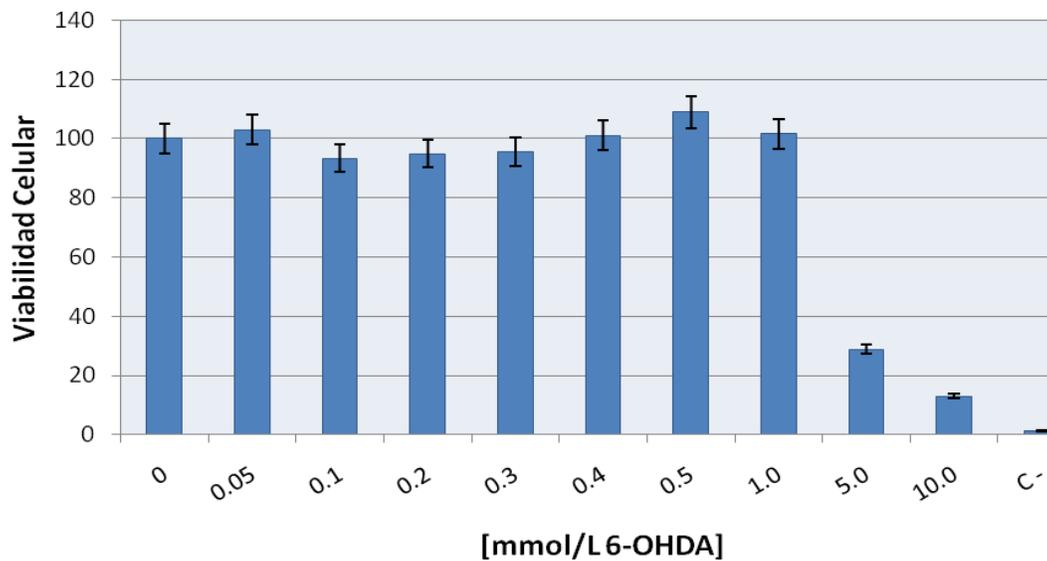


Figura 10. Porcentaje de Viabilidad de las células PC-12 ante concentraciones crecientes de 6-hidroxidopamina.

Como se puede apreciar en la figura 10, el comportamiento de la viabilidad celular es bastante constante a concentraciones bajas, notándose una disminución muy marcada a partir de 1.0mmol/L. Tras un análisis ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de 0.05mmol/L hasta 1mmol/L (ANEXO 3) al ser

comparadas con el resultado del control positivo, mientras que para los tratamientos de 5.0 y 10.0 mmol/L sí fueron encontradas dichas diferencias.

Curva Citoprotección.

Utilizando como dosis de extracto el tratamiento de 0.25mg/mL, se procedió a tratar las células con concentraciones crecientes de neurotoxina 6-OHDA. Tomando como el 100% el control positivo, se calcularon los porcentajes de viabilidad para concentraciones crecientes de 6-OHDA. Los resultados obtenidos (Cuadro 4) posteriormente fueron utilizados para realizar las comparaciones respectivas.

Cuadro 4. Promedio y porcentajes de viabilidad de la línea celular PC-12 preincubadas con 0.25 mg/mL de extracto de *Mucuna urens* al ser tratada con concentraciones crecientes de

6-OHDA		
Concentración mmol/L	Promedio	% Viabilidad
Control +	0.3914	100
0	0.4128	105.4743
0.05	0.4166	106.4324
0.10	0.4229	108.0549
0.20	0.4488	114.6726
0.30	0.4419	112.9096
0.40	0.4149	106.0109
0.50	0.4022	102.7659
1.0	0.3883	99.2143
5.0	0.0967	24.6950
10.0	0.0471	12.0345
Control -	0.0084	2.1505

En la Figura 11 se encuentra graficados los datos

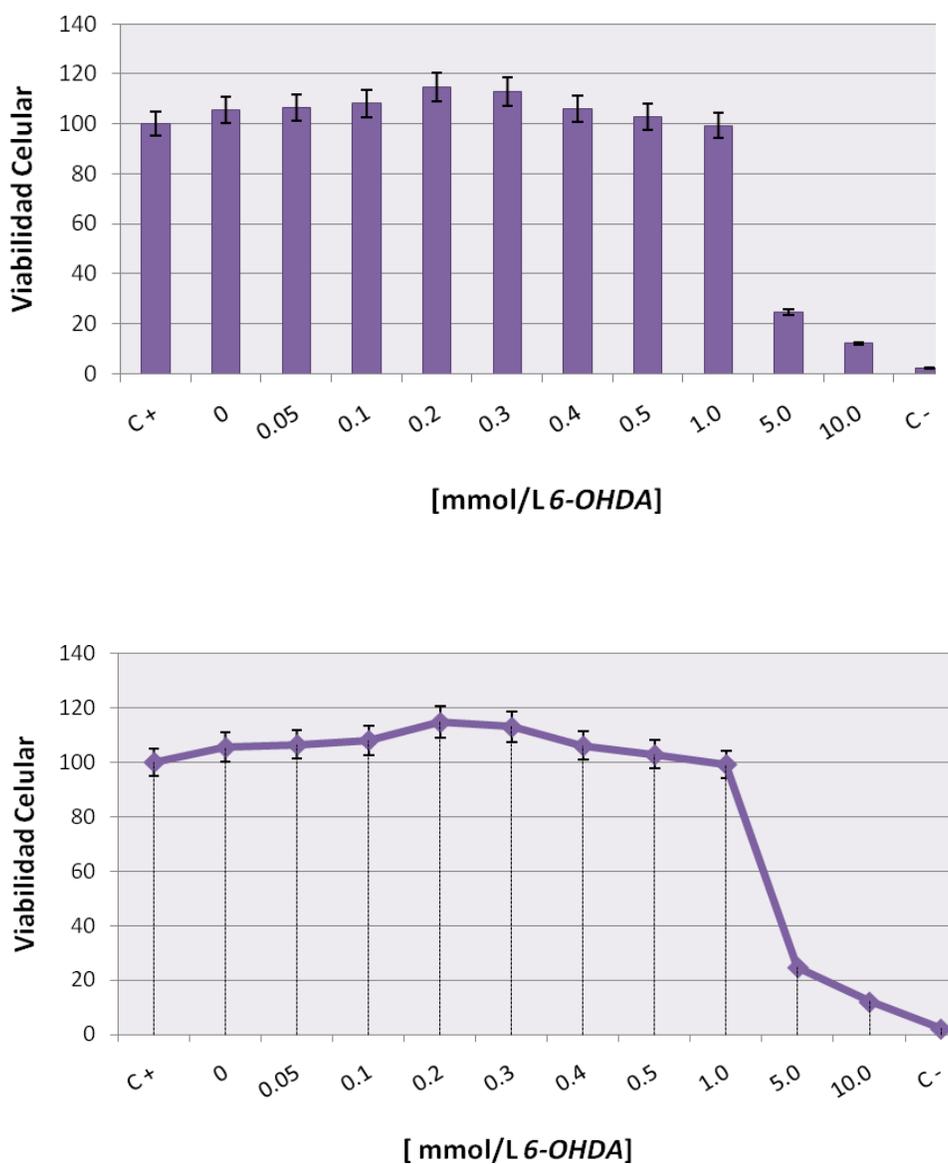


Figura 11. Curva dosis-respuesta de las células PC-12 preincubadas con 0.25 mg/mL de extracto de *Mucuna urens* ante concentraciones crecientes de 6-hidroxidopamina

Como se puede apreciar en la Figura 11 el comportamiento de la viabilidad celular es bastante constante, oscilando entre 99.2% y 112.9%, a concentraciones entre 0 hasta 1.0mmol/L, notándose una disminución muy marcada al aumentar la concentración de la neurotoxina. Tras un análisis ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control positivo y tratamientos de 0, 0.05, 0.10, 0.40, 0.5 y 1mmol/L (ANEXO 4). En el caso de los tratamientos de 0.20 y 0.30mmol/L se observó un aumento en la viabilidad celular que

podría ser interpretada como un efecto proliferativo ($p < 0.05$) del extracto a estas concentraciones.

Comparación de las Curvas.

Para la comparación de las curvas anteriores se realizó una prueba de t-student para muestras relacionadas. Esta prueba calcula las diferencias entre los valores de las dos variables y contrasta si la media difiere de cero. Es decir, este diseño se aplica cuando los datos están apareados o emparejados (proviene de sujetos con variables medidas antes y después del tratamiento o de pares de sujetos emparejados a partir de sus características similares en variables de control o que se desean controlar de modo específico) [Walpole *et al*; 2002].

Al unificar los datos anteriormente presentados en una sola gráfica se obtiene la figura a continuación.

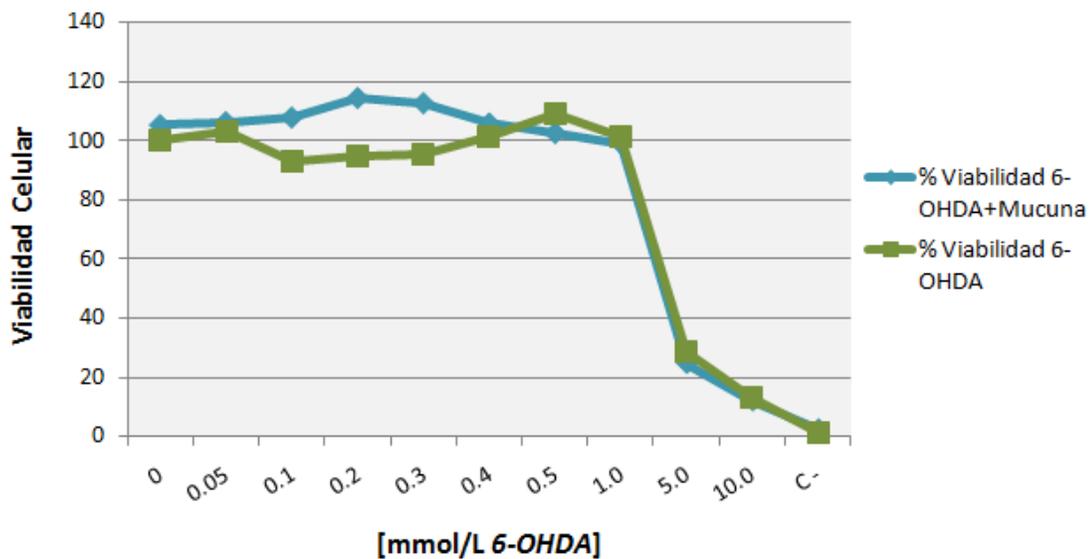


Figura 12. Curva dosis-respuesta de las células PC-12 preincubadas con 0.25 mg/mL de extracto de *Mucuna urens* ante concentraciones crecientes de 6-OHDA vs el tratamiento con la neurotoxina en ausencia del extracto (los controles positivos fueron establecidos como el 100% de viabilidad).

Tras el análisis de t-student para muestras relacionadas se determinó que existen diferencias altamente significativas entre las dos curvas con los tratamientos de 0.20 y 0.30 mmol/L ($p < 0.05$) de las curvas observándose así posible efecto protector ante los daños causados por la 6-OHDA (ANEXO 5).

DISCUSIÓN

Las plantas han sido utilizadas desde tiempos remotos con fines curativos para buscar nuevas sustancias bioactivas y siguen perfilándose como una alternativa válida en la medicina moderna. En la actualidad, existe un interés creciente por el estudio y la utilización de las plantas medicinales (Hoogesteger, 1994), por lo que se ha incentivado la búsqueda e identificación de sustancias activas extraídas de plantas (Muñoz *et al.*, 2004).

Diferentes preparaciones de las semillas de *Mucuna pruriens* se han empleado en el manejo de la EP debido a que es una buena fuente de L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-Dopa) [Parkinson's Disease Study Group, 1995; Vayda *et al.*, 1978; Nagashayana *et al.*, 200; Katzenschlager *et al.*, 2004]. Estudios fitoquímicos del extracto alcohólico fraccionado de las semillas de esta planta, demostraron la eficacia de estos compuestos con respecto a los productos sintéticos disponibles en el mercado (Katzenschlager *et al.*, 2004). En dichos estudios, los pacientes con discinesias producidas por la terapia de L-Dopa convencional presentaron una disminución en su incidencia y severidad (Hussain & Manyam, 1997).

Además de la *M. pruriens*, otras especies del género *Mucuna* han sido estudiadas y utilizadas para el tratamiento de la EP. En nuestro país es posible encontrar entre otras, la especie *Mucuna urens*, la cual ha sido relativamente poco investigada en cuanto a su efectividad en el tratamiento de la EP. En un estudio realizado por Molina & Solís (2003) utilizando un extracto hidroalcohólico de *M. urens*, se obtuvo evidencia del efecto antiparkinsoniano en modelos animales conductuales utilizando la toxina 6-OHDA. Por otra parte, estudios aún no publicados utilizando cultivos de células PC-12 pretratadas con el mismo extracto, sugirieron que dicho extracto tiene un efecto neuroprotector ante dosis crecientes de 6-OHDA y presentan además un leve efecto de proliferación celular (Fornaguera, 2009, comunicación personal).

El presente estudio evaluó la capacidad citoprotectora y de proliferación del extracto hidroalcohólico de semillas de *M. urens in vitro* en células PC-12 ante los efectos de la neurotoxina 6-OHDA. Esto basado en los resultados obtenidos en los dos estudios mencionados anteriormente, sistematizando la metodología y análisis de los resultados para el modelo celular PC-12.

Teniendo en cuenta los resultados de los diversos estudios realizados con el género *Mucuna*, se procedió a seleccionar una línea celular que presentase características similares a las neuronas afectadas por la EP en los humanos.

Las células PC-12 son una línea celular derivada de feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata (Attiah *et al.*, 2003). Estas células son ampliamente utilizadas en estudios como el presente debido ya que son células catecolaminérgicas y secretoras de los neurotransmisores afectados por esta enfermedad (Walkinshaw & Waters, 1995). Esta línea ha sido utilizada para diversas pruebas de neurotoxicidad, para la evaluación de los efectos secundarios de diversas drogas sintéticas y pruebas de agentes neuroprotectores (Lin *et al.*, 2002). Dichas células pueden ser reproducidas en un medio rico en suero (fetal bovino y equino) y pueden ser inducidas a diferenciarse en células con un fenotipo similar a neuronas del sistema nervioso simpático al ser expuestas al Factor de Crecimiento Neuronal (del inglés NGF) [ATCC, 2008; Walkinshaw & Waters, 1995; Greene, 1978].

Como primer paso se procedió a estandarizar las condiciones de cultivo para la línea PC-12 en nuestro laboratorio ya que nunca habían sido utilizadas en el país. Entre las principales condiciones finales de crecimiento para esta línea celular están la omisión del suero equino, notándose un crecimiento adecuado en su ausencia y el mantenimiento de un fenotipo aceptable (forma y tamaño) de las células. Según Díaz *et al* (1997) el suero equino puede ser utilizado en ausencia de suero fetal bovino (SFB) a una concentración del 10% en combinación con 6mM de glutamina.

El uso de suero fetal bovino sí es indispensable para el correcto crecimiento del cultivo celular. Este componente es fuente indispensable de proteínas necesarias para la adherencia a la matriz, enzimas y hormonas proteicas y no proteicas, factores de promoción de crecimiento, metabolitos, inactivantes de materiales tóxicos, entre otros (Reina, 2003).

En el caso de la L-glutamina, se adicionó al utilizar medio de cultivo caducado como refuerzo al contenido del mismo; esto debido a que este es un aminoácido altamente inestable en el medio de cultivo (Sigma-Aldrich, 2009). Sin embargo, se observó que la adición extra no era fundamental para el crecimiento celular, pero sí mejoraba ligeramente la tasa de crecimiento de la línea celular.

Al realizar los subcultivos se observó que la línea PC-12 presentaba un crecimiento acelerado al ser incubada bajo las condiciones óptimas de temperatura, humedad y medio de cultivo. Tras probar diversas alícuotas de suspensión celular, se determinó que al inocular 200µL (aproximadamente 3.5×10^6 células en total) se adicionaban células suficientes como para mantener a las células en la fase de crecimiento exponencial. Del mismo modo, se observó que en dicho inóculo las células requerían de únicamente una tripsinización semanal, lo cual reduce el estrés que se causa al realizar este procedimiento y la posibilidad de contaminación durante el mismo (Rodríguez, 2005).

Uno de los principales problemas que se presentaron en el transcurso de la investigación fue la contaminación producto de un hongo flotante; así como la contaminación causada por levaduras. En el primer caso no se logró identificar la fuente de dicha contaminación; pero, en el segundo caso la fuente pudo ser la flora normal de la piel al manipular los frascos tanto dentro como fuera de la cámara de flujo laminar. Esta última contaminación se dio posterior al retiro de la anfotericina del medio de cultivo debido a la escasez del reactivo.

Tras la estandarización del protocolo de cultivo y mantenimiento de las células, se procedió a realizar los estudios de proliferación. En esta parte se probó el efecto de diversas concentraciones de extracto de *M. urens* en las células; ésto para determinar cuáles de ellas podrían ser tóxicas y cuáles podrían presentar capacidad proliferativa.

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular, ésta es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos (FIBAO, 2008). Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por tanto la proliferación de las células. Asimismo cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento característicos que también regulan la proliferación celular al controlar la respuesta a tales factores (FIBAO, 2008).

Como se observa en la Figura 9, existen concentraciones a las cuales se supera el 100% de viabilidad celular. Este aumento puede ser considerado como un incremento en el número de células metabólicamente activas presentes en el pozo analizado. Según los resultados obtenidos las concentraciones en las cuales hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), al ser comparadas con el control positivo, y en las cuales se puede hablar de proliferación celular son

las correspondientes a 0.05mg/mL y 1mg/mL, los cuales presentaron un porcentaje de viabilidad celular de 139.14% y 130.80%, respectivamente. En los casos de las concentraciones de 0.1, 0.5 y 5mg/mL, en los que se observó un ligero aumento en el porcentaje de viabilidad, se concluyó que no habían diferencias significativas ($p < 0.05$) al ser comparadas con el control positivo.

Además de lo anteriormente mencionado, se observó que concentraciones mayores a 10mg/mL de extracto hidroalcohólico de *M. urens* ocasionaron un descenso considerable en la viabilidad celular.

Si la curva obtenida es analizada con detenimiento se puede observar que no presenta un comportamiento lineal o de tipo umbral (Cook & Calabrese, 2006). Esta curva dosis-respuesta presenta un comportamiento conocido en farmacología y toxicología como hormesis (Cook & Calabrese, 2006; Calabrese, 2004).

Este es un fenómeno de respuesta a dosis caracterizado por una estimulación por dosis bajas y una inhibición para dosis altas, que resulta en una curva de respuesta a nuevas dosis en forma de J o de U invertida (Cook & Calabrese, 2006; Calabrese, 2004). Al parecer la hormesis es una característica de muchas medicinas: con las dosis recomendadas por los médicos tienen un efecto curativo, pero en caso de sobredosis se dan efectos dañinos para la salud; o al contrario, grandes dosis presentan un efecto beneficioso, pero dosis muy pequeñas presentan efectos negativos también (Calabrese, 2004).

Al ser la sustancia adicionada un extracto no es posible identificar qué compuesto o compuestos son los responsables de la proliferación o del comportamiento de la curva. Los efectos observados pueden deberse al sinergismo (efectos combinados o aditivos) entre dos o más compuestos presentes en concentraciones desconocidas o por el efecto de un solo compuesto no identificado capaz de estimular a las células a dividirse.

Un posible causante de dicha proliferación es la L-dopa presente en dicho extracto (Chihara *et al*, 1986). En ensayos *in vivo* se ha visto que algunos neurotransmisores, especialmente las catecolaminas y la acetilcolina, juegan un papel crucial en el control de la secreción de la hormona encargada de liberación de la hormona de crecimiento -somatocrinina o hGHRH, por sus siglas en inglés- por parte de las neuronas; así como de la promover la secreción de la somatotropina u hormona de crecimiento -GH, por sus siglas en inglés- (Muller *et al*, 1991).

La GH es de gran importancia en el organismo debido a que facilita el aumento de tamaño de las células y estimula la mitosis, con lo que se desarrolla un número creciente de células y tiene lugar la diferenciación de determinados tipos de células. Además, la hormona juega un papel muy importante en el cerebro, ya que tiene propiedades neurotróficas/neuroprotectoras (OMIM, 2009).

Sin embargo, no se puede asegurar que L-dopa esté estimulando a las PC-12 a producir GH ya que ésta es secretada en el cerebro por las células de la adenohipófisis (Harvey &Hull, 2003). Sin embargo, no se puede descartar que L-dopa sí estimule la secreción de algún factor de crecimiento que pueda estar implicado con la proliferación celular observada.

La importancia fundamental de la producción de estos posibles factores de crecimiento en pacientes con la EP es la eventual utilización de las concentraciones proliferativas de *M. urens* para estimular la producción de la GH en el cerebro y con esto, la generación de nuevas neuronas o de nuevas terminaciones y/o conexiones axonales que replacen a aquellas células que han muerto.

En cuanto a la técnica utilizada para la evaluación de la proliferación celular, se debe aclarar que aunque la prueba de MTT aporta información relevante que puede dar indicios de procesos de proliferación celular no es la más precisa para este tipo de evaluación. El uso de técnicas como el marcaje del ADN (Invitrogen, 2009; Merck, 2010) o el uso de anticuerpos marcados (Frahm *et al.*, 1998), podrían resultar en la obtención de análisis más completos y sensibles del efecto proliferativo del extracto analizado (Scudiero *et al.*, 1988; Berridge *et al.*, 1996).

Finalmente, para realizar la curva de citoprotección se decidió elegir una concentración de la curva dosis-respuesta que no tuviese efectos en la proliferación celular. Lo anterior garantizó que las lecturas de viabilidad celular obtenidas correspondiesen únicamente a las células sobrevivientes al efecto de la neurotoxina gracias a la acción de extracto, y no a células nuevas producto del efecto proliferativo descrito anteriormente.

Tras el análisis de la curva dosis-respuesta (Figura 9) se eligió la concentración de 0.25mg/mL ya que ésta presentaba un porcentaje de viabilidad de 94.01%. Tras el análisis ANOVA se determinó que las concentraciones de 0.1, 0.5 y 5mg/mL no presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al ser comparadas con la dosis elegida, por lo cual también podrían ser utilizadas en estudios posteriores como dosis no proliferativas del extracto.

Basados en el trabajo mencionado por Fornaguera (2009, comunicación personal), en el cual se observó un efecto citoprotector del extracto hidroalcohólico de *M. urens* en células PC-12 tratadas con la neurotoxina 6-OHDA; se procedió a replicar y sistematizar dicho estudio ampliando las dosis probadas y utilizando una única dosis de extracto.

Una sustancia con propiedades citoprotectoras es aquella que protege las células del organismo frente a los efectos dañinos de por ejemplo el estrés oxidativo y el desencadenamiento de reacciones mediadas por radicales libres. De esa manera se busca reducir los cambios patológicos causantes de enfermedades como EP, Alzheimer (Meeroff, 1985), entre otras; al disminuir la acumulación de especies reactivas de oxígeno y demás radicales libres en el espacio extracelular. Los agentes citoprotectores pueden ser sustancias naturales o artificiales que promueven los mecanismos de defensa propios de las células; a su vez promueven la inactivación metabólica y/o la excreción de los agentes dañinos (Meeroff, 1985).

En el estudio de la EP, los daños neuronales causados por el estrés oxidativo han sido señalados como una de las posibles causas de la enfermedad (Schapira *et al.*, 1990; NINDS, 2009). En investigaciones realizadas a pacientes con dicha enfermedad se detectaron cambios relacionados con el estrés oxidativo, incluido el daño por radicales libres al ADN, las proteínas y las grasas en los cerebros de pacientes; lo cual refuerza esta hipótesis como una de las posibles causas de dicha enfermedad (Schapira *et al.*, 1990).

En la investigación de la EP existen una serie de modelos experimentales con los cuales se indagan las diversas posibles causas de la misma. El uso de neurotoxinas para producir modelos animales parkinsonianos ha sido la piedra angular de la investigación sobre la evolución y tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Luquin, 1998). La neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de dichos modelos es la 6-OHDA. Ésta es administrada vía sistémica o por medio de inyecciones intracerebrales a roedores, perro, gatos y primates (Luquin, 1998).

El uso tan generalizado de dicha toxina se explica porque produce una destrucción selectiva de las neuronas catecolaminérgicas, debido a que este compuesto es un análogo sintético de la dopamina. Esta semejanza estructural le permite ser transportado al interior de la célula por los transportadores de membrana de la dopamina y noradrenalina (Simola *et al.*, 2007).

Una vez dentro de la célula la 6-OHDA posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial; sin embargo, la muerte neuronal es provocada por la formación de

H₂O₂, radicales libres tipo hidroxilo (OH⁻) y quinonas que se producen en su metabolización por parte de la enzima monoamino oxidasa (MAO-A) [Luquin, 1998]. Estas especies reactivas causan daños en la estructura y función del ADN, producen la peroxidación lipídica, alterando las estructuras de las membranas celulares y de un gran número de proteínas (principalmente los puentes disulfuro), lo que causa que la célula ingrese a un proceso de muerte celular programada –apoptosis- o de necrosis (Simola *et al.*, 2007).

Como primer paso se procedió a realizar una curva dosis-respuesta de la 6-OHDA (Figura 10) en las células PC-12. Lo anterior para tener una gráfica de referencia y lograr hacer comparaciones de valor entre los datos obtenidos en las pruebas de citoprotección y los porcentajes de viabilidad celular de las células tratadas únicamente con la toxina. Posteriormente, se realizaron las pruebas de citoprotección utilizando la concentración de extracto seleccionada anteriormente.

Los resultados de estos análisis se ven en la Figura 11 y muestran un comportamiento estable a bajas concentraciones de toxina, notándose un aumento en el número de células viables en los tratamientos con 0.20 y 0.30mg/mL de la neurotoxina. Dicho aumento puede ser considerado como una respuesta proliferativa del extracto, al igual que se hizo en el análisis de la curva dosis-respuesta para el extracto de *M. urens*. También se observó una disminución muy marcada de la viabilidad al aumentar la concentración de la neurotoxina –a partir de 1mmol/L-, al ser ya el extracto insuficiente como para producir un efecto de protección celular frente a estas concentraciones de 6-OHDA.

Una vez obtenidos los datos anteriores, las gráficas se unificaron para permitir un análisis comparativo de los resultados, en el cual se utilizó la prueba estadística t student para muestras relacionadas. En dicha prueba se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos de 0.20 y 0.30mg/mL. De tal manera es posible concluir que el extracto presenta un efecto de citoprotección a esas concentraciones.

Al ser la 6-OHDA una toxina con características prooxidantes es razonable sugerir, que dentro del extracto podrían existir una sustancia o una serie de sustancias antioxidantes que puedan contrarrestar el efecto causado este compuesto.

Vega (2008), realizó una serie de pruebas cualitativas sobre el extracto utilizado en el presente estudio, para identificar algunos de los compuestos que lo constituían. Entre los

resultados obtenidos se demostró la presencia de taninos, alcaloides glicósidos y flavonoides con grupos fenoles como el revestratol. Por otra parte, estudios realizados en *Mucuna pruriens* han demostrado la presencia de compuestos antioxidantes como el glutatión, la nicotina, coenzima Q-10, NADH, β -carbolina, entre otros (Manyam *et al*, 2004 [b]; Eilittä *et al*, 2002); por lo que se podría presumir la presencia de éstos también en *M. urens*. Sin embargo, para afirmar que dichos compuestos forman parte de la fitoquímica *M. urens* se requerirían estudios futuros adicionales.

Numerosos estudios han demostrado los efectos protectores de los fenoles contra el daño neuronal en la EP, gracias a la facilidad que presentan los mismos para atravesar la barrera hematoencefálica (Dhanasekaran *et al*, 2008). Los efectos protectores de estos compuestos son atribuidos generalmente a la combinación de su propiedades secuestradoras de radicales libres y su acción quelante ante el hierro y otros metales (Dhanasekaran *et al*, 2008; Pérez, 2003). Además, a dichos compuestos se les atribuyen propiedades como la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa evitando la generación de especies reactivas del oxígeno *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos (Sun *et al*, 2008; Dhanasekaran *et al*, 2008). Por otra parte, se ha podido demostrar que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa (Pérez, 2003). Aunado a esto, los fenoles presentan también una acción en las rutas de señalización intracelular, como por ejemplo las relacionadas con la inducción de la transcripción de genes antioxidantes y antiinflamatorios (Sun *et al*, 2008).

Otros antioxidantes que pueden estar protegiendo a las PC-12 ante el estrés oxidativo provocado por la 6-OHDA son el NADH, la coenzima Q-10 y el glutatión (Manyam *et al*, 2004 [a]; Manyam *et al*, 2004 [b]; Eilittä *et al*, 2002).

El NADH incrementa la actividad mitocondrial del complejo I, el cual es afectado por la 6-OHDA, y la síntesis de dopamina. Además, interviene en la reparación del ADN y en la regulación celular (Manyam *et al*, 2004 [b]), lo cual permitiría a la célula seguir su ciclo sin interrupciones y permitiendo la proliferación observada posteriormente. La coenzima Q-10 tiene como función primordial la transferencia de electrones entre los componentes redox de la cadena de transporte de electrones para generar un gradiente de protones y generar ATP. Se ha observado que en pacientes con EP la concentración de dicha coenzima se encuentra disminuida,

así como la actividad del complejo I de la respiración celular (Manyam *et al*, 2004 [b]). Estudios sugieren que el uso de esta coenzima puede llegar a retardar el progreso de la enfermedad de Parkinson mediante el incremento de la actividad del complejo I; así como la protección contra lesiones estriatales producidas por ácido nitropropinoico y malonato (Beal *et al*, 1994). En *Mucuna*, a pesar de encontrarse en bajas cantidades, esta coenzima puede presentar un efecto coadyuvante y por lo tanto mejorar el efecto terapéutico de extracto (Manyam *et al*, 2004 [b]).

El glutatión también presenta un rol muy importante en la defensa contra la peroxidación de la membrana y reduciendo los niveles de peróxido de hidrógeno mediante la glutatión peroxidasa (Dhanasekaran *et al*, 2008). Los grupos tiol que presenta esta proteína son esenciales para la actividad del complejo I y otras enzimas mitocondriales relacionadas con la respiración celular. Es también considerado el mayor antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos de oxígeno reactivo, así como el mantenimiento de los antioxidantes exógenos, como las vitaminas C y E en sus formas reducidas o activas (Dhanasekaran *et al*, 2008).

Es probable que el extracto utilizado posea compuestos encontrados en otras especies del género *Mucuna* como por ejemplo la nicotina y la β -carbolina (Manyam *et al*, 2004 [b]; Eilittä *et al*, 2002), los cuales presentan actividad inhibitoria de la enzima monoamino oxidasa. Esta enzima, en su isoforma MAO-A, es la responsable de la oxidación e inactivación de los neurotransmisores monoaminérgicos serotonina, norepinefrina, epinefrina y dopamina. La MAO-A es también la responsable de la oxidación de la 6-OHDA generando peróxido de hidrógenos y demás especies reactivas de oxígeno que generan los daños por estrés oxidativo. Al inhibir la actividad de la MAO es posible disminuir la degradación de la dopamina y la subsecuente generación de toxinas como parte del catabolismo de las monoaminas (Pérez & Arancibia, 2006). Además de dicho efecto inhibitorio, la nicotina podría potenciar la liberación de la dopamina, así como estimular su síntesis, modificar la sensibilidad de los autorreceptores de la dopamina y modular la densidad de dichos receptores (Villégier *et al*, 2003; Pérez & Arancibia, 2006).

A pesar de que el extracto presenta sustancias identificadas como antioxidantes, no se puede descartar la existencia de otros compuestos desconocidos o de sinergismo entre diferentes sustancias que protegen a la célula ante los daños ocasionados por la 6-OHDA. Hay que

considerar que aunque haya sustancias antioxidantes en el extracto, éstas pueden presentarse en concentraciones tan bajas, que es la sumatoria de todos sus efectos las que generan la respuesta observada en los resultados.

Como se mencionó anteriormente, no existen datos científicos publicados sobre los efectos del extracto hidroalcohólico de *M. urens*, aparte de los dos estudios realizados en el Programa de Neurociencias de la UCR. Sin embargo, cada uno de los trabajos anteriores sentó las bases para el siguiente, generando así la información suficiente como para llevar a cabo el presente trabajo.

Con este estudio se logró comprobar la capacidad proliferativa y citoprotectora *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *M. urens*; los cuales podrían quizás tener aplicaciones tanto como tratamiento regenerativo como preventivo; respectivamente. Así mismo se lograron estandarizar las condiciones de cultivo para el modelo experimental de la línea celular PC-12, ampliamente utilizada a nivel internacional para la investigación de los mecanismos moleculares y celulares de las enfermedades neurodegenerativas y la búsqueda de nuevos tratamientos contra las mismas.

CONCLUSIONES

- La línea celular PC-12 presenta un buen crecimiento a condiciones estándar de cultivo celular. Cambios en la concentración de antibiótico o L-glutamina en el medio de cultivo no reducen significativamente la tasa de crecimiento ni causan cambios en el fenotipo celular.
- El extracto hidroalcohólico de *M. urens* presenta un efecto proliferativo significativo al ser administrado a las células PC-12. Esto puede deberse a uno o más compuestos descritos o desconocidos que actúen solos o de manera sinérgica.
- L-dopa podría considerarse como una de los responsables de dicho efecto proliferativo ya que en diversos estudios se ha encontrado que estimula la producción de la hormona de crecimiento en neuronas y en células dopaminérgicas como las PC-12.
- El extracto presenta una curva de tipo hormético. Dicha forma puede ser atribuida a uno o más compuestos presentes en el extracto que produzcan un efecto beneficioso a bajas concentraciones y una inhibición a dosis más elevadas o viceversa
- *M. urens* presenta un efecto citoprotector ante los daños causados por la neurotoxina 6-OHDA. Este efecto es de carácter antioxidante y puede ser atribuido a sustancias tales como el glutatión, la coenzima Q-10, entre otros; que han sido identificados tanto en esta especie de *Mucuna* como en otras.
- Los datos obtenidos podrían explicar los efectos antiparkinsonianos observados por Molina & Solís en modelos animales.

RECOMENDACIONES

- Realizar las mismas pruebas a células PC-12 diferenciadas con NGF para identificar si hay diferencias significativas en el comportamiento y viabilidad celular.
- Utilizar otras técnicas de medición de proliferación, como el marcaje de ADN o el uso de anticuerpos, más sensible para la obtención de resultados más precisos.
- Utilizar diferentes dosis de extracto para las pruebas de citoprotección con el fin de determinar el tratamiento más adecuado para las diferentes concentraciones de 6-OHDA.
- Probar la propiedad proliferativa del extracto de *M. urens* como tratamiento regenerativo en un modelo animal.
- Probar en el modelo de PC-12, fracciones activas del extracto de *M. urens* con el fin de dilucidar un poco cuáles son los compuestos activos del extracto.
- Realizar estudios fitoquímicos del extracto para identificar la presencia de los compuestos antioxidantes sugeridos.

LITERATURA CITADA

- Alvernia, J. 2008. *Medicamentos y enfermedad de Parkinson*. [En Línea] Disponible en: «<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c56.htm>» [2009, 17 de octubre]
- ATCC. 2008. *PC-12*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1721&Template=cellBiology#aPropc5f58>» [2009, 17 de junio]
- Attiah, D; Kopher, R; Desai, T. 2003. *Characterization of PC12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors*. Journal of Materials Science. 14(11); 1005-9.
- Beal, M; Henshaw, D; Jenkins, B; Rosen, B & Schulz, J. 1994. *Coenzyme Q10 and nicotinamide block striatal lesions produced by the mitochondrial toxin malonate*. Annals of Neurology. 36(6); 882-888.
- Berridge, M; Tan, A; McCoy, K & Wang, R. 1996. *The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts*. Biochemica 4; 14–19.
- Braunwald, E. Fauci, A. Kasper, D. Hauser, S. Longo D & Jamenson, L. 2001. *Principios de Medicina Interna*. 15ta Edición. Mac Graw Hill/Interamericana de España S.A. pp 2806-2810.
- Calabrese, E. 2004. *Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine*. EMBO Rep. 5(Suppl 1); S37–S40.
- Chaudrty, A. 2004. *Cell Culture*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>» [2009, 01 de diciembre]
- Chihara, K; Kashio, Y; Kita, T; Okimura, Y; Kaji, H; Abe, H & Fujita, T. 1986. *L-dopa stimulates release of hypothalamic growth hormone-releasing hormone in humans*. J Clin Endocrinol Metab. 62(3); 466-73.
- Chorro, F; Such-Belenguer, L & López-Merino, V. 2009. *Modelos animales de enfermedad cardiovascular*. Rev Esp Cardiol. 62(1); 69-84.
- Cook, R & Calabrese, E. 2006. *The importance of Hormesis to Public Health*. Environmental health Perspectives. 114(11); 1631-1635.
- Denizot, F & Lang, R. 1986. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J. Immunol. Methods. 89 (2); 271–277.
- Dhanasekaran, M; Tharakan, B & Manyam, B. 2008. *Antiparkinson Drug –Mucuna pruriens– shows Antioxidant and Metal Chelating Activity*. Phytother. Res. 22 (1); 6–11.
- Díaz, I; Sondon, M; Bahr, P & Escalona, L. 1997. *Estudio de la influencia del suero equino en el crecimiento de mielomas murinos*. Correo Científico Médico de Holguín. 1 (4).
- Eilittä, M; Bressani, R; Carew, L; Carsky, R; Flores, M; Gilbert, R; Huyck, L; St-Laurent, L & Szabo, N. 2002. *Mucuna as a Food and Feed Crop: An Overview*. CIDICCO (International Cover Crops Clearinghouse), CIEPCA (Center for Information and Seed Exchange in Africa)-IITA (International Institute of Tropical Agriculture) World Hunger Research Center, Judson College. 18-46.

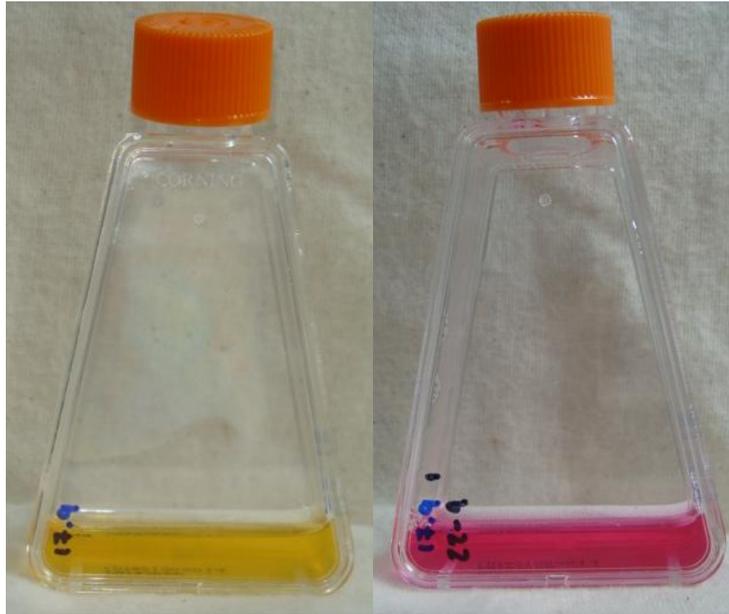
- Frahm, S; Zott, B; Dworeck, C; Steinmann, J; Neppert, J & Parwaresch, R. 1998. *Improved ELISA proliferation assay (EPA) for the detection of in vitro cell proliferation by a new Ki-67-antigen directed monoclonal antibody (Ki-S3)*. Journal of Immunological Methods. 211(1-2); 43-50.
- Franco, J. 2008. Parkinson. [En Línea] Disponible en:
 «http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Cultivos_Celulares/Parkinson_Trabajo.pdf» [2009, 17 de octubre]
- FIBAO Medicina Molecular. *Proliferación Celular*. [En Línea] Disponible en:
 «<http://www.medmol.es/termino.cfm?id=104>» [2009, 17 de diciembre]
- Gerfen, C. 2006. *Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson's disease*. Nature Neuroscience. 9(2); 157-158
- Greene, L. 1978. *Nerve Growth Factor Prevents the Death and Stimulates the Neuronal Differentiation of Clonal PC12 Pheochromocytoma Cells in Serum-Free Medium*. J. Cell Biolog. 78 (3); 747-755.
- Greene, L & Tischler, A. 1976. *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci USA. 73 (7); 2424-2428
- Harvey, S & Hull, K. 2003. *Neural growth hormone: an Update*. Journal of Molecular Neuroscience. 20; 1-13.
- HP-200 in Parkinson's Disease Study Group. 1995. *An alternative medicine treatment for Parkinson's disease: results of a multicenter clinical trial*. J Altern Complement Med. 1; 249-55.
- Hoogesteger, C. 1994. *Uso de plantas medicinales*. 1a Edición. Editorial Pax México. pp 9-11.
- Hotton, G & Chaudhuri, K. 2008. *Enfermedad de Parkinson*. [En Línea] Disponible en:
 «<http://www.netdoctor.es/XML/articuloNet.jsp?XML=000451>» [2010, 03 de enero]
- Hussain G & Manyam B. 1997. *Mucuna pruriens Proves More Effective than L-Dopa in Parkinson's Disease Animal Model*. Phytotherapy Research. 11 (6); 419-423.
- Invitrogen, 2009. *Click-iT® EdU Cell Proliferation Assays*. [En Línea] Disponible en:
 «<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Click-iT-Detection-Assays/Click-iT-EdU.html>» [2010, 03 de enero]
- Juri, C & Chaná, P. 2006. *Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido?*. Rev Méd Chile. 134 (7); 893-901
- Katzenschlager, R; Evans, A; Manson A, Patsalos, P; Ratnaraj, N; Watt, H; Timmermann, L; Van der Giessen, R & Lees, A. 2004. *Mucuna pruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 75 (12); 1672-1677.
- Kidd, P. 2000. *Parkinson's Disease as Multifactorial Oxidative Neurodegeneration: Implications for Integrative Management*. Alternative Medicine Review. 5 (6); 502-545
- Lima, L. 2008. *Estrés Oxidativo y Antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos*. [En Línea] Disponible en:
 «http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/estres_oxidativo_y_antioxidantes.pdf» [2009, 17 de octubre]

- Lin, C; Cheng, J; Lin, F.; Chou, A; Lee, T; Chen, J; Yang, L. 2002. *Effect of thiopental, propofol, and etomidate on vincristine toxicity in PC12 cells*. Cell biology and toxicology. 18(1); 63-70.
- Luquin, MR. 1998. *Modelos Experimentales de Enfermedad de Parkinson*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.uninet.edu/neurocon/congreso-1/conferencias/t-movimiento-2.html>» [2009, 27 de junio]
- Manyam, B; Dhanasekaran M & Hare T. 2004 (a). *Effect of antiparkinson drug HP-200 (Mucuna pruriens) on the central monoaminergic neurotransmitters*. Phytother Res. 18 (2); 97-101
- Manyam, B; Dhanasekaran M & Hare T. 2004 (b). *Neuroprotective effects of the antiparkinson drug Mucuna pruriens*. Phytother Res 18(9); 706-712.
- Manyam, B & Cryer, G. 2000. *Beans (Mucuna Pruriens) For Parkinson's Disease: An Herbal Alternative*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.parkinson.org/Page.aspx?pid=459>» [2009, 01 de julio].
- Marjama, J & Koller, W. 2001. *Parkinson's disease: Update in diagnosis and symptom management*. Geriatrics. 56 (8); 24-35.
- Marsden, C. 2006. *Dopamine: the rewarding years*. British Journal of Pharmacology. 147 (S1); S136-S144.
- Meeroff, J. 1985. *Mechanism of cytoprotection*. Digestive Diseases and Sciences. 30(7); 697-698.
- Merck. 2010. *QIA58 BrdU Cell Proliferation Assay*. [En Línea] Disponible en: «http://www.merck-chemicals.com/centro-america/life-science-research/brdu-cell-proliferation-assay/EMD_BIO-QIA58/p_dTqb.s1Lzm8AAAEW22EfVhTm?PortalCatalogID=merck4biosciences» [2010, 03 de enero]
- Molina, R & Solís, E. 2003. *Estudio de la actividad antiparkinsoniana del extracto hidroalcohólico de la semilla de la planta de Mucuna urens*. [Tesis de Licenciatura]. San José, U.C.R, Sede Universitaria Rodrigo Facio.
- Muller, E; Locatelli, V; Ghigo, E; Cella, S; Loche, S; Pintor, C; Camanni, F. 1991. *Involvement of Brain Catecholamines and Acetylcholine in Growth Hormone Deficiency States: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Implications*. Drugs. 41(2); 161-177.
- Muñoz, O; Montes, M & Wilkomirsky, T. 2004. *Plantas medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología*. 2da Edición. Editorial Universitaria. pp 15-16.
- Nagashayana, N; Sankarankutty, P; Nampoothirir, M; Mohan, P & Mohanakumar, K. 2000. *Association of L-dopa with recovery following Ayurveda medication in Parkinson's disease*. J Neurol Sci. 176 (2); 124-7.
- National Alliance for Hispanic Health (NAHH). 2008. *La enfermedad de Parkinson*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.hispanichealth.org/folletos/action.lasso?-response=response1.lasso&RECORD=05130801>» [2009, 29 de julio].
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), 2009. *Enfermedad de Parkinson: Esperanza en la Investigación*. [En Línea] Disponible en: «http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm» [2009, 29 de julio].

- National Parkinson Foundation (NPF). 2007. About Parkinson's Disease. [En Línea] Disponible en: «<http://www.parkinson.org/Page.aspx?pid=225>» [2009, 01 de julio].
- Núñez, E. 1982. *Plantas medicinales de Costa Rica y su folklore*. 3era Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp 125.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). 2009. *Hormona de Crecimiento*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=139250&rn=1>» [2009, 19 de diciembre].
- Pérez, G. 2003. *Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes*. Rev Cubana Invest Biomed. 22(1); 48-57.
- Ramos, M. 2009. *Tratamiento Interdisciplinar De La Enfermedad De Parkinson*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.efisioterapia.net/articulos/imprimir.php?id=272&p=272.pdf>» [2010, 11 de enero]
- Reina, M. 2003. *El medio de cultivo*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap3.htm#4.6%20Hormonas%20y%20factores%20de%20crecimiento%20:%20suero.>» [2009, 09 de diciembre].
- Rice-Evans, C & Gopinathan V. 1995. *Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates*. Essays Biochem. 29; 39-63.
- Rodríguez, A. 2005. *Microscopía Electrónica Analítica de la Célula Endotelial. Sistematización de los Patrones Microscópicos y Microanalíticos*. [Tesis Doctoral.] Universidad de Granada, España.
- Sarmiento, V & Loscertales, M. 1999. *Evaluación de los tratamientos quirúrgicos de la enfermedad de Parkinson: informe técnico de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA)*. 1era Edición. Ministerio de Sanidad y Consumo. España.
- Schapira, A; Cooper, J; Dexter, D; Clark, J; Jenner, P & Marsden, C. 1990. *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. J Neurochem. 54(3); 823-7.
- Scudiero, D; Shoemaker, R; Paull, K; Monks, A; Tierney, S; Nofziger, T; Currens, M; Seniff, D & Boyd, M. 1988. *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res. 48(17); 4827-33.
- Sigma-Aldrich. 2009. *Glutamine in Cell Culture*. [En Línea] Disponible en: «<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glutamine.html>» [2009, 01 de diciembre].
- Simola, N; Morelli, M; Carta, A. 2007. *The 6-Hydroxydopamine model of Parkinson's disease*. Neurotoxicity Research. 11(3,4);151-167.
- Simuni, T & Stern, M. 1999. *Does levodopa accelerate Parkinson's disease?*. Drugs & aging 14 (6); 399-408.
- Smithsonian Tropical Research Institute (STRI). 2009. *Mucuna urens*. [En Línea] Disponible en: «<http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/4800/?fam=Fabaceae%2Fpap.&page=10&lang=es> » [2009, 01 de julio].

- Sun, A; Wang, Q; Simonyi, A & Sun, G. 2008. *Botanical phenolics and brain health*. Neuromolecular Med. 10(4); 259–274.
- Tovar, J. 2004. *Biología Celular*. [En Línea] Disponible en:
«<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>
» [2010, 05 de enero].
- Tripathi, Y & Upadhyay, A. 2002. *Effect of the Alcohol Extract of the Seeds of Mucuna pruriens on Free Radicals and Oxidative Stress in Albino Rats*. Phytother. Res. 16 (6); 534–538.
- Vargas, L. 2007. *Enfermedad de Parkinson y la Dopamina*. BUN Synapsis. 2; 12-16
- Vayda, A; Rajgopalan, T; Mankodi N, Antarkar, D; Tathed, P; Purohit, A & Wadia, N. 1978. *Treatment of Parkinson's disease with the cowhage plant - Mucuna pruriens (Bak)*. Neurol India. 26 (4); 171–6.
- Vega, L. 2008. *Estudio del efecto in vitro del extracto hidroalcohólico crudo y fraccionado de las semillas de Mucuna urens sobre receptores muscarínicos*. [Tesis de Licenciatura en Farmacia.] Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Vermeulen, R.J. 1994. “*Effects of Dopamine D1 and D2 receptor agonists on motor behavior of MPTP-lesioned monkeys*”. PhD-tesis, Vrije Universiteit Amsterdam.
- Villégier, A; Blanc, G; Glowinski, J & Tassin, J. 2003. *Transient behavioral sensitization to nicotine becomes long-lasting with monoamine oxidases inhibitors*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 76 (2); 267-274
- Walkinshaw, G & Waters, C. 1995. *Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease*. J Clin Invest. 95(6); 2458–2464.
- Walpole, R; Myers, R & Ye, K. 2002. *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*. 8va edición. Pearson Education.
- Zang, Z; Wang, T; Cao, X; Sun, S & Wang, L. 2009. *6-OHDA induces cycle reentry and apoptosis of PC12 cells through activation of ERK1/2 signaling pathway*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 29(1); 97-100.

ANEXO 1: FRASCOS ROUX 25 CM² CON CRECIMIENTO CELULAR EN MONOCAPA.



El frasco de la izquierda presenta medio de cultivo viejo y a la derecha medio de cultivo fresco

**ANEXO 2: PRUEBA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE
PROLIFERACIÓN CELULAR**

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Absorb	246	0	246	0.008	1.879	0,640	0,433

Variable	Categoríasmg/mL	Frecuencias	%
Tratam	0.05	15	6.098
	0.1	16	6.504
	0.25	22	8.943
	0.5m	22	8.943
	10	21	8.537
	1	22	8.943
	25	22	8.943
	50	22	8.943
	5	16	6.504
	C -	14	5.691
C+	54	21.951	

Análisis de la varianza:

Origen de las variaciones	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Entre grupos	10	25.727	2.573	29.872	< 0.0001
Dentro de los grupos	235	20.239	0.086		
Total corregido	245	45.966			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

Parámetros del modelo:

Fuente	Valor	Desviación típica	t	Pr > t 	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Intersección	1.083	0.076	14.289	< 0.0001	0.933	1.232
0.05mg/mL	0.000	0.000				
0.1mg/mL	-0.243	0.105	-2.303	0.022	-0.451	-0.035
0.25mg/mL	-0.351	0.098	-3.574	0.000	-0.545	-0.158
0.5mg/mL	-0.262	0.098	-2.662	0.008	-0.455	-0.068
10mg/mL	-0.692	0.099	-6.976	< 0.0001	-0.888	-0.497
1mg/mL	-0.065	0.098	-0.660	0.510	-0.258	0.129
25mg/mL	-0.959	0.098	-9.764	< 0.0001	-1.153	-0.766
50mg/mL	-0.880	0.098	-8.955	< 0.0001	-1.074	-0.686
5mg/mL	-0.253	0.105	-2.398	0.017	-0.461	-0.045
C -	-1.047	0.109	-9.598	< 0.0001	-1.262	-0.832
C+	-0.305	0.086	-3.556	0.000	-0.473	-0.136

Tratam / Dunnett (bilateral) / Análisis de las diferencias entre las categorías y a categoría control Tratam-C+ con un intervalo de confianza de 95%:

Categoría	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Diferencia crítica	Pr > Dif	Significativo
C+ vs 0.05mg/mL	-0.305	-3.556	2.804	0.240	0.004	Si
C+ vs 1mg/mL	-0.240	-3.229	2.804	0.208	0.014	Si
C+ vs 0.1mg/mL	-0.062	-0.738	2.804	0.234	0.996	No
C+ vs 5mg/mL	-0.052	-0.618	2.804	0.234	0.999	No
C+ vs 0.5mg/mL	-0.043	-0.579	2.804	0.208	0.999	No
C+ vs C -	0.742	8.433	2.804	0.247	0.000	Si
C+ vs 25mg/mL	0.655	8.823	2.804	0.208	0.000	Si
C+ vs 50mg/mL	0.575	7.752	2.804	0.208	0.000	Si
C+ vs 10mg/mL	0.388	5.134	2.804	0.212	0.000	Si
C+ vs 0.25mg/mL	0.047	0.628	2.804	0.208	0.999	No

ANEXO 3: PRUEBA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE CURVA DE 6-OHDA

Estadísticas descriptivas:

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Absorb	84	0	84	0.003	0.473	0.311	0.143

Variable	Categorías	Frecuencias	%
Tratam	0mmol/L	8	9.524
	100umol/L	8	9.524
	10mmol/L	8	9.524
	1mmol/L	8	9.524
	200umol/L	8	9.524
	300umol/L	8	9.524
	400umol/L	8	9.524
	500umol/L	8	9.524
	50umol/L	8	9.524
	5mmol/L	8	9.524
C -	4	4.762	

Análisis de la varianza:

Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	10	1.631	0.163	153.808	< 0.0001
Error	73	0.077	0.001		
Total corregido	83	1.709			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

Parámetros del modelo:

Fuente	Valor	Desviación típica	t	Pr > t 	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Intersección	0.388	0.012	33.721	< 0.0001	0.365	0.411
0mmol/L	0.000	0.000				
100umol/L	-0.026	0.016	-1.597	0.115	-0.058	0.006
10mmol/L	-0.338	0.016	-20.743	< 0.0001	-0.370	-0.305
1mmol/L	0.006	0.016	0.368	0.714	-0.026	0.038
200umol/L	-0.020	0.016	-1.205	0.232	-0.052	0.013
300umol/L	-0.017	0.016	-1.036	0.303	-0.049	0.016
400umol/L	0.004	0.016	0.269	0.789	-0.028	0.037
500umol/L	0.035	0.016	2.119	0.038	0.002	0.067
50umol/L	0.012	0.016	0.722	0.473	-0.021	0.044
5mmol/L	-0.276	0.016	-16.974	< 0.0001	-0.309	-0.244
C -	-0.383	0.020	-19.218	< 0.0001	-0.423	-0.344

Tratam / Dunnett (bilateral) / Análisis de las diferencias entre las categorías y a categoría control Tratam-0mmol/L con un intervalo de confianza de 95%:

Categoría	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Diferencia crítica	Pr > Dif	Significativo
0mmol/L vs 500umol/L	-0.035	-2.119	2.793	0.045	0.222	No
0mmol/L vs 50umol/L	-0.012	-0.722	2.793	0.045	0.991	No
0mmol/L vs 1mmol/L	-0.006	-0.368	2.793	0.045	1.000	No
0mmol/L vs 400umol/L	-0.004	-0.269	2.793	0.045	1.000	No
0mmol/L vs C -	0.383	19.218	2.793	0.056	0.000	Si
0mmol/L vs 10mmol/L	0.338	20.743	2.793	0.045	0.000	Si
0mmol/L vs 5mmol/L	0.276	16.974	2.793	0.045	0.000	Si
0mmol/L vs 100umol/L	0.026	1.597	2.793	0.045	0.535	No
0mmol/L vs 200umol/L	0.020	1.205	2.793	0.045	0.819	No
0mmol/L vs 300umol/L	0.017	1.036	2.793	0.045	0.911	No

**ANEXO 4: PRUEBA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE CURVA
DE TRATAMIENTO M. URENS + 6-OHDA**

Estadísticas
descriptivas:

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Absorb	246	0	246	0.008	1.879	0.640	0.433

Variable	Categorías	Frecuencias	%
Tratam	0.05mg/mL	15	6.098
	0.1mg/mL	16	6.504
	0.25mg/mL	22	8.943
	0.5mg/mL	22	8.943
	10mg/mL	21	8.537
	1mg/mL	22	8.943
	25mg/mL	22	8.943
	50mg/mL	22	8.943
	5mg/mL	16	6.504
	C -	14	5.691
	C+	54	21.951

Análisis de la varianza:

Origen de las variaciones	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Entre grupos	10	25.727	2.573	29.872	< 0.0001
Dentro de los grupos	235	20.239	0.086		
Total corregido	245	45.966			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

Parámetros del modelo:

Fuente	Valor	Desviación típica	t	Pr > t	Límite	
					inferior (95%)	Límite superior (95%)
Intersección	1.083	0.076	14.289	< 0.0001	0.933	1.232
0.05mg/mL	0.000	0.000				
0.1mg/mL	-0.243	0.105	-2.303	0.022	-0.451	-0.035
0.25mg/mL	-0.351	0.098	-3.574	0.000	-0.545	-0.158
0.5mg/mL	-0.262	0.098	-2.662	0.008	-0.455	-0.068
10mg/mL	-0.692	0.099	-6.976	< 0.0001	-0.888	-0.497
1mg/mL	-0.065	0.098	-0.660	0.510	-0.258	0.129
25mg/mL	-0.959	0.098	-9.764	< 0.0001	-1.153	-0.766
50mg/mL	-0.880	0.098	-8.955	< 0.0001	-1.074	-0.686
5mg/mL	-0.253	0.105	-2.398	0.017	-0.461	-0.045
C -	-1.047	0.109	-9.598	< 0.0001	-1.262	-0.832
C+	-0.305	0.086	-3.556	0.000	-0.473	-0.136

Tratam / Dunnett (bilateral) / Análisis de las diferencias entre las categorías y a categoría control Tratam-C+ con un intervalo de confianza de 95%:

Categoría	Diferencia	Diferencia		Diferencia crítica	Pr > Dif	Significativo
		estandarizada	Valor crítico			
C+ vs 0.05mg/mL	-0.305	-3.556	2.804	0.240	0.004	Si
C+ vs 1mg/mL	-0.240	-3.229	2.804	0.208	0.014	Si
C+ vs 0.1mg/mL	-0.062	-0.738	2.804	0.234	0.996	No
C+ vs 5mg/mL	-0.052	-0.618	2.804	0.234	0.999	No
C+ vs 0.5mg/mL	-0.043	-0.579	2.804	0.208	0.999	No
C+ vs C -	0.742	8.433	2.804	0.247	0.000	Si
C+ vs 25mg/mL	0.655	8.823	2.804	0.208	0.000	Si
C+ vs 50mg/mL	0.575	7.752	2.804	0.208	0.000	Si
C+ vs 10mg/mL	0.388	5.134	2.804	0.212	0.000	Si
C+ vs 0.25mg/mL	0.047	0.628	2.804	0.208	0.999	No

ANEXO 5: PRUEBA T STUDENT PARA MUESTRAS RELACIONADAS

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	0.05mmol/L	.4000000	8	.02700132	.00954641
	0.05mmol/L	.418038	8	.0723475	.0255787
Par 2	0.10mmol/L	.435990	8	.0535618	.0189370
	0.10mmol/L	.3622500	8	.02609324	.00922535
Par 3	0.20mmol/L	.460010	8	.0602078	.0212867
	0.20mmol/L	.3686250	8	.05083429	.01797264
Par 4	0.30mmol/L	.439529	8	.0463011	.0163699
	0.30mmol/L	.3713750	8	.02903661	.01026599
Par 5	0.40mmol/L	.405144	8	.0328179	.0116029
	0.40mmol/L	.3926250	8	.04059359	.01435200
Par 6	0.50mmol/L	.375125	8	.0638280	.0225666
	0.50mmol/L	.4227500	8	.03522986	.01245564
Par 7	1mmol/L	.413413	8	.0557389	.0197067
	1mmol/L	.3942500	8	.03524202	.01245994
Par 8	5mmol/	.085942	8	.0317773	.0112350
	5mmol/	.1118750	8	.02218389	.00784319
Par 9	10mmol/L	.0505000	8	.01690942	.00597838
	10mmol/L	.049760	8	.0424046	.0149923
Par 10	0mmol/L	.408202	8	.0562910	.0199019
	0mmol/L	.3882500	8	.03620971	.01280206
Par 11	Control -	.008750	4	.0038622	.0019311
	Control -	.0050000	4	.00221736	.00110868

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	0.05mmol/L y 0.05mmol/L	8	.347	.400
Par 2	0.10mmol/L y 0.10mmol/L	8	.150	.723
Par 3	0.20mmol/L y 0.20mmol/L	8	.393	.336
Par 4	0.30mmol/L y 0.30mmol/L	8	.604	.113

Par 5	0.40mmol/L y 0.40mmol/L	8	.009	.982
Par 6	0.50mmol/L y 0.50mmol/L	8	.120	.777
Par 7	1mmol/L y 1mmol/L	8	.354	.390
Par 8	5mmol/ y 5mmol/	8	-.069	.870
Par 9	10mmol/L y 10mmol/L	8	.055	.896
Par 10	0mmol/L y 0mmol/L	8	-.414	.308
Par 11	Control - y Control -	4	.769	.231

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
					95% Intervalo de confianza para la diferencia				
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Inferior	Superior			
Par 1	0.05mmol/L - 0.05mmol/L	-.01803846	.06788831	.02400214	-.07479451	.03871758	-.752	7	.477
Par 2	0.10mmol/L - 0.10mmol/L	.07374038	.05594835	.01978073	.02696639	.12051438	3.728	7	.007
Par 3	0.20mmol/L - 0.20mmol/L	.09138462	.06169265	.02181165	.03980827	.14296096	4.190	7	.004
Par 4	0.30mmol/L - 0.30mmol/L	.06815385	.03691459	.01305128	.03729248	.09901521	5.222	7	.001
Par 5	0.40mmol/L - 0.40mmol/L	.01251923	.05195846	.01837009	-.03091913	.05595759	.682	7	.517
Par 6	0.50mmol/L - 0.50mmol/L	-.04762500	.06910822	.02443345	-.10540092	.01015092	-1.949	7	.092
Par 7	1mmol/L-1mmol/L	.01916346	.05439954	.01923314	-.02631569	.06464261	.996	7	.352
Par 8	5mmol/ - 5mmol/	-.02593269	.03999602	.01414073	-.05937020	.00750482	-1.834	7	.109
Par 9	10mmol/L - 10mmol/L	.00074038	.04477236	.01582942	-.03669024	.03817101	.047	7	.964
Par 10	0mmol/L -0mmol/L	.01995192	.07853224	.02776534	-.04570267	.08560652	.719	7	.496
Par 11	Control - -Control -	.00375000	.00258199	.00129099	-.00035852	.00785852	2.905	3	.062