

Papel neuroprotector y antiinflamatorio de compuestos derivados de la triptamina en un modelo *in vitro* de enfermedad de Parkinson.

Daniel Gutiérrez Tejedor^{1, 2, a}, Ana Pérez-Castillo^{2, 3}, José Ángel Morales-García^{2, 3, 4}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Departamento de Modelos Experimentales de Enfermedades Humanas, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), 28029 Madrid, España. 3. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, España. 4. Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, UCM, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, España.

a. danielgutierreztejedor@gmail.com

Palabras clave: enfermedad de Parkinson; neuroprotección; inflamación; ayahuasca; derivados triptamínicos; antagonistas

Resumen

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra en el mesencéfalo ventral y por la neuroinflamación generada por la glía colindante, lo cual altera la ruta de comunicación nigroestriatal y produce los síntomas motores característicos de la enfermedad. Recientemente, se han descrito posibles efectos terapéuticos en un brebaje utilizado en ritos chamánicos por tribus del Amazonas: la ayahuasca. A partir de uno de los principales componentes de la ayahuasca se han desarrollado derivados químicos con potenciales propiedades terapéuticas. El objetivo de este estudio es analizar si cuatro de dichos derivados tienen propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias en un modelo *in vitro* de enfermedad de Parkinson y determinar a través de qué receptor ejercerían tales efectos terapéuticos. Los resultados de los ensayos neuroprotección en la línea celular dopaminérgica SH-SY5Y frente a un daño inducido por 6-hidroxidopamina demostraron que los cuatro derivados estudiados ejercían un importante papel neuroprotector y antiinflamatorio. En cultivos primarios de astrogliá y microgliá estimulados con lipopolisacárido bacteriano también se observó un claro efecto antiinflamatorio por parte de los derivados analizados, con una reducción significativa de los niveles de TNF α , COX-2 y nitritos producidos por la glía. Se determinó además que dichos efectos neuroprotectores y antiinflamatorios podrían estar mediados a través del receptor Sigma-1 en dos de los cuatro derivados analizados. En el caso de los otros dos derivados, nuestros resultados no determinaron con exactitud a través de qué receptor podrían estar actuando. En futuros estudios habrá que determinar si estos compuestos podrían mediar estos efectos a través de otros receptores, completar los resultados de neuroprotección con ensayos de citotoxicidad, comprobar si pueden atravesar la barrera hematoencefálica y realizar ensayos *in vivo* para confirmar el papel neuroprotector y antiinflamatorio de los derivados más eficaces.

Cita: Gutiérrez Tejedor, Daniel; Pérez-Castillo, Ana; Morales-García, José Ángel (2018) Papel neuroprotector y antiinflamatorio de compuestos derivados de la triptamina en un modelo *in vitro* de enfermedad de Parkinson. *dianas* 7 (2): e20180904. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e20180904.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Gutiérrez-Tejedor D, Pérez-Castillo A, Morales-García J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, por detrás de la enfermedad de Alzheimer [1]. El principal factor de riesgo para padecer la EP es la edad, por lo que la incidencia de esta enfermedad se dispara en la población mayor de 60 años, afectando notablemente más a hombres que a mujeres [2, 3].

La fisiopatología de esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral, especialmente en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc). Normalmente en el momento del diagnóstico de la enfermedad ya se han perdido más del 60% de las neuronas en dicha región [4]. La neurodegeneración dopaminérgica da pie a la aparición de síntomas motores (bradiquinesia, aquinesia, temblores y rigidez) [5] y no motores, tales como depresión, estreñimiento, problemas genitourinarios, dolor y trastornos del sueño [6].

Los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad no han sido completamente descritos. De todos los procesos estudiados hasta la actualidad, los más destacables implicados en la patogénesis de la EP son: estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, plegamiento incorrecto y agregación de α -sinucleína (formación de cuerpos de Lewy), inflamación y activación de células gliales en la SNpc, excitotoxicidad por alteraciones en la homeostasis de Ca²⁺ y apoptosis. Sin embargo, no todas estas alteraciones suelen darse de manera simultánea, sino que pueden estar actuando sólo algunas de ellas de forma sinérgica,

promoviendo la neurodegeneración [7]. Cabe destacar el importante papel de la neuroinflamación en la patogénesis de la EP, ya que los mediadores pro-inflamatorios liberados por la microglía inducen la expresión de factores de transcripción latentes (NF- κ B o STAT-3) e inhiben las vías de señalización de neuroprotección en neuronas dopaminérgicas [8].

Hasta la fecha, la única estrategia terapéutica llevada a la clínica consiste en el tratamiento de los síntomas con Levodopa (L-DOPA), el precursor de la dopamina, aunque sólo se realiza de forma temporal debido a que la administración de L-DOPA de forma crónica da lugar a efectos secundarios severos [9]. Todavía no se ha desarrollado un tratamiento efectivo para detener la neurodegeneración y reducir la neuroinflamación asociada. Actualmente, parte de los esfuerzos para combatir la enfermedad se centran en la búsqueda de compuestos neuroprotectores que prevengan la pérdida irreversible de neuronas y la progresión de la EP. Otra aproximación terapéutica se basa en la investigación de estrategias basadas en la estimulación de la neurogénesis endógena en los dos principales nichos neurogénicos en el adulto: la zona subventricular (ZSV) del ventrículo lateral y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo [10].

En los últimos años, se han descrito las propiedades terapéuticas de un brebaje utilizado en rituales chamánicos por culturas indígenas del Amazonas con propiedades psicotrópicas: la ayahuasca. Dicha infusión se prepara a partir de una mezcla de plantas, principalmente hojas del arbusto *Psychotria viridis* y la vid *Banisteriopsis caapi*. *P. viridis* contiene indolalcaloides que provocan efectos alucinógenos y psicoactivos, fundamentalmente a través del receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} [11, 12]. El principal compuesto con estas propiedades encontrado en la ayahuasca comparte la estructura química de la triptamina y posee dos grupos metilo adicionales unidos al grupo amino.

En estudios recientes se ha visto, tanto en animales como en humanos, que la ayahuasca tiene efectos terapéuticos positivos sobre desórdenes mentales como depresión, traumas, trastornos de alimentación, de la personalidad, y de abuso de sustancias, entre otros [11]. Por esta razón los derivados químicos de la triptamina podrían jugar un papel importante en el tratamiento de patologías neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica. Todas ellas tienen en común el daño neurológico debido a la formación y acumulación de proteínas mal plegadas.

La actuación de algunos derivados triptamínicos como agonistas del receptor Sigma-1 (S1R), localizado en la membrana del retículo endoplasmático asociada a mitocondrias (MAM), podría regular la homeostasis proteica, potenciar la respuesta al estrés oxidativo y reprimir la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplasmático, aumentando, en última instancia, la supervivencia celular [13, 14]. Por otro lado, se ha visto que la vía de señalización PI3K/AKT activada a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como son los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, estimulan la neuroprotección en neuronas dopaminérgicas [15, 16]. Por ello, compuestos derivados de la estructura química de la triptamina también podrían actuar como agonistas de estos receptores y ejercer un efecto terapéutico similar al que se produce a través de S1R.

En las últimas décadas se ha desarrollado una gran variedad de derivados de la triptamina que han sido empleados habitualmente como drogas recreativas por sus efectos alucinógenos, pero poco a poco han despertado un mayor interés por su posible aplicación clínica. Sin embargo, queda mucho por saber acerca de su toxicidad, de su mecanismo de acción o de sus potenciales efectos terapéuticos sobre ciertos trastornos mentales y enfermedades neurodegenerativas [17].

Este trabajo puede suponer un avance en la caracterización de las propiedades terapéuticas de estos derivados triptamínicos sobre un modelo *in vitro* de EP. En este caso, se emplearán 4 compuestos con los siguientes sustituyentes en la estructura base de la triptamina: dos grupos etilo unidos al grupo amino (derivado 1); dos grupos propilo unidos al grupo amino (derivado 2); dos grupos isopropilo unidos por el carbono secundario al grupo amino (derivado 3), y dos grupos metilo unidos al grupo amino y un grupo metoxilo unido al carbono 5 del anillo indólico (derivado 4).

Por todo lo mencionado, planteamos como hipótesis de trabajo que el tratamiento con derivados de la triptamina podría tener efectos neuroprotectores y antiinflamatorios en un modelo *in vitro* de enfermedad de Parkinson. El objetivo de este estudio es analizar *in vitro* el potencial efecto terapéutico de estos cuatro derivados, sobre la supervivencia celular en una línea establecida de neuronas dopaminérgicas humanas, y sobre la reducción de la respuesta inflamatoria en dichas neuronas, además de en cultivos primarios de astroglía y microglía. Asimismo, se pretende determinar a través de qué receptores celulares ejercerían tal efecto neuroprotector y antiinflamatorio, empleando, para ello, antagonistas de los receptores que unen estos derivados.

Materiales y métodos

Cultivos celulares.

Se utilizó la línea neuronal dopaminérgica SH-SY5Y, procedente de neuroblastoma humano. Las células se propagaron y mantuvieron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), L-glutamina (10 mM) y gentamicina (40 µg/mL, Genta-Gobens), en un incubador (Thermo Scientific) a 37°C, con humedad (90%) y CO₂ (5%). Se realizaron pases cada 3-4 días, dependiendo del estado de confluencia.

Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos y microglía, extraídos a partir del córtex del cerebro de ratas Wistar adultas, que fueron sembrados en frascos de cultivo celular, tratados previamente con poli-D-lisina (20 µg/mL). Se mantuvieron durante una semana en medio DMEM suplementado con suero de cabra (10%), suero de caballo (10%) y penicilina-estreptomina (1%, Invitrogen). El medio fue renovado en caso de observar cambio en la coloración del medio. Tras siete días los cultivos se agitaron a 230 rpm durante 3-4h y se recogió el sobrenadante con las células de microglía en suspensión. Las células astrogiales y oligodendrocitos, adheridas a los frascos de cultivo, se llevaron a agitación a 260 rpm durante 18h aproximadamente. Los oligodendrocitos quedan en suspensión en el sobrenadante, mientras que los astrocitos permanecen adheridos. Para aislar las células astrogiales, los cultivos fueron tratados con tripsina durante 5 minutos a 37°C. Los cultivos primarios de microglía y astrogía se sembraron en placas de 24 pocillos con cristales tratados con poli-D-lisina (20 µg/mL), y se mantuvieron en medio DMEM y Ham's F12 en una proporción 1:1, suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), L-glutamina (10 mM), gentamicina (40 µg/mL, Genta-Gobens).

Tratamientos.

Las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3 x 10⁴ células/pocillo y se mantuvieron en condiciones estándar hasta alcanzar confluencia. Antes de los tratamientos se cambió el medio por medio RPMI suplementado con FBS (3%), L-glutamina (10 mM) y gentamicina (40 µg/mL, Genta-Goblin). A continuación, se trataron los cultivos de manera independiente con cada uno de los antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} (ritanserina) [18] y 5HT_{1R} (BD1063) [19], a una concentración de 1 µM. Tras 1h de incubación se trataron los cultivos con los 4 compuestos derivados de la triptamina previamente descritos, a una concentración de 1 µM. Tras otra hora de incubación, se añadió el neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (30 µM, Sigma-Aldrich), y se dejó incubando 16-18h. Los cultivos basales fueron tratados con vehículo.

Los astrocitos y la microglía se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1 x 10⁵ células/pocillo y se mantuvieron en condiciones estándar hasta estar confluentes. Ambos tipos celulares se trataron por separado con los antagonistas ritanserina y BD1063, a una concentración de 1 µM, tal y como se describió anteriormente. Pasada 1h de incubación, se trataron con los cuatro derivados (1 µM). Tras 1h de incubación, se añadió lipopolisacárido (LPS) (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) para inducir la activación de las células gliales y, por tanto, fomentar la producción de mediadores pro-inflamatorios. Tras 24h en cultivo, se recogió el sobrenadante para evaluación de los niveles de nitritos y los cristales con las células se conservaron para experimentos de inmunocitoquímica. Los cultivos basales fueron tratados con vehículo.

Ensayos de viabilidad.

La viabilidad celular se midió por ensayo MTT (Roche Diagnostic GmbH) en células SH-SY5Y tras ser tratadas. Se preparó una dilución 1:10 de MTT con medio RPMI suplementado con FBS (3%), L-glutamina (10 mM) y gentamicina (40 µg/mL, Genta-Goblin). Tras incubar las células en esa mezcla durante 1h a 37°C, con humedad (90%) y CO₂ (5%), se retiró ese medio y se añadió DMSO para disolver el MTT reducido que hubiera quedado presente. La reducción de MTT fue cuantificada por la medición de absorbancia a 595 nm. Se realizaron 5 ensayos independientes con 6 réplicas de cada tratamiento en cada uno. Los valores mostrados se expresan como la media ± desviación estándar (ds).

Medición de nitritos.

Tras el tratamiento de células SH-SY5Y antes descrito, el sobrenadante del cultivo se mezcló en igual volumen con el reactivo de Griess (Sigma-Aldrich), y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue detectada con un lector de placas a 492/540 nm. Se procedió del mismo modo con los cultivos de microglía tratados como se ha descrito previamente. Con células SH-SY5Y se realizaron 5 experimentos independientes con 6 réplicas de cada tratamiento, mientras que con microglía se realizaron 3 experimentos independientes con 6 réplicas de cada tratamiento. Los valores ofrecidos se expresan como la media ± ds.

Inmunocitoquímica.

Se realizó un análisis de fluorescencia por inmunocitoquímica para determinar qué mediadores pro-inflamatorios se producen y cuantificar si sus niveles varían con los distintos tratamientos. Para la preparación de muestras cultivos gliales para inmunocitoquímica, se siguió el protocolo descrito en otros trabajos previos [20, 21]. Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron adquiridas con un microscopio vertical de fluorescencia y contraste de fases (DIC) Nikon Eclipse 90i, equipado con una cámara digital DS-Fi1. La configuración del microscopio se ajustó para producir la mejor relación señal-ruido.

Los anticuerpos primarios que se emplearon fueron: anti-ciclooxigenasa 2 (COX-2, dilución 1/200, Cayman Chemical) hecho en conejo, y anti-factor de necrosis tumoral α (TNF α , dilución 1/200, Santa Cruz Biotechnology) hecho en cabra. La elección de analizar los niveles de estas proteínas en concreto se debe a que nos permiten hacernos una idea bastante fiable del estado inflamatorio de las células y a que existen anticuerpos primarios que reconocen adecuadamente dichas proteínas. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron desarrollados por Alexa, acoplados a un fluoróforo: anti-conejo-546 (rojo, dilución 1/400) hecho en cabra, y anti-cabra-488 (verde, dilución 1/400) hecho en caballo. Para la tinción de los núcleos se empleó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, dilución 1/500). Se obtuvieron imágenes representativas de 3 experimentos.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el test estadístico *t de Student* para la comparación de medias entre variables continuas de distribución normal, empleando para ello el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión 25.0) para Windows (Chicago, IL). Las diferencias analizadas se consideraron estadísticamente significativas con $P \leq 0.05$.

Resultados

Los derivados triptamínicos tienen un efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de enfermedad de Parkinson.

Para estudios de supervivencia celular en células de la línea SH-SY5Y es habitual emplear 6-OHDA como agente neurotóxico para inducir el daño celular por estrés oxidativo. Como consecuencia, es esperable un aumento tanto de la muerte celular como de la producción de nitritos y otros mediadores pro-inflamatorios.

Nuestros resultados prueban que los tratamientos con los cuatro derivados triptamínicos aumentaron la supervivencia celular (aproximadamente 90% y 98%) en comparación con el grupo dañado, donde la supervivencia celular disminuyó hasta un 63% (**Figura 1**). Estos resultados sugieren que los derivados triptamínicos sujetos a estudio podrían tener un potente efecto neuroprotector.

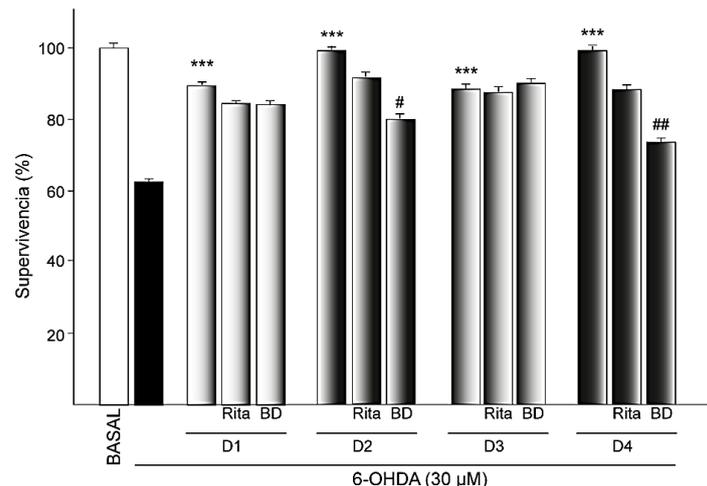


Figura 1. Efecto neuroprotector de los derivados triptamínicos en cultivos de SH-SY5Y. Ensayo de viabilidad por MTT. Las células SH-SY5Y fueron expuestas a 6-OHDA (30 µM) durante 16-18 h en presencia o ausencia de cada uno de los derivados triptamínicos (D1, D2, D3, D4) (1 µM), y en presencia o ausencia del antagonista ritanserina (Rita, 1 µM) o BD1063 (BD, 1 µM). *** $P \leq 0.001$ en comparación con las células tratadas con 6-OHDA; # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, en comparación con las células tratadas con el correspondiente derivado triptamínico sin antagonistas.

Con el fin de determinar a través de que receptor podrían estar actuando dichos compuestos, procedimos a tratar los cultivos celulares con dos antagonistas de los receptores típicos a través de los cuales suelen actuar dichos compuestos.

Los resultados mostrados en la **Figura 1** demuestran que al administrar el derivado 1 con ritanserina o con BD1063, la proporción de células viables disminuía desde un 89% hasta un 84%. Al administrar el derivado 2 no se observó una variación muy destacable en la viabilidad celular cuando se trataba junto con ritanserina, disminuyendo hasta un 92%, pero sí con BD1063 con el que la supervivencia disminuyó desde un 98% a un 80%. Con el derivado 3 se observó que la viabilidad apenas variaba de un 87% al administrarlo junto con ritanserina o BD1063. Por último, el tratamiento con el derivado 4 y ritanserina tuvo un ligero efecto sobre la reducción de la supervivencia respecto al tratamiento sin antagonistas, disminuyendo desde un 98% hasta un 87%. Sin embargo, el tratamiento junto con BD1063 dio un resultado altamente significativo ($P \leq 0.01$, respecto al tratamiento con el derivado 4 sin antagonistas), ya que la viabilidad disminuyó hasta un 74%. Estos resultados parecen indicar que los derivados 1 y no estarían actuando a través de los receptores estudiados. Por el contrario, los derivados 2 y 4 podrían estar realizando su acción neuroprotectora a través del receptor 5HT_{1A}.

Los derivados triptamínicos reducen *in vitro* el estado inflamatorio inducido por 6-OHDA en cultivos neuronales dopaminérgicos.

Las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo EP, se caracterizan por la presencia de un fuerte componente neuroinflamatorio que contribuye en gran medida al desarrollo de la enfermedad. Por esta razón, nuestro siguiente objetivo fue determinar si los derivados triptamínicos también tenían efecto antiinflamatorio.

Las neuronas SH-SY5Y tienen cierta capacidad para liberar factores pro-inflamatorios, por lo que procedimos a determinar la producción de nitritos en cultivos dañados con 6-OHDA. Nuestros resultados indican una reducción notable de los niveles de nitritos liberados al medio tras tratar con los diferentes derivados de la triptamina (**Figura 2**). La concentración de nitritos liberados al medio aumentó desde los niveles basales (6 μM) hasta 15,5 μM en el grupo dañado. En todos los tratamientos en los que no se emplearon antagonistas, se alcanzaron niveles de nitritos significativamente menores a los observados en los basales ($P \leq 0.001$, respecto a las células tratadas con 6-OHDA), en torno a 8 μM .

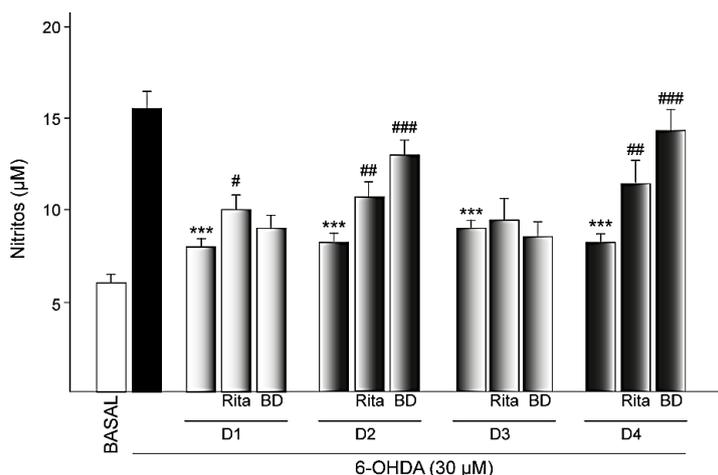


Figura 2. Efecto antiinflamatorio de los derivados triptamínicos en cultivos de SH-SY5Y. Evaluación de los niveles de nitritos producidos (ensayo de Griess). Las células SH-SY5Y fueron expuestas a 6-OHDA (30 μM) durante 16-18 h en presencia o ausencia de cada uno de los derivados triptamínicos (D1, D2, D3, D4) (1 μM), y en presencia o ausencia del antagonista ritanserina (Rita, 1 μM) o BD1063 (BD, 1 μM). *** $P \leq 0.001$ en comparación con las células tratadas con 6-OHDA; # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$ en comparación con las células tratadas con el correspondiente derivado triptamínico sin antagonistas.

Atendiendo a los resultados de los tratamientos con antagonistas de receptores serotoninérgicos y de 5HT_{1A} (**Figura 2**), se pudo ver que, en el caso del derivado 1, la administración conjunta con ritanserina generó un ligero aumento de la concentración de nitritos en el medio, mientras que la administración con BD1063 no produjo ninguna variación sobre los niveles de nitritos. En cuanto al derivado 2, se pudo ver que la administración, tanto con ritanserina como con BD1063, provocaba un aumento significativo de los niveles de nitritos ($P \leq 0.01$ y $P \leq 0.001$ respectivamente, en comparación con el tratamiento con el derivado 2 sin antagonistas). Respecto al derivado 3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos sin y con antagonistas. Por último, la administración del derivado 4 con ritanserina provocó también un aumento significativo de los niveles de nitritos ($P \leq 0.01$, respecto al tratamiento sin antagonistas), hasta alcanzar una concentración de 11 μM . Sin embargo, la inhibición del efecto antiinflamatorio en el tratamiento con el derivado 4 y BD1063 fue mayor ($P \leq 0.001$, en comparación con el tratamiento sin antagonistas), alcanzándose los niveles de nitritos de 14 μM . Estos datos parecen indicar que los cuatro derivados utilizados ejercen un importante papel antiinflamatorio en

nuestro modelo *in vitro* de EP. Dicha acción en el caso de los derivados 2 y 4 podría estar mediada a través del 5-HT_{2A} y, en parte, también a través del receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}.

Efecto antiinflamatorio de los derivados triptamínicos en cultivos primarios gliales estimulados con lipopolisacárido bacteriano.

La activación de las células gliales, astroglia y microglía, estimula la producción de mediadores pro-inflamatorios en la SNpc de pacientes de EP, lo que conlleva a un proceso neuroinflamatorio que favorece el desarrollo de la enfermedad [8, 22]. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el papel de los derivados triptamínicos en procesos inflamatorios en cultivos primarios gliales de rata, y en concreto en la producción de nitritos y TNF α y COX-2, dos conocidos factores pro-inflamatorios.

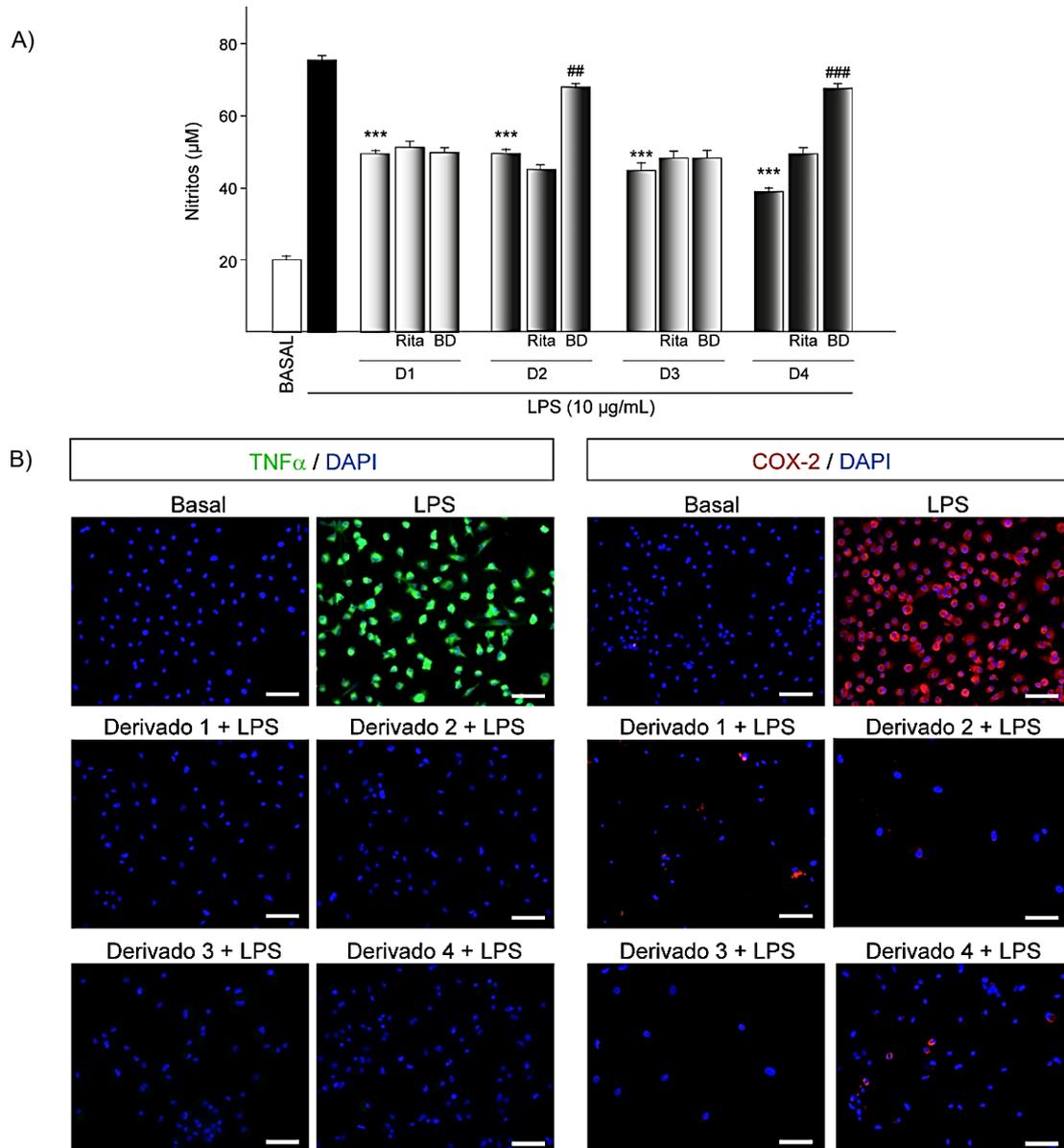


Figura 3. Efecto antiinflamatorio de los derivados triptamínicos en cultivos primarios de microglía. La microglía fue activada con LPS (10 µg/mL) durante 16-18 h en presencia o ausencia de cada uno de los derivados triptamínicos (D1, D2, D3, D4) (1 µM), y en presencia o ausencia del antagonista ritanserina (Rita, 1 µM) o BD1063 (BD, 1 µM). **(A)** Evaluación de los niveles de nitritos producidos (ensayo de Griess). *** P ≤ 0.001 en comparación con las células activadas con LPS; ## P ≤ 0.01, ### P ≤ 0.001 en comparación con las células tratadas con el correspondiente derivado triptamínico sin antagonistas. **(B)** Análisis inmunocitoquímico de los niveles de TNF α (verde) y COX-2 (rojo) producidos. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 µm.

Los resultados de los ensayos de Griess en cultivos primarios de microglía muestran que todos los derivados triptamínicos desempeñaron un potente papel antiinflamatorio, disminuyendo los niveles de nitritos de 75 µM, observado en microglía activada con LPS, hasta 50 µM con el tratamiento con los derivados 1 y 2, 45 µM con el derivado 3 y 40 µM con el derivado 4 (**Figura 3A**). No se observaron diferencias notables en los tratamientos con antagonistas, excepto con los derivados 2 y 4, en los que se vio un aumento de la concentración de nitritos hasta alcanzarse 66 µM al tratar con BD1063.

Nuestro siguiente paso fue estudiar la producción de factores pro-inflamatorios en cultivos microgliales primarios mediante técnicas de inmunocitoquímica. Los resultados recogidos en la **Figura 3B** demuestran que el tratamiento con derivados triptamínicos induce una clara disminución de los niveles de TNF α respecto a lo observado en los cultivos estimulados con LPS, hasta alcanzarse unos niveles similares o, incluso, menores a los observados en la condición basal. El análisis de la producción de COX-2 en cultivos microgliales hiperactivos con LPS reflejó una drástica disminución de los niveles de este agente pro-inflamatorio. En conjunto todos estos datos indican que los derivados triptamínicos tienen un efecto antiinflamatorio en cultivos de microglía activada con LPS. En el caso de los compuestos 2 y 4 dicha acción podría estar mediada por el S1R.

Una vez estudiados los efectos de los compuestos en cultivos microgliales, procedimos a ampliar el estudio en cultivos de astrogliá. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de los astrocitos estimulados con LPS muestran que todos los tratamientos con los derivados triptamínicos provocaron una importante reducción de los niveles de TNF α y COX-2 hasta alcanzar un estado similar al observado en los cultivos basales (**Figura 4**). Estos datos sugieren que dichos compuestos estarían actuando como antiinflamatorios en cultivos de células astrogliales.

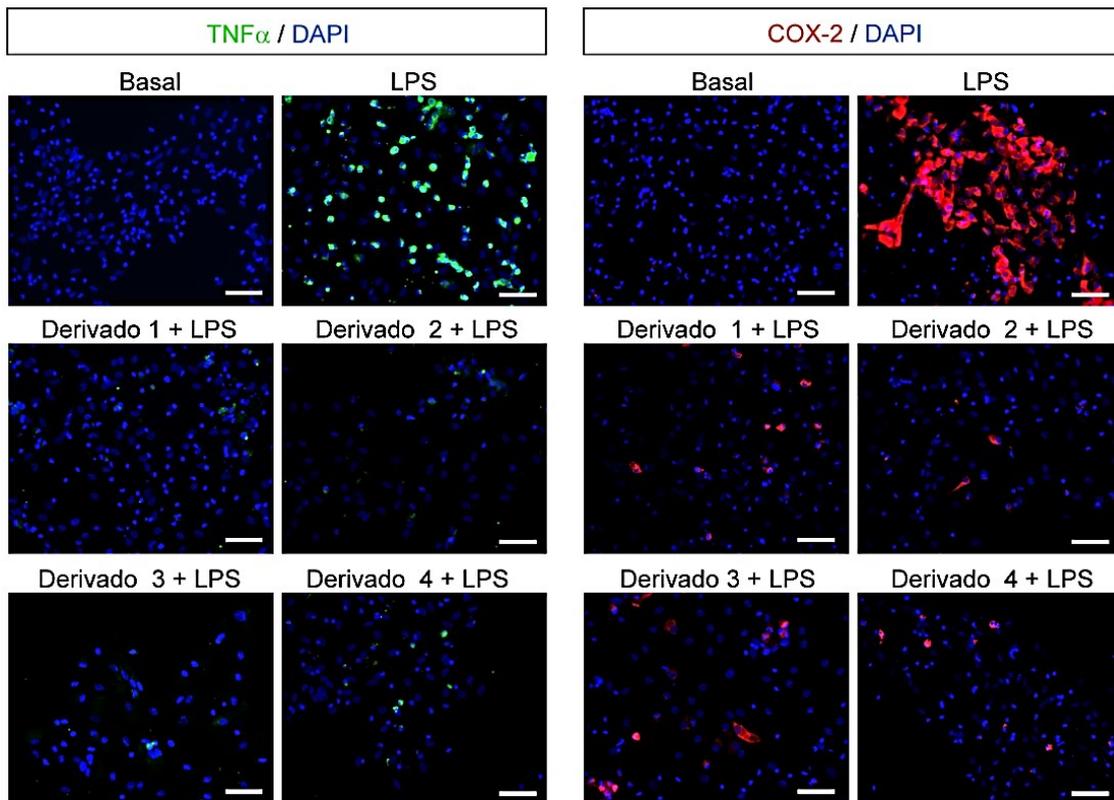


Figura 4. Efecto antiinflamatorio de los derivados triptamínicos en cultivos primarios de astrocitos. Análisis inmunocitoquímico de los niveles de TNF α (verde) y COX-2 (rojo) producidos. Los astrocitos fueron activados con LPS (10 μ g/mL) durante 16-18 h en presencia o ausencia de cada uno de los derivados triptamínicos (D1, D2, D3, D4) (1 μ M). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50 μ m.

Discusión

El abordaje clínico de las enfermedades neurodegenerativas supone un reto, no sólo por la escasa información que existe sobre su fisiopatología, sino también por la falta de tratamientos efectivos que permitan frenar o detener la progresión de las mismas. Otra de las principales dificultades que presenta el desarrollo de una terapia eficaz contra la EP, en este caso, es que no existen modelos *in vitro* o *in vivo* que reproduzcan a la perfección todas las características de esta enfermedad.

Una técnica que se emplea para inducir modelos de EP es administrar neurotoxinas que dañen de forma selectiva neuronas dopaminérgicas, como pueden ser la 6-OHDA o la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). En este estudio se ha empleado la 6-OHDA para inducir el modelo *in vitro*, ya que en otros trabajos se ha probado que este compuesto ejerce su efecto neurotóxico provocando la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial [23] y la formación y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que conducen a la oxidación de componentes celulares [24].

También cabe mencionar que en el presente trabajo se decidió evaluar el posible efecto antiinflamatorio de estos derivados triptamínicos, no sólo en neuronas dopaminérgicas, las cuales degeneran en EP, sino también sobre microglía y astrogliá, ya que se ha descrito ampliamente que la glía colindante en la SNpc

está estrechamente relacionada con el desarrollo del Parkinson. La microglía es la que contribuye de forma más notable al estado de neuroinflamación característico en la EP, aunque se ha visto que la astrogliá también puede regular la inflamación secretando citoquinas pro y antiinflamatorias. Los oligodendrocitos no contribuyen al estado inflamatorio, pero sí que son sensibles al daño debido al estado de inflamación crónico que se da en EP, al igual que las neuronas de la SNpc [8, 25].

El presente estudio demuestra que los derivados de la triptamina analizados protegen contra el estrés oxidativo inducido por 6-OHDA en neuronas dopaminérgicas SH-SY5Y, mejorando la viabilidad de las mismas hasta alrededor de un 88% con los derivados 1 y 3, y de un 98% con los derivados 2 y 4 (**Figura 1**). Analizando los resultados de los tratamientos con antagonistas, se deduce que los derivados 2 y 4 ejercen el efecto neuroprotector a través del receptor S1R. No obstante, los ensayos de viabilidad realizados no confirman a través de qué receptores actúan los derivados 1 y 3 para ejercer tal efecto, ni tampoco si tanto estos como los derivados 2 y 4 podrían estar actuando a través de otros receptores.

También hemos probado que estos derivados de la triptamina ejercen un efecto antiinflamatorio sobre cultivos de neuronas SH-SY5Y, ya que todos ellos reducen los niveles de nitritos producidos, desde 15,5 μM (grupo dañado) hasta 8-9 μM con los diferentes tratamientos (**Figura 2**). Al igual que la neuroprotección, el efecto antiinflamatorio parece darse a través de los receptores S1R, en el caso de los derivados 2 y 4. Sin embargo, el receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} también podría contribuir, en menor medida, a la reducción de la producción de nitritos, generándose un efecto sinérgico entre los receptores 5-HT_{2A} y S1R. En relación a los derivados 1 y 3, los resultados del ensayo Griess muestran que, a pesar de que estos derivados triptamínicos también ejercen un efecto antiinflamatorio en células SH-SY5Y, la reducción de la producción de nitritos no parece deberse a la activación del receptor 5-HT_{2A} o del S1R. Sólo se ha observado una leve contribución del receptor 5-HT_{2A} a la reducción de la inflamación con el compuesto 1, por lo que es probable que haya otros receptores celulares implicados. En futuros trabajos habría que considerar la idea de probar otros antagonistas específicos distintos, con el fin de determinar a través de qué receptores podrían ejercer su efecto estos dos derivados. También habría que descartar la posibilidad de que estos cuatro derivados puedan actuar a través de otros receptores no analizados en el presente estudio.

El efecto antiinflamatorio de estos derivados también parece darse de forma efectiva sobre cultivos primarios gliales, tal y como sugieren los resultados de los ensayos de Griess e inmunocitoquímicos (**Figuras 3 y 4**). En los ensayos Griess pudo verse que todos los derivados desempeñaban un papel antiinflamatorio al tratar cultivos primarios de microglía, disminuyendo un tercio o más la concentración de nitritos. Mediante los tratamientos con antagonistas sólo se pudo confirmar que los derivados 2 y 4 ejercen dicho efecto antiinflamatorio a través del receptor S1R (**Figura 3A**). Por cuestiones metodológicas y de tiempo, no se pudieron medir los niveles de nitritos en cultivos primarios de astrocitos, pero en futuros estudios habría que analizar también el efecto antiinflamatorio de estos derivados triptamínicos y tratar de identificar a través de qué receptor actúan en astrogliá mediante ensayos de Griess.

En las muestras para inmunocitoquímica de microglía tratada con los distintos derivados triptamínicos, la intensidad de fluorescencia correspondiente a los niveles de TNF α y COX-2 disminuía prácticamente hasta los niveles observados en la condición basal (**Figura 3B**). Algo similar se pudo ver en las muestras de inmunocitoquímica de astrogliá, donde todos los derivados parecieron ser efectivos reduciendo los niveles de TNF α y COX-2 (**Figura 4**). Además, la intensidad de fluorescencia observada en las muestras tratadas sólo con LPS fue mayor en microglía que en astrogliá. Esto refuerza el hecho de que la microglía tiene un papel principal en el estado de inflamación crónica de la EP, mientras que la astrogliá también contribuye, aunque no de forma tan notable, al aumento de la inflamación [8, 25].

Por todos los resultados obtenidos, parece que el receptor S1R podría estar mediando procesos de neuroprotección y antiinflamación tanto en neuronas dopaminérgicas como en microglía y astrogliá. En otros trabajos se ha visto que otro agonista de S1R, PRE-084, ejerce estos mismos efectos en un modelo *in vivo* de Parkinson y, además, parece tener efectos neuroregenerativos, ya que se vio un aumento de la densidad de fibras nerviosas en las zonas dañadas del cerebro por 6-OHDA [26]. Parece ser que estos procesos se desencadenaron a través de este receptor mediante la inducción de la expresión de factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), en células del cuerpo estriado y de la SNpc.

Para poder continuar con esta investigación en un futuro, sería apropiado analizar más en detalle a través de qué receptores celulares estarían realizando la función neuroprotectora y antiinflamatoria los derivados 1 y 3. De cualquier modo, también existe la posibilidad de que los derivados 2 y 4 puedan estar actuando a través de otros receptores distintos a S1R. Además, de ser así, podría darse el caso de que se estuviera dando un efecto sinérgico entre los receptores en cuestión. Por tanto, en futuros estudios será necesario realizar un cribado de otros posibles receptores de estos derivados triptamínicos, empleando para ello diferentes antagonistas (WAY 100635, GR 127935, SB 269970...) [18], y descartar la posibilidad de que pudieran actuar a través de otros receptores no analizados en el presente estudio. Asimismo, también se

podrían realizar otros experimentos para completar el estudio del papel terapéutico de estos derivados triptamínicos *in vitro* sobre células SH-SY5Y, como un ensayo de citotoxicidad mediante la medición de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) [21]. Una vez determinado el efecto neuroprotector y antiinflamatorio de estos compuestos y analizados los receptores a través de los cuales realizan su acción, sería indispensable, antes de continuar con los estudios *in vivo*, realizar experimentos destinados a conocer si estos derivados triptamínicos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica [27].

Para los estudios *in vivo*, sería conveniente emplear dos modelos murinos de EP distintos: un modelo agudo de la enfermedad, para ver de una forma sencilla y rápida (2-3 días) cómo actuaría el derivado triptamínico en ratones [28], y un modelo crónico, que reproduce mejor el estado de neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas con el cual se les diagnostica EP a los pacientes [29-31]. Para realmente verificar el posible efecto terapéutico de los compuestos estudiados sería necesario realizar estudios de comportamiento y ensayos de inmunohistoquímica, para evaluar los efectos neuroprotectores de cada derivado triptamínico, y ensayos de *Western blot* y RT-PCR para identificar los mecanismos por los cuales se da esta neuroprotección: antioxidación, antiapoptosis, etc. [32].

Conclusiones

Los derivados triptamínicos analizados resultan ser potentes neuroprotectores y antiinflamatorios en cultivos *in vitro* de neuronas dopaminérgicas, y tienen un papel antiinflamatorio en cultivos primarios de microglía y astrogliá. Además, se ha visto que los derivados 2 y 4 ejercen el efecto neuroprotector y antiinflamatorio a través del receptor intracelular S1R, pero no se ha podido identificar a través de cuáles actúan los otros dos derivados, o si estos podrían estar actuando también a través de otros receptores no analizados. Por tanto, será necesario continuar realizando experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para proporcionar más datos que demuestren el efecto terapéutico de dichos derivados triptamínicos y confirmen a través de qué receptores inducirían tales efectos en modelos de EP.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a José Á. Morales y Ana Pérez por la oportunidad que me brindaron para poder realizar este TFM con ellos y la ayuda que me han proporcionado para llevarlo a buen término. También quiero agradecer, tanto a ellos como al resto de miembros del grupo dirigido por Ana Pérez en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”: Marina, Ana, Jesús, Dani, Alex, David y Michiel, la ayuda, los conocimientos y los buenos momentos que me han regalado durante mi estancia.

Referencias

- Schapira, A. H. V. 2009. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30(1):41-7.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. 2014. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 29(13):1583-90.
- Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., y Pringsheim, T. 2016. The incidence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*. 46(4):292-300.
- Lang, A. E., y Lozano, A. M. 1998. Parkinson's disease. first of two parts. *The New England Journal of Medicine*. 339(15):1044-53.
- Moustafa, A. A., Chakravarthy, S., Phillips, J. R., Gupta, A., Keri, S., Polner, B., Frank, M. J., y Jahanshahi, M. 2016. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 68:727-40.
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H. V., y National Institute for Clinical Excellence. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *The Lancet Neurology*. 5(3):235-45.
- Michel, P., Hirsch, E., y Hunot, S. 2016. Understanding dopaminergic cell death pathways in parkinson disease. *Neuron*. 90(4):675-91.
- Pal, R., Tiwari, P.C., Nath, R. y Pant, K.K. 2016. Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurological Research*. 38(12):1111-22.
- Pahwa, R., y Lyons, K. E. 2009. Levodopa-related wearing-off in Parkinson's disease: Identification and management. *Current Medical Research and Opinion*. 25(4):841-9.
- Morales-Garcia, J. A., Alonso-Gil, S., Gil, C., Martinez, A., Santos, A., y Perez-Castillo, A. 2015. Phosphodiesterase 7 inhibition induces dopaminergic neurogenesis in hemiparkinsonian rats: PDE7 inhibition brings dopaminergic neurogenesis. *STEM CELLS Translational Medicine*. 4(6):564-75.

11. Domínguez-Clavé, E., Soler, J., Elices, M., Pascual, J. C., Álvarez, E., de la Fuente Revenga, M., Friedlander, P., Feilding, A., y Riba, J. 2016. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Research Bulletin*. 126(1):89-101.
12. McKenna, D. y Riba, J. 2018. New World Tryptamine Hallucinogens and the Neuroscience of Ayahuasca. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 36:283-311.
13. Penke, B., Fulop, L., Szűcs, M., y Frecska, E. 2018. The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*. 16(1):97-116.
14. Frecska, E., Bokor, P., y Winkelman, M. 2016. The Therapeutic Potentials of Ayahuasca: Possible Effects against Various Diseases of Civilization. *Frontiers in Pharmacology*. 7(35):1-17.
15. Miyazaki, I., y Asanuma, M. 2016. Serotonin 1A receptors on astrocytes as a potential target for the treatment of Parkinson's disease. *Current Medicinal Chemistry*. 23(7):686-700.
16. Nakano, N., Matsuda, S., Ichimura, M., Minami, A., Ogino, M., Murai, T., y Kitagishi, Y. 2017. PI3K/AKT signaling mediated by G protein-coupled receptors is involved in neurodegenerative Parkinson's disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 39:253-60.
17. Araújo, A. M., Carvalho, F., Bastos, M. L., Guedes de Pinho, P., y Carvalho, M. 2015. The hallucinogenic world of tryptamines: An updated review. *Archives of Toxicology*. 89(8):1151-73.
18. Parga Martín, J. A. 2008. Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre neurales mesencefálicas. Nuevas contribuciones al desarrollo de terapia celular para la enfermedad de Parkinson (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
19. Chu, U. B. y Ruoho, A. E. 2016. Biochemical pharmacology of the Sigma-1 receptor. *Molecular Pharmacology*. 89(1):142-153.
20. Morales-García, J. A., Redondo, M., Alonso-Gil, S., Gil, C., Perez, C., Martínez, A., Santos, A., y Perez-Castillo, A. 2011. Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *PLoS One*. 6(2):e17240.
21. Morales-García, J. A. 2011. Identificación y análisis de nuevas dianas celulares con efecto neurogénico y neuroprotector (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
22. Heneka, M. T., Kummer, M. P., y Latz, E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Immunology*. 14(7):463-77.
23. Glinka, Y., Tipton, K. F., y Youdim, M. B. 1996. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry*. 66(5):2004-10.
24. Hwang, O. 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*. 22(1):11-7.
25. McGeer, P. L. y McGeer, E. G. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 23(4):474-83.
26. Francardo, V., Bez, F., Wieloch, T., Nissbrandt, H., Ruscher, K., y Cenci, M. A. 2014. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain: A Journal of Neurology*. 137(7):1998-2014.
27. Pérez, D. I., Pistozzi, M., Palomo, V., Redondo, M., Fortugno, C., Gil, C., Felix, G., Martínez, A., y Bertucci, C. (2012). 5-imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: Determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 45(5):677-84.
28. Blesa, J., y Przedborski, S. 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8(155):1-12.
29. Morales-García, J. A., Aguilar-Morante, D., Hernández-Encinas, E., Alonso-Gil, S., Gil, C., Martínez, A., Santos, A., y Perez-Castillo, A. 2015. Silencing phosphodiesterase 7B gene by lentiviral-shRNA interference attenuates neurodegeneration and motor deficits in hemiparkinsonian mice. *Neurobiology of Aging*. 36(2):1160-73.
30. Morales-García, J. A., Gine, E., Hernández-Encinas, E., Aguilar-Morante, D., Sierra-Magro, A., Sanz-SanCristobal, M., Alonso-Gil, S., Sánchez-Lanzas, R., Castaño, J. G., Santos, A., y Perez-Castillo, A. 2017. CCAAT/Enhancer binding protein β silencing mitigates glial activation and neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*. 7(1):13526.
31. Blandini, F., Armentero, M., y Martignoni, E. 2008. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related Disorders*. 14(S2):124-9.
32. Wang, X.-S., Zhang, Z.-R., Zhang, M.-M., Sun, M.-X., Wang, W.-W., y Xie, C.-L. 2017. Neuroprotective properties of curcumin in toxin-based animal models of Parkinson's disease: a systematic experiment literatures review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(412):1-10.