

EVALUACIÓN DE ANÁLOGOS DE NICOTINA EN UN CONTEXTO APROXIMADO A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Juan Camilo Jurado-Coronel¹, George E. Barreto¹, Janneth González¹

¹ Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Correo electrónico del primer autor: j.jurado@javeriana.edu.co

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa caracterizada por temblor de reposo, rigidez y bradicinesia, en la cual hay pérdida de neuronas productoras de dopamina en la pars compacta de la sustancia negra en el sistema nervioso central, conllevando a depleción de dopamina en el cuerpo estriado. Juegan un papel clave fenómenos como el estrés oxidativo, o una alteración en los sistemas que protegen a la célula contra la oxidación. Estudios epidemiológicos han demostrado que dentro del grupo de personas fumadoras existe una menor incidencia de EP. La nicotina es un compuesto químico presente en el cigarrillo, con capacidad de brindar efectos benéficos a personas afectadas por EP, pero debido a su toxicidad difícilmente puede ser usada como agente terapéutico. Es por eso que diversos estudios han sugerido el uso de análogos de la nicotina que puedan ejercer los mismos beneficios pero que carezcan de toxicidad.

El objetivo de este estudio fue establecer el efecto neuroprotector y similar al de la nicotina que puedan tener dos análogos de esta sustancia: 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol; y (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo experimental de EP. Para alcanzar el objetivo se trabajó en un modelo in vitro de EP con la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano, tratada con rotenona que genera estrés oxidativo y muerte neuronal. Se investigó el efecto de los análogos de nicotina y la rotenona sobre la viabilidad celular mediante el ensayo con MTT, y sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), evaluada con citometría de flujo con hidroetidina (DHE) y diclorofluoresceína diacetato (DCFDA). Se halló que el pre-tratamiento con 10 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima mejoraba la viabilidad celular y disminuía la producción de ROS en células expuestas a la IC50 de rotenona.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología relativamente común del sistema nervioso central (SNC), cuya etiología está caracterizada por una degeneración selectiva y progresiva de neuronas dopaminérgicas, y presencia de cuerpos de Lewy en la pars compacta de la sustancia negra, lo cual produce depleción de dopamina en el cuerpo estriado (Kim et al. 2009). Sujetos con esta enfermedad padecen de temblores, lentitud en sus movimientos, inestabilidad de la marcha, y rigidez. Estos pacientes pueden además presentar discapacidad funcional, calidad de vida reducida, y un rápido deterioro cognitivo. La prevalencia de esta patología se encuentra en un rango de entre 107 a 187 afectados por cada 100.000 habitantes (Xiong et al. 2011).

La rotenona es un pesticida que en modelos animales induce síntomas asociados a EP, y que se ha sugerido incrementa el riesgo de padecer EP en humanos (Chung et al. 2007). Este compuesto es un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria que causa degeneración de neuronas dopaminérgicas y disfunción motora relacionada con EP. La neurotoxicidad de la rotenona se podría deber a su habilidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kim et al. 2009). Se trata de una cetona de origen natural derivada de las raíces de especies de plantas leguminosas tropicales, que cruza rápidamente las membranas celulares (incluyendo a la barrera hematoencefálica) sin la ayuda de transportadores (Schober 2004).

Para simular con rotenona las condiciones de la EP en un modelo in vitro, se hizo uso de la línea celular derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Dado que la nicotina posee la capacidad de ejercer neuroprotección y evitar la apoptosis, se esperó que los tratamientos con análogos de esta sustancia en células SH-SY5Y sometidas a insultos con rotenona también pudieran lograr este efecto neuroprotector. Los análogos de nicotina utilizados fueron (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima, y 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol. Estos compuestos fueron sintetizados y obsequiados por el Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se esperó que los análogos de nicotina ejercieran su efecto a través de la unión a receptores nicotínicos de Acetilcolina (nAChR) presentes en las células SH-SY5Y. Los nAChR son canales iónicos activados por ligando formados por combinaciones de subunidades α y β , o que se pueden presentar como homopentámeros como en el caso de los receptores $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ (Liu et al. 2013). Estos receptores han sido identificados como prometedores blancos para el tratamiento de EP (Yuan & Petukhov 2006). El desarrollo de agonistas selectivos por receptores nicotínicos

implicados en la vía de señalización de la dopamina y en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas es por tanto de gran importancia, ya que podrían convertirse en potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento contra la EP.

Para el desarrollo de los ensayos biológicos se usó la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano. Se realizaron ensayos de viabilidad celular con los análogos de nicotina, para descartar toxicidad, hallándose que solo a concentraciones de 100 μM eran capaces de disminuir la viabilidad. Seguidamente se investigó el tiempo y la concentración de rotenona que producían apoptosis en el 50% de las células tratadas (IC_{50}), con el fin de usar estas condiciones para investigar otros parámetros. La IC_{50} de rotenona encontrada fue de 70 μM .

Con los análogos de nicotina se realizaron ensayos de pre-tratamiento, co-tratamiento y post-tratamiento con respecto a la rotenona, con el fin de establecer si eran capaces de ejercer efectos neuroprotectores. Mediante la prueba de viabilidad celular con MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromuro) se encontró que (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima a concentraciones de 1 y 10 μM eran capaces de proteger y mejorar la viabilidad celular. Estos resultados se confirmaron mediante citometría de flujo utilizando ioduro de propidio según las recomendaciones del fabricante. Para los ensayos de estrés oxidativo se escogió solamente la concentración de 10 μM , hallándose una disminución en la producción de aniones superóxido (prueba con hidroetidina (DHE)) y de peróxido de hidrógeno (prueba con diclorofluoresceína diacetato (DCFDA)) en células pre-tratadas con esta concentración del análogo de nicotina, en comparación con aquellas sin pre-tratamiento.

Los ensayos se realizaron según diseños por triplicado. Para determinar los efectos de los diferentes factores considerados se hicieron comparaciones múltiples utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y post-hoc Tukey y Dunnett, y se compararon tratamientos entre sí mediante la prueba t de Student. Los resultados con un valor de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

En este trabajo se examinaron entonces los posibles efectos neuroprotectores de análogos de nicotina en células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y tratadas con rotenona, un modelo celular de EP comúnmente usado. Esta investigación buscó establecer si análogos de la nicotina podrían ser útiles como probables agentes terapéuticos en el tratamiento de la EP, o de otras patologías en donde la disminución de la viabilidad celular y el estrés oxidativo sean parte de las causas.

Adicionalmente, se buscó establecer la funcionalidad de análogos de la nicotina que no se encuentran reportados en la literatura al ser compuestos sintetizados originalmente en la Pontificia Universidad Javeriana que anteriormente no habían sido estudiados en ensayos biológicos.

Este trabajo de investigación abordó una de las principales enfermedades neurodegenerativas: la EP. Efectos neuroprotectores que puedan ser demostrados con el tratamiento mediante análogos de nicotina en cultivos celulares, permitirán avanzar en nuevos ensayos preclínicos que puedan llegar a encontrar nuevas estrategias terapéuticas para tratar esta patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Las células de la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano (Código ATCC CRL-2266) fueron cultivadas en cajas de cultivo de 75 cm² en medio DMEM/F12 (Sigma®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y solución antibiótica-antimicótica de penicilina/estreptomicina al 1%, que contiene 10U penicilina/ 10 µg estreptomicina/ 25 ng anfotericina marca Lonza®. Fueron incubadas a 37°C con CO₂ al 5% y aire al 95% (v/v). A las células se les cambió medio cada 2 días y se hicieron subcultivos cada 7 días. Fueron sembradas en placas de 96 pocillos para la medición de muerte celular, y de 24 pocillos para las determinaciones de citometría de flujo. Estas células son adrenérgicas en fenotipo pero también expresan marcadores dopaminérgicos por lo cual han sido usadas en el estudio de la EP.

Preparación de Tratamientos y ensayos de viabilidad celular

Los análogos de nicotina 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol y (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima, fueron sintetizados y obsequiados por el laboratorio de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. Fueron diluidos en dimetil sulfóxido (DMSO) al 100% antes de diluirse en medio de cultivo sin SFB. Las concentraciones finales de los análogos de nicotina usadas para los ensayos biológicos fueron de 1, 10 y 100 µM. En el grupo control se adicionó DMSO al medio de cultivo sin SFB. Se hicieron ensayos con rotenona para determinar la IC₅₀, es decir la concentración y el tiempo en el que esta sustancia producía muerte celular en el 50% de las células. Esto con el fin de obtener una concentración y tiempo de tratamiento con rotenona para ser usados en los demás ensayos biológicos. Para este procedimiento se usó el software GraphPad Prism 5, que con la fórmula

$Y=100/(1+10^{((X-\text{LogIC}_{50}))})$ determinó la IC₅₀ a las 48 horas de tratamiento con rotenona.

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Estos ensayos se hicieron para determinar la concentración a la cual los análogos de nicotina eran tóxicos y descartar esa concentración en ensayos siguientes, y además para comprobar la IC₅₀ de la rotenona.

Se usaron tres concentraciones de ambos análogos: 1, 10 y 100 µM, disueltos en DMSO y llevados posteriormente a medio de cultivo sin suero. Se midió la viabilidad celular por medio de la prueba MTT, siendo evaluados tres tiempos: 24, 48 y 72 horas, después de la aplicación de los tratamientos.

Para establecer el tiempo y la concentración de rotenona a la que la viabilidad celular era 50% con respecto al control, se realizó un ensayo de MTT. Se usaron cuatro concentraciones de rotenona: 10, 100, 200 y 500 µM, también disueltos en medio de cultivo sin suero. Se midió la viabilidad celular por medio de la prueba MTT, siendo evaluados tres tiempos: 24, 48 y 72 horas, después de la aplicación de los tratamientos.

Pre, Co y Post-tratamientos con análogos de nicotina: Ensayos de viabilidad celular

Estos ensayos se realizaron con el fin de conocer si la administración de análogos de nicotina, previa, al tiempo, o posterior al suministro de rotenona a las células, tenía alguna incidencia sobre la toxicidad de este pesticida, o si los análogos de nicotina podían ejercer protección y disminuir la mortalidad de células tratadas con rotenona.

Las células fueron sembradas en cajas de 96 pocillos durante 36 horas, sembrándose dos cajas por cada análogo de nicotina a testear, para un total de 4 cajas. En cada pocillo se sembraron aproximadamente 20000 células, que fueron incubadas a 37°C, con 5% de saturación de CO₂ durante 36 horas, para posibilitar el crecimiento y la adherencia. Pasado este tiempo, una vez las células se pegaron a la caja y desarrollaron procesos, se retiró el medio de las cajas, que fue reemplazado por medio sin SFB.

Se dejó a las células privadas de SFB durante 12 horas, y para las pruebas de pre-tratamientos, una vez pasado este tiempo se procedió a aplicar 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol y (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima. Se usaron cuatro concentraciones de ambos análogos: 1, 10, 50 y 100 µM, disueltos en DMSO y llevados posteriormente a medio de cultivo sin suero. En otro grupo de células no se aplicó ninguna concentración de los análogos de nicotina, para así

comparar estas células con aquellas que si fueron tratadas con los análogos. Pasadas 24 horas de pre-tratamiento con los análogos de nicotina, las células fueron tratadas con la IC50 de rotenona (70 μM) durante 48 horas, después de las cuales se midió la viabilidad celular por medio de la prueba MTT. Para las pruebas de co-tratamientos, se adicionó al mismo tiempo la IC50 de rotenona y las concentraciones usadas para cada uno de los análogos de nicotina: 1, 10, 50 y 100 μM . Al igual que en las pruebas de pre-tratamientos, un grupo de células no fue tratado con los análogos de nicotina, sino que solamente se les aplicó la IC50 de rotenona. Pasadas 48 horas se midió la viabilidad celular por medio de la prueba MTT. Por último, en las pruebas de post-tratamientos, en primera instancia las células fueron tratadas con la IC50 de rotenona, dejada en los pocillos durante 48 horas, después de las cuáles se adicionaron las concentraciones de análogos de nicotina (1, 10, 50 y 100 μM) que fueron dejadas durante 24 horas, para posteriormente hacer la lectura de viabilidad celular mediante la prueba MTT. Como se hizo en los pre-tratamientos y co-tratamientos, un grupo de células no fue tratado con los análogos de nicotina, sino que solamente se les retiró el medio con rotenona pasadas las primeras 48 horas, que fue reemplazado por DMSO en medio de cultivo sin suero.

Pre-tratamientos con análogos de nicotina: Evaluación de viabilidad celular con citometría de flujo usando Ioduro de Propidio

Las células fueron sembradas en una caja de 24 pozos, sembrándose aproximadamente 100000 células en cada uno, en un volumen final de 600 μL por pozo. Las células fueron dejadas 24 horas en incubación, con el fin de facilitar su adherencia a la caja, tiempo después del cual se aplicaron los tratamientos 1, 10, 50 y 100 μM de los análogos de nicotina, y se dejaron 3 pozos como control negativo (al que después se le aplicaría rotenona) sin aplicar ningún tratamiento contándose con 3 réplicas para cada tratamiento y dejándose un control positivo con solamente medio de cultivo (3 réplicas). Después de 24 horas se procedió a aplicar la IC50 de rotenona en todos los pozos, y pasadas 48 horas de tratamiento con rotenona se realizó la prueba de viabilidad celular con Ioduro de Propidio (IP) mediante citometría de flujo. El parámetro usado para el análisis de los datos obtenidos fue la intensidad media de fluorescencia (IMF), en donde a mayor intensidad hay mayor porcentaje de células muertas, por lo cual este parámetro puede ser usado para ver diferencias en viabilidad celular entre los tratamientos. Se estableció el porcentaje de células IP positivas, en donde el IP penetra en las células que tienen un compromiso en la membrana celular pero no cruza las membranas de células viables.

Evaluación de la producción de aniones superóxido (O_2^-) por citometría de flujo

Para medir el efecto del pre-tratamiento con 10 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (condición que mostró los mejores efectos en las pruebas de viabilidad celular) sobre la producción de aniones superóxido (O_2^-) en células SH-SY5Y sometidas a la IC50 de rotenona, se realizó un análisis de citometría de flujo usando hidroetidina (DHE; Sigma) en un citómetro Guava Easy Cye™.

Dihidroetidio (DHE) o hidroeitidina es un compuesto permeable a las células, que al entrar en éstas interactúa con O_2^- para formar oxietidio (Zhao et al. 2003), que a su vez interactúa con los ácidos nucleicos para emitir un color rojo brillante detectable mediante citometría de flujo (Tarpey et al. 2004). Los datos fueron normalizados contra un control no tratado con rotenona ni con el análogo de nicotina, y el parámetro usado para el análisis de los datos obtenidos fue la intensidad media de fluorescencia (IMF), en donde a mayor intensidad hay mayor porcentaje de células teñidas con DHE, y por tanto mayor producción de superóxidos.

Evaluación de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por citometría de flujo

Para medir el efecto del pre-tratamiento con 10 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células SH-SY5Y sometidas a la IC50 de rotenona, se realizó un análisis de citometría de flujo usando Diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) en un citómetro Guava Easy Cye™.

DCFDA y sus derivados son oxidados por un rango amplio de ROS, incluyendo H_2O_2 , radicales hidroxilo ($OH^\cdot$), hidroperoxi y $ONOO^-$, produciéndose una fluorescencia roja (Uy et al. 2011). El ensayo con DCFDA se basa en un principio en el cual la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato puede ser oxidada por ROS y convertida a 2',7'-diclorofluoresceína que es fluorescente y puede ser detectada mediante citometría de flujo (Cristóvão et al. 2009). Los datos fueron normalizados contra un control no tratado con rotenona ni con el análogo de nicotina, y el parámetro usado para el análisis de los datos obtenidos fue la intensidad media de fluorescencia (IMF), en donde a mayor intensidad hay mayor porcentaje de células teñidas con DCFDA, y por tanto mayor producción de ROS, especialmente de H_2O_2 .

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el software GraphPad Prism 5. Dada una distribución normal de los datos, las diferencias entre los tratamientos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Posteriormente, si

se detectaron diferencias significativas entre los grupos, se llevó a cabo una prueba de Tukey para comparar 2 tratamientos entre sí, y una prueba de Dunnett para comparar cada uno de los tratamientos con el control. Para comparar las medias de los tratamientos y establecer el efecto de las diferentes concentraciones de los análogos de nicotina en comparación con la aplicación de rotenona por sí sola, se usó una prueba t de Student pareada. Los resultados se presentaron como las medias $\pm$ SD (Desviación estándar), asumiendo diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Ensayos de viabilidad celular con análogos de nicotina

Se estudió en primera instancia si los análogos de nicotina investigados afectaban o no la supervivencia celular de SH-SY5Y bajo condiciones de cultivo normales. La prueba de viabilidad celular con MTT indicó que las concentraciones 1 y 10 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima no afectaron la supervivencia celular en ninguno de los 3 tiempos evaluados (24, 48 y 72 h), al compararlas con el control, mientras que la concentración de 100 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima disminuyó la proliferación celular un 44.46% (Desviación Estándar = 13.09) a las 24 horas, y un 34.82% (DE = 17.67) a las 48 horas, y en la medición de 72 horas para este análogo de nicotina no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura 1 (a)). Por otra parte, ninguna de las 3 concentraciones usadas de 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol afectó la viabilidad celular a las 24 horas, mientras que la concentración de 100 μ M disminuyó éste parámetro un 40.17% (DE = 17.37) a las 48 horas. A las 72 horas no se encontró que ninguna de la concentraciones testeadas de este análogo hayan afectado la supervivencia celular, pero que la concentración de 10 μ M aumentó un 32.92% (DE = 40.72) la viabilidad celular, resultado que pudo deberse a factores alineados en los procedimientos experimentales. Los resultados de viabilidad celular con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol se muestran en la Figura 1(b). En todos los ensayos se usó un control con DMSO, sustancia en donde se disolvieron los análogos de nicotina. Este control se utilizó con el fin de comprobar que el DMSO no estuviera afectando la viabilidad celular por sí solo.

Ensayos de viabilidad celular con rotenona

Como modelo de EP en células SH-SY5Y se usó la intoxicación por rotenona. Se investigó entonces a qué concentración y en qué tiempo la rotenona producía muerte celular en el 50% de la población celular, para así usar esta concentración y tiempo en los ensayos biológicos posteriores. Para ello se llevó a cabo una prueba de viabilidad celular con MTT, la cual indicó que a las 24 horas ninguna de las concentraciones usadas disminuyó la viabilidad celular con respecto al control. A las 48 horas todas las concentraciones usadas disminuyeron la viabilidad con respecto al control, no existiendo diferencias entre las concentraciones y presentándose esa disminución así: la concentración de 10 μM disminuyó la viabilidad un 39.04% con respecto al control (DE = 43.54), la dosis de 100 μM la disminuyó un 51.29% (DE = 17.01), la de 200 μM un 70.12% (DE = 13.55), y en la concentración de 500 μM la viabilidad se vio disminuida un 49.74% con respecto al control (DE = 10.41). Por su parte, los ensayos evaluados a las 72 horas demostraron que todas las concentraciones de rotenona disminuían la viabilidad celular muy por encima del 50% con respecto al control, así: la concentración de 10 μM disminuyó la viabilidad un 79.08% con respecto al control (DE = 6.295), la dosis de 100 μM la disminuyó un 81.31% (DE = 8.68), la de 200 μM un 78.78% (DE = 14.48), y en la concentración de 500 μM la viabilidad se vio disminuida un 84.45% con respecto al control (DE = 5.074). Estos resultados indicaron que los efectos perjudiciales causados por la rotenona sobre la viabilidad de células SH-SY5Y fueron incrementándose a lo largo de las 72 horas de medición, siendo tiempo-dependientes.

Para determinar la IC₅₀ se usaron entonces solamente los resultados de viabilidad celular obtenidos en los ensayos a las 48 horas, debido a que las 24 horas no se vio toxicidad y a las 72 horas esa toxicidad hizo que la muerte celular estuviera muy por encima del 50%. Para este procedimiento se usó el software GraphPad Prism 5, que con la fórmula $Y=100/(1+10^{((X-\text{LogIC}_{50}))})$ determinó la IC₅₀ a las 48 horas de tratamiento con rotenona era de 67.18 μM , concentración que se aproximó a 70 μM para ser usada en los ensayos biológicos posteriores. Los resultados de viabilidad celular con rotenona se muestran en la Figura 2.

Pre-tratamiento con análogos de nicotina

Al investigar si un pre-tratamiento de 24 horas con los análogos de la nicotina podía revertir la disminución de la viabilidad celular provocada con la IC₅₀ de rotenona, o si por el contrario era capaz de aumentar la toxicidad de este pesticida, se encontró mediante la prueba de viabilidad celular con MTT que el pre-tratamiento con concentraciones de 1 y 10 μM de (E)-nicotinaldehído O-cinamil

oxima reducía la muerte celular en comparación con el grupo de células que no fueron pre-tratadas (Figura 3). Las células pre-tratadas con 1 μ M tenían en promedio una viabilidad 15.04% (DE = 8.38) mayor que la de las células que no fueron pre-tratadas (representadas como 0 μ M en Figura 10). Por su parte, las células pre-tratadas con 10 μ M mostraron en promedio una viabilidad 27.91% (DE = 10.36) mayor que la de las células no pre-tratadas. No hubo diferencias significativas entre los pre-tratamientos de las concentraciones 1 y 10 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima, pero se escogió el pre-tratamiento con 10 μ M para realizar los experimentos subsiguientes de estrés oxidativo y producción de ROS, debido a que esta concentración fue la que mostró una mejor respuesta por parte de las células. Los pre-tratamientos con 50 y 100 μ M de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima no mostraron diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto al grupo de células no pre-tratadas.

Ninguna de las concentraciones usadas en el pre-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol mostró diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto a la presentada por las células que no fueron pre-tratadas (Figura 4).

Co-tratamiento con análogos de nicotina

Se encontró, mediante la prueba de viabilidad celular con MTT, que el co-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima no redujo la muerte celular en ninguna de las concentraciones usadas, en comparación con el grupo de células que no fueron co-tratadas (Figura 5). Adicionalmente, ninguna de las concentraciones usadas en el co-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol mostró diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto a la presentada por las células que no fueron co-tratadas (Figura 6).

Post-tratamiento con análogos de nicotina

A través de la prueba de viabilidad celular con MTT, se halló que el post-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima no redujo la muerte celular en ninguna de las concentraciones usadas, en comparación con el grupo de células que no fueron post-tratadas (Figura 7). Por el contrario, las concentraciones de 50 y 100 μ M redujeron la viabilidad celular 9.024 (DE = 9) y 9.378% (DE = 8.773) respectivamente, en comparación con las células a las que no se les aplicó este post-tratamiento. Por otra parte, ninguna de las concentraciones usadas en el post-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol mostró diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto a la

presentada por las células que no fueron co-tratadas (Figura 8). El post-tratamiento con este análogo de nicotina no aumentó ni disminuyó la viabilidad celular.

Pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima: Evaluación de viabilidad celular con citometría de flujo usando Ioduro de Propidio

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos de viabilidad celular con la prueba MTT, en donde se encontró que el pre-tratamiento con 1 y 10 μM de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima era capaz de reducir la disminución en la viabilidad celular provocada por la IC50 de rotenona, se procedió a realizar un ensayo de citometría de flujo con Ioduro de Propidio. Esta confirmación se hizo debido a que este ensayo con citometría tiene mayor fineza y exactitud a la hora de evaluar viabilidad celular. Como se explicó en la metodología de este trabajo, el Ioduro de Propidio tiñe a las células que están muertas y no a las viables. Mediante este ensayo se encontró que había diferencias significativas entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los pre-tratamientos con concentraciones de 1, 10 y 50 μM , con respecto a la IMF de las células no pre-tratadas. Las células pre-tratadas con estas concentraciones de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima presentaron una menor IMF y por lo tanto menor muerte celular, confirmando que estas concentraciones de este análogo de nicotina son capaces de disminuir la muerte celular. Entre 0 y 1 μM hubo una diferencia de IMF de 21.24% (DE = 1.004), mientras que entre 0 y 10 μM se encontró una diferencia de IMF de 24.51% (DE = 2.479), y entre 0 y 50 μM fue hallada una diferencia de IMF de 13.96% (DE = 7.868). No se encontraron diferencias significativas entre las células pre-tratadas con 100 μM y aquellas que no fueron pre-tratadas. Además, no hubo diferencias significativas en la IMF entre las células pre-tratadas con concentraciones que mostraron menor IMF (1, 10 y 50 μM). Los resultados de este ensayo se pueden observar en la figura 9.

(E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima y su influencia sobre la producción de aniones superóxido después de un insulto con rotenona

Para medir el efecto del pre-tratamiento con 10 μM de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (condición que mostró los mejores efectos en las pruebas de viabilidad celular) sobre la producción de aniones superóxido (O_2^-) en células SH-SY5Y sometidas a la IC50 de rotenona, se realizó un análisis de citometría de flujo usando hidroetidina DHE, que es un compuesto permeable a las células, que al entrar en éstas interactúa con O_2^- para formar oxietidio (Zhao et al. 2003), que a su vez interactúa con los ácidos nucleicos para emitir un color rojo brillante detectable mediante citometría de flujo (Tarpey et al. 2004).

Mediante este ensayo se encontró que había diferencias significativas en los niveles de ROS (específicamente aniones superóxido) producidos por las células pre-tratadas y no pre-tratadas con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima y después tratadas con la IC50 de rotenona, con respecto a los niveles producidos por las células control. En la prueba ANOVA se encontró que había diferencias significativas entre las medias, con un valor de $p < 0.0001$, hallándose además mediante la prueba de Dunnett (que compara al control con respecto a los demás grupos) que en las células no pre-tratadas y sometidas al insulto con rotenona existía una producción de ROS en promedio 85.08% (DE=14.88) mayor con respecto al control, y que las células pre-tratadas produjeron 35.84% (DE=6.515) más ROS que las células que sirvieron como control.

Por otra parte, al evaluar si el pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima lograba una reducción en los niveles de ROS producidos y detectados mediante la prueba con DHE, se encontró, mediante la prueba t de Student, que efectivamente este análogo de nicotina era capaz de disminuir este parámetro un 49.24%, en comparación con la producción de ROS a causa de la rotenona en células no pre-tratadas ($p = 0.0104$). Estos resultados confirmaron que el análogo de nicotina utilizado podría ser capaz de disminuir la producción de ROS en un modelo de EP y por tanto reducir el estrés oxidativo y la muerte celular. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la figura 10.

(E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima y su influencia sobre la producción de peróxido de hidrógeno después de un insulto con rotenona

Con el fin de evaluar el efecto del pre-tratamiento con 10 μM de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células SH-SY5Y sometidas a la IC50 de rotenona, se realizó un análisis de citometría de flujo usando Diclorofluoresceína diacetato (DCFDA). DCFDA y sus derivados son oxidados por un rango amplio de ROS, incluyendo H_2O_2 , radicales hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), hidroperoxi y $\text{ONOO}^\cdot$, produciéndose una fluorescencia roja (Uy et al. 2011). El ensayo con DCFDA se basa en un principio en el cual la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato puede ser oxidada por ROS y convertida a 2',7'-diclorofluoresceína que es fluorescente y puede ser detectada mediante citometría de flujo (Cristóvão *et al.* 2009).

Se encontraron diferencias significativas en los niveles de ROS producidos por las células pre-tratadas y no pre-tratadas con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima y después tratadas con la IC50 de rotenona, con respecto a los niveles producidos por las células control. En la prueba ANOVA se encontró que había diferencias significativas entre las medias, con un valor de $p = 0.0001$, hallándose además

mediante la prueba de Dunnett (que compara al control con respecto a los demás grupos) que en las células no pre-tratadas y sometidas al insulto con rotenona existía una producción de ROS en promedio 80.32% (DE=14.40) mayor con respecto al control, y que las células pre-tratadas produjeron 26.26% (DE=6.515) más ROS que las células que sirvieron como control.

Adicionalmente, al evaluar si el pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima lograba una reducción en los niveles de ROS producidos y detectados mediante la prueba con DCFDA, se halló, mediante la prueba t de Student, que efectivamente este análogo de nicotina era capaz de disminuir este parámetro en promedio un 54.06%, en comparación con la producción de ROS a causa de la rotenona en células no pre-tratadas ($p = 0.0132$). Estos resultados confirmaron, al igual que lo ocurrido en el ensayo con DHE, que el análogo de nicotina utilizado podría ser capaz de disminuir la producción de ROS en un modelo de EP y por tanto reducir el estrés oxidativo y la muerte celular. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la figura 11.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Estudios epidemiológicos han demostrado una relación inversa entre fumar cigarrillo y el riesgo de desarrollar EP, asociación que se ha observado en más de 40 estudios independientes realizados por diferentes investigadores en los últimos 50 años (Ward et al. 2008). El humo del cigarrillo está compuesto por más de 4000 sustancias, pero la nicotina es al parecer particularmente importante (Cormier et al. 2003). Aunque aún no se ha identificado con claridad el componente del humo de cigarrillo que confiere neuroprotección en la EP, numerosos estudios que usan tanto cultivos celulares como modelos animales sugieren que la nicotina juega un papel importante en este aspecto (Quik et al. 2007). El problema que posee la nicotina es que es capaz de generar dependencia y actuar como un agente tóxico que daña células y tejidos en el cuerpo humano. Es por ello que se decidió estudiar los posibles efectos benéficos sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo ejercidos por dos análogos de nicotina que no están reportados en la literatura, en un modelo de EP en células SH-SY5Y sometidas a insultos con rotenona.

La línea celular SH-SY5Y se caracteriza por expresar un fenotipo catecolaminérgico y receptores nicotínicos (Riveles et al. 2008). Los análogos de la nicotina podrían ejercer los mismos efectos benéficos que la nicotina en el tratamiento de la EP, pero a su vez es posible que no ejerzan la misma toxicidad y capacidad de adicción. Además, es necesario encontrar nuevas terapias farmacológicas que se centren en la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas, ya que los tratamientos

actuales se limitan a suplementar dopamina o a mejorar el efecto dopaminérgico, sin darle importancia a los efectos neuroprotectores (Takeuchi et al. 2009). Los modelos in vitro son importantes herramientas para el descubrimiento de potenciales fármacos, y líneas celulares como SH-SY5Y han sido las plataformas tradicionales para la detección de agentes neuroprotectores candidatos a ser de utilidad en el tratamiento de EP.

Solamente (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima, en concentraciones de 1 y 10 μM , demostró imitar la acción benéfica de la nicotina en estudios in vitro, consistente en mejorar la viabilidad celular en células tratadas con rotenona. Por su parte, 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol fue incapaz de mejorar la viabilidad celular, lo cual pudo deberse a que las concentraciones usadas no fueron las correctas (solo se usaron 4 concentraciones) o a que simplemente éste análogo de nicotina no es capaz de imitar esta acción benéfica ejercida por la nicotina. La capacidad de las concentraciones de 1 y 10 μM de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima de proteger a las células y disminuir la muerte celular provocada por rotenona coincide con concentraciones similares de nicotina usadas en otros estudios que mostraron también estos efectos benéficos. Por ejemplo, Peng et al. (2013) hallaron que la concentración de 40 μM de nicotina protegía a cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas de ratones, aumentando la viabilidad un 57% con respecto a las células no tratadas. Riveles et al. (2008) encontraron que concentraciones de entre 0.1 y 10 μM de nicotina protegían a las células SH-SY5Y contra los efectos tóxicos de 6-OHDA, Quik et al (2007) hallaron que la administración de nicotina ejercía neuroprotección parcial ante neurotoxinas en células de ratas, ratones y primates, y Takeuchi et al. (2009) demostraron que el pre-tratamiento con nicotina protegía significativamente el cuerpo estriado y la sustancia nigra de ratones tratados con rotenona.

Dukat et al. (2002) probaron dos análogos de nicotina que fueron sintetizados haciendo un reemplazo en la posición 5 de esta sustancia: 5-bromonicotina ($K_i = 6.9 \text{ nM}$) y 5-metoxinicotina ($K_i = 14.3 \text{ nM}$). Estos investigadores demostraron que ambos análogos tenían una alta afinidad por el nAChR (aunque aproximadamente 3 a 6 veces menor que la de la nicotina), pero que a pesar de ello no lograron imitar los efectos antinociceptivos, hipolocomotores e hipotérmicos de la nicotina en ratones. Pero en líneas generales, se sabe poco acerca de la farmacología y de las posibles acciones benéficas asociadas a una modificación en la posición 5 de la nicotina, siendo mencionada esta modificación por primera vez por Leete et al. (1971), quienes sintetizaron un compuesto llamado 5-fluoronicotina, pero cuyas propiedades farmacológicas en estudios in vitro no fueron especificadas. Por otra parte, se han promovido otros análogos de nicotina como agonistas del nAChR para

el tratamiento de la EP, como por ejemplo el SIB-1508Y, que si han sido capaces de ejercer neuroprotección, aumentando la viabilidad celular y disminuyendo la producción de ROS y el estrés oxidativo (Dukat et al. 2002). Es posible por tanto que a pesar de que haya análogos de nicotina, como los usados en nuestra investigación, capaces de unirse con mayor o similar afinidad al receptor, los datos de unión no son suficientes para explicar la farmacología y las acciones ejercidas por estos sobre la viabilidad celular y la disminución del estrés oxidativo.

La capacidad de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima de aumentar la viabilidad celular en nuestro modelo de EP con rotenona, podría deberse a la acción sobre una vía de señalización expuesta e hipotetizada por Shimohama (2009), en donde el nAChR $\alpha 7$ es activado y estimula a su vez a la familia del Src, que activa a la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) para fosforilar a Akt, que una vez fosforilada transmite una señal que hace que haya una regulación al alza de Bcl-2 y Bcl-x. Esta regulación al alza podría prevenir, según Shimohama (2009), que las neuronas mueran debido a la rotenona. Esta investigadora sostuvo que la cascada PI3K-Akt contribuía al efecto neuroprotector de la nicotina (y probablemente de sus análogos), y que la familia de Bcl-2 se activaba posteriormente trabajando como un factor que evitaba la muerte neuronal provocada por rotenona. Por ello, la investigadora concluyó que la activación de la vía PI3K-Akt promovía la supervivencia celular y que la regulación al alza de Bcl-2 era un componente importante de este mecanismo de supervivencia.

Existe otra hipótesis según la cual la nicotina y por ende, posiblemente algunos de sus análogos, son capaces de incrementar el número de nAChRs en el cerebro, ejerciendo de esta manera neuroprotección (Peng et al. 1997). Según Peng et al. (1997) la nicotina regula al alza los nAChR $\alpha 3$ (aumento de 500 a 600%) y $\alpha 7$ (aumento de solo 30%) en células SH-SY5Y, pero para lograr este efecto se requiere de concentraciones mucho más altas que aquellas presentes en el plasma de los fumadores. Según los investigadores, la EC50 de nicotina para que se produzca una regulación al alza de nAChR en células SH-SY5Y era de 100 μ M para los receptores $\alpha 3$ y 65 μ M para los del subtipo $\alpha 7$. La regulación al alza de nAChR y el aumento de la viabilidad celular en este estudio se dio de forma completa a las 24 horas de tratamiento. Futuras investigaciones, en donde se lleven a cabo técnicas como la inmunocitoquímica con anticuerpos, que tengan como blanco la detección de nAChRs, podrían ser fundamentales para conocer si en las células SH-SY5Y el aumento de la viabilidad celular provocado por (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima y otros análogos de nicotina, va acompañado por un incremento en el número de este tipo de receptores.

Por su parte, Takeuchi et al. (2009) analizaron los mecanismos moleculares del efecto protector de la nicotina en cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas expuestas a rotenona, encontrando que estos efectos neuroprotectores eran evitados por inhibidores de PI3K-Akt/PKB, confirmándose la hipótesis de Shimohama, y demostrando que la toxicidad provocada por la rotenona sobre las neuronas es inhibida mediante la activación del nAChR $\alpha 4\beta 2$ o de la vía de señalización que involucra al receptor $\alpha 7$ y a PI3K-Akt/PKB. Estos investigadores revelaron que tanto la toxicidad de la rotenona como la neuroprotección de la nicotina se dieron mayormente después de 24 horas de tratamiento, contrario a lo ocurrido en nuestra investigación en donde hubo un pre-tratamiento de 24 horas con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima que mostró neuroprotección y una toxicidad máxima de rotenona 48 horas después de ese pre-tratamiento. Además, la neuroprotección ejercida por la nicotina en el estudio de Takeuchi et al. (2009) se dio mediante co-tratamiento, y de una forma dependiente de la dosis, y demostraron por otra parte que esta protección se daba mediante la activación de al menos dos tipos de receptores nicotínicos: $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$.

Se ha demostrado que la nicotina puede ejercer neuroprotección al aumentar la expresión de receptores de superficie tirosin quinasa (TrkA) y produciendo incrementos regionales en factores tróficos como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2) (Belluardo et al. 1998, Starkov et al. 2002). Por otra parte, la nicotina y sus análogos también son capaces de ejercer neuroprotección cuando los nAChR activados actúan sobre la vía de señalización del factor neurotrófico derivado de cerebro y la tirosin quinasa B (BDNF-TrkB), induciendo la proliferación celular y promoviendo la liberación de BDNF que activa a los receptores TrkB (Serres & Carney 2006). Al parecer, los receptores de tipo $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ y una pequeña elevación en el Ca^{2+} intracelular podrían estar implicados en estas respuestas (Cormier et al. 2003). La neuroprotección observada con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima podría darse por esta vía, actuando éste análogo de nicotina en las células SH-SY5Y sobre el receptor $\alpha 7$, pero estudios más profundos mediante técnicas como la inmunocitoquímica o métodos para el silenciamiento de RNA son requeridos para confirmarlo.

Otras vías mediante las cuales la nicotina y análogos de esta sustancia podrían evitar o retrasar la aparición de PD, están siendo investigadas y podrían ser objeto de investigación en futuros estudios. Por ejemplo, la activación del nAChR mediante la nicotina o alguno de sus análogos desencadena la liberación de dopamina, así como también está implicada en la modulación neural de la inflamación. Por otra parte, esta acción anti-inflamatoria en la que existe una disminución en la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF α) y de la sintasa del óxido nítrico inducible

(iNOS), está implicada en los efectos neuroprotectores de la nicotina (Ward et al. 2008) y debería ser investigada con mayor profundidad en estudios futuros. También es de importancia investigar tanto en modelos in vitro como en modelos in vivo de EP, otras vías de neuroprotección, como por ejemplo aquellas relacionadas con las actividades de las monoamino oxidasas A y B, que disminuyen por el tratamiento con nicotina haciendo que haya una disminución en la oxidación de dopamina, o la probable capacidad de la nicotina y sus análogos de ejercer neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas estimulando la liberación del factor de crecimiento de fibroblastos neurotrófico-2 (FGF-2), así como su influencia sobre la producción de hormonas pituitarias que estimulan la producción de cortisona (Ward et al. 2008), la participación del factor neurotrófico BDNF en la neuroprotección mediada por nicotina (Serres & Carney 2006), entre otras.

Es importante anotar que el criterio para escoger el modelo de EP en esta investigación, se debió a que en la EP existen alteraciones en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, que se ha evidenciado en cerebros de pacientes que sufren de esta patología (Beal 1995, Nakamura et al. 2004), y la rotenona es capaz de imitarlas, por lo cual se considera que es una herramienta muy útil tanto en modelos in vitro como en modelos in vivo de EP. Además, este pesticida puede proporcionar pistas acerca de las exposiciones ambientales que podrían aumentar el riesgo de tener EP. La rotenona produce una inhibición crónica y sistémica del complejo mitocondrial I y causa degeneración altamente selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales disminuyéndose el ATP y aumentándose la producción de ROS y el estrés oxidativo, lo cual conlleva finalmente a la muerte celular (Betarbet et al. 2000, Douna et al. 2012). Sin embargo, según Douna et al. 2012, no es la disminución en el ATP la causante de la muerte celular, sino la gran cantidad de ROS que se producen. La administración de rotenona además, podría considerarse como una inductora de las características anatómicas, neuroquímicas y neuropatológicas de la EP, aumentando la generación de aniones superóxido muy tóxicos para las células, al permitir la fuga de electrones desde el complejo I (Cormier et al. 2003), y posee ventajas frente a otras neurotoxinas como MPTP y 6-OHDA, como por ejemplo el hecho de que a diferencia de éstas, si es capaz de inducir acumulación de α -sinucleína, una de las principales características de la EP (Douna et al. 2012).

En nuestra investigación, se encontró que la IC₅₀ de rotenona en células SH-SY5Y fue de 70 μ M a las 48 horas de tratamiento. Este resultado difiere con lo encontrado por Nakamura et al. (2004) que hallaron que esta sustancia provocaba muerte en la misma línea celular de una forma dependiente de la concentración y el tiempo, y que la IC₅₀ era de apenas 1 μ M. La rotenona actúa en las células SH-

SY5Y a través de la degradación de las caspasas-9 y -3, después de lo cual se produce un clivaje de la poli (ADP-ribosa) polimerasa, generándose fragmentación del ADN y muerte celular (Nakamura et al. 2004).

Dado que en la EP hay un aumento de los factores que conllevan al estrés oxidativo, se investigó el potencial antioxidante del análogo de nicotina (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima, que fue el único de los análogos estudiados que mejoró la viabilidad celular de células SH-SY5Y sometidas a insultos con la IC50 de rotenona. Se encontró que este análogo, siendo aplicado a una concentración de 10 μM , tenía la capacidad de disminuir los aniones superóxido (ensayo con DHE) y las ROS (ensayo con DCF) en células SH-SY5Y tratadas durante 48 horas con la IC50 de rotenona. Este hallazgo coincide con diversos estudios en donde se ha demostrado que la nicotina es capaz de disminuir la generación de anión superóxido, disminuyendo el estrés oxidativo al afectar el curso de la reacción de Fenton (Linert et al. 1999). Según Cormier et al. (2003), la nicotina ejerce estos efectos en estudios in vivo e in vitro, a concentraciones muy bajas, lo cual está en concordancia con estudios epidemiológicos que reportan efectos protectores de la nicotina en la EP. Además, de acuerdo a estos investigadores, uno de los efectos de la nicotina es la preservación de las funciones mitocondriales en el sistema nervioso central de las ratas, lo cual podría trasladarse a análogos de la nicotina en modelos in vitro de EP como el que se ha usado en nuestra investigación.

Cormier et al. (2003) encontraron que la administración de nicotina disminuía la generación de anión superóxido en las mitocondrias de cerebros de ratas. Hallaron que la producción del anión superóxido se incrementaba un 63.21% después de la administración de rotenona, pero que en presencia de nicotina, solo había un aumento del 39.97%. Estos investigadores concluyeron que la nicotina inhibía el complejo I de la cadena transportadora de electrones por competencia con el NADH, H^+ sin afectar a los nAChR. Por ello, la nicotina inhibía tanto la generación de electrones a partir del NADH, H^+ , como también la generación de ROS a partir de la mitocondria, uno de los principales efectos ejercidos por la rotenona en el modelo de EP usado en nuestra investigación. (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima fue capaz de disminuir la producción de ROS, probablemente por el mismo mecanismo a través del cual actúa la nicotina. La nicotina y probablemente (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima no compiten con la rotenona en el complejo I de la cadena respiratoria, sino que al igual que este pesticida podrían inhibir la actividad de este complejo. La diferencia podría radicar en que tanto la nicotina como el análogo estudiado previenen la generación de electrones a partir del NADH, H^+ , evitando así la generación de ROS cuando la rotenona aumenta esta producción en el complejo I al darse una liberación de electrones.

En otra investigación relacionada con la capacidad de agentes nicotínicos de aliviar el estrés oxidativo, Soto-Otero et al. (2002) estudiaron los efectos de esta molécula sobre la formación de radicales hidroxilo (OH) y sobre la producción de estrés oxidativo por 6-OHDA. Hallaron que la nicotina y la cotinina a una concentración de 320 μM , poseían propiedades antioxidantes relacionadas con la peroxidación lipídica inducida por autooxidación de 6-OHDA, y además eran capaces de prevenir la reacción de Fenton, convirtiéndose en agentes neuroprotectores. Mediante las mediciones que se hicieron en nuestra investigación, tanto por la técnica de la hidroetidina como por la de diclorofluoresceína, se halló que una concentración de 10 μM de (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima disminuía los factores relacionados con el estrés oxidativo, pero estos hallazgos no permiten concluir que este análogo de nicotina sea capaz de disminuir la peroxidación lipídica ni de prevenir la reacción de Fenton, por lo que se requieren pruebas futuras que permitan confirmar o descartar esta propiedad.

A pesar de que la EP causada por rotenona representa solo unos pocos casos, el daño que este pesticida ejerce sobre la cadena transportadora de electrones está implicado y hace parte de la EP, como consecuencia de factores genéticos o ambientales. Los análogos de nicotina, como se demostró en este estudio con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima, al igual que la nicotina, podrían jugar un papel importante en la prevención o disminución de estos efectos deletéreos que hacen parte de la EP, a través de acciones sobre la mitocondria y también por causa de sus propiedades antioxidantes que disminuyan las reacciones que produzcan estrés oxidativo. Por otra parte, la nicotina y sus análogos podrían actuar eliminando los H_2O_2 que haya en exceso y formando grupos nicotina-pirrolinilóxido o complejos con el hierro a través del nitrógeno de su piridina (Cormier et al. 2003).

Diversos estudios han demostrado que otros agonistas del nAChR $\alpha 7$ y análogos de nicotina podrían ejercer efectos neuroprotectores, por lo cual es aconsejable tomar como base estos estudios, sintetizar u obtener sintetizados dichos compuestos y evaluar la capacidad neuroprotectora de aumento de viabilidad celular y disminución de estrés oxidativo en modelos in vitro e in vivo de EP. Por ejemplo, el nefiracetam, el GTS-21, y el 3-[2,4-dimetiloxibenzilideno]anabaseina, son capaces de ejercer neuroprotección previniendo el aumento del calcio intracelular y la acumulación de ROS (Prendergast et al. 2000). Así mismo, no se han evaluado a profundidad agonistas de otros tipos de receptores como el $\alpha 6\beta 2$, el cual es de importancia debido a que interfieren bastante con la función nigroestriatal y la aparición de EP, y su disminución se relaciona con la pérdida del transportador estriatal de dopamina (Ward et al. 2008).

Modelos in vitro como el expuesto aquí son de ayuda para comprender las vías celulares y moleculares que participan en la función normal y en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Además, sirven para la detección de potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, el uso de este tipo de ensayos es apenas un primer paso en la evaluación de agentes y sustancias con potencial capacidad de modificar enfermedades neurodegenerativas, y ayuda a reducir el tiempo que se necesita para que dichos agentes lleguen a ensayos clínicos, incrementando el éxito de estos ensayos. Definitivamente, los agentes más efectivos serán aquellos capaces de proteger y actuar en todas las vías de señalización y en las múltiples disfunciones presentes en la etiología de la EP.

Adicionalmente, los efectos diferenciales que puedan tener los ligandos nicotínicos en la activación, regulación al alza de nAChR y en el aumento de la viabilidad celular, son de importancia para seguir explorando posibilidades y llegar al desarrollo de nuevos análogos de nicotina que se unan selectivamente a los diferentes subtipos de nAChR, y puedan ser relevantes en el mejoramiento cognitivo y en los efectos neuroprotectores que los lleven a convertirse en posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad Alzheimer, el síndrome de Tourette, y la esquizofrenia. Existe gran cantidad de evidencia que sugiere que los nAChR son potenciales blancos para el tratamiento de la EP, tanto para el mejoramiento de la sintomatología como para lograr neuroprotección a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

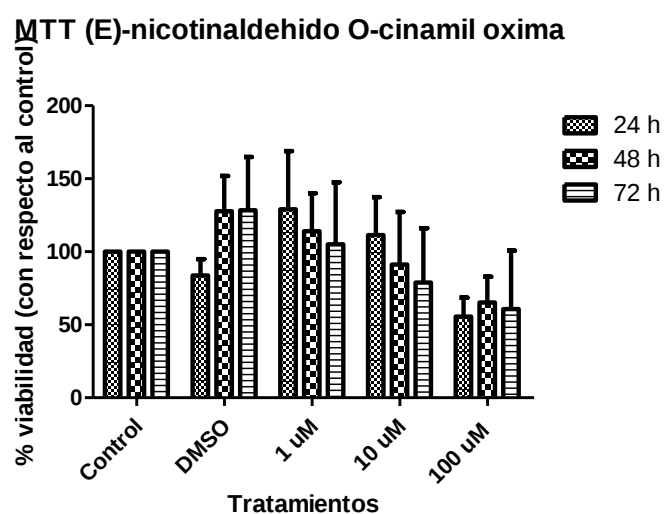
- Beal MF (1995) Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology* 38(1):357-366
- Belluardo N, Blum M, Mudo G, Andbjør B, Fuxe K (1998) Acute intermittent nicotine treatment produces regional increases of basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein in the tel- and diencephalon of the rat. *Neuroscience* 83(1):723-740
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* 12(1):1301-1306
- Chung W-G, Miranda CL, Maier CS (2007) Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Research* 1176(1):133-142
- Cormier A, Morin C, Zini R, Tillement J-P, Lagrue G (2003) Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharmacology* 44(5):642-652
- Cristóvão AC, Choi D-H, Baltazar G, Flint Beal M, Kim Y-S (2009) The role of NADPH oxidase 1-derived reactive oxygen species in Paraquat-mediated dopaminergic cell death. *Antioxidants and redox signaling* 11(9):2105-2118
- Douna H, Bavelaar BM, Pellikaan H, Olivier B, Pieters T (2012) Neuroprotection in Parkinson's disease: A systematic review of the preclinical data. *The Open Pharmacology Journal* 6(1):12-26

- Dukat M, Damaj IM, Young R, Vann R, Collins AC, Marks MJ, Martin BR, Glennon RA (2002) Functional diversity among 5-substituted nicotine analogs; in vitro and in vivo investigations. *European Journal of Pharmacology* 435(2-3):171-180
- Kim H-J, Park HJ, Park HK, Chung J-H (2009) Tranexamic acid protects against rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicology* 262(2-3):171-174
- Leete E, Bodem GB, Manuel MF (1971) Aberrant syntheses in higher plants: I. Formation of 5-fluoronicotine from 5-fluoronicotinic acid in *Nicotiana tabaccum*. *Phytochemistry* 10(1):2687-2692
- Liu Z, Li T, Yang D, Smith WW (2013) Curcumin protects against rotenone-induced neurotoxicity in cell and drosophila models of Parkinson's disease. *Advances in Parkinson's Disease* 2(1):18-27
- Nakamura K, Kitamura Y, Tsuchiya D, Inden M, Taniguchi T (2004) In vitro neurodegeneration model: dopaminergic toxin-induced apoptosis in human SH-SY5Y cells. *International Congress Series* 1260(1):287-290
- Peng X, Gerzanich V, Anand R, Wang F, Lindstrom J (1997) Chronic Nicotine Treatment Up-regulates $\alpha 3$ and $\alpha 7$ Acetylcholine Receptor Subtypes Expressed by the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Molecular Pharmacology* 51(1):776-784
- Peng J, Liu Q, Rao MS, Zeng X (2013) Using human pluripotent Stem cell-derived dopaminergic neurons to evaluate candidate Parkinson's disease therapeutic agents in MPP⁺ and Rotenone models. *Journal of Biomolecular Screening* 18(5):522-533
- Quik M, O'Neill M, Perez XA (2007) Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends in Pharmacological Science* 28(5):229-235
- Riveles K, Huang LZ, Quik M (2008) Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicology* 29(3):421-427
- Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Research* 318(1):215-224
- Serres F, Carney SL (2006) Nicotine regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Research* 1101(1):36-42
- Shimohama S (2009) Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32(3):332-336
- Soto-Otero R, Méndez-Álvarez E, Hermida-Ameijeiras A, López-Real A, Labandeira-García J (2002) Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology* 64(1):125-135
- Starkov AA, Polster BM, Fiskum G (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *Journal of Neurochemistry* 83(1):220
- Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S (2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *Journal of Neuroscience Research* 87(2):576-585
- Uy B, McGlashan SR, Shaikh SB (2011) Measurement of Reactive Oxygen Species in the Culture Media Using Acridan Lumigen PS-3 Assay. *Journal of Biomolecular Techniques* 22(1):95-107
- Ward RJ, Lallemand F, De Witte P, Dexter DT (2008) Neurochemical pathways involved in the protective effects of nicotine and ethanol in preventing the development of Parkinson's disease: Potential targets for the development of new therapeutic agents. *Progress in Neurobiology* 85(1):135-147

- Xiong N, Jia M, Chen C, Xiong J, Zhang Z, Huang J, Hou L, Yang H, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z, Wang T (2011) Potential Autophagy Enhancers Attenuate Rotenone-Induced Toxicity in SH-Sy5Y. *Neuroscience* 199(1):292-302
- Yuan H, Petukhov PA (2006) Computational evidence for the ligand selectivity to the $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(23):7936-7942
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology & Medicina* 34(11):1359-1368

ANEXOS

(A)



(B)

MTT 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7^a-hexahidrobencol[d]isoxazol

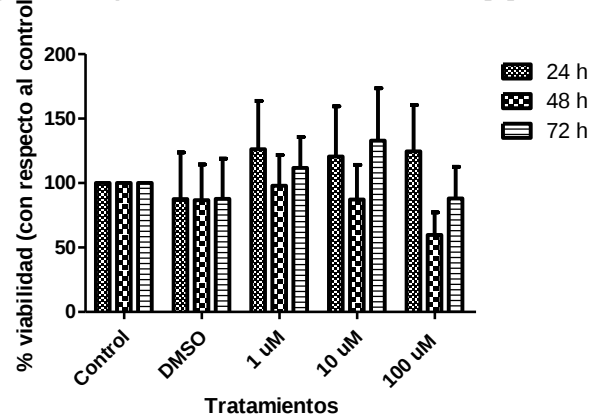


Figura 1. El efecto de (a) (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima y (b) 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol sobre la viabilidad celular fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron tratadas usando varias concentraciones de éstos análogos de nicotina por 24, 48 y 72 h. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (Significancia si $P < 0.05$ vs células no tratadas).

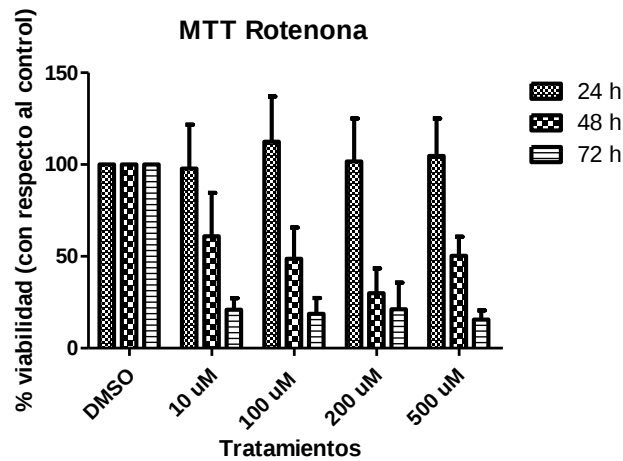


Figura 2. El efecto de la rotenona sobre la viabilidad celular fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron tratadas usando varias concentraciones de éstos análogos de nicotina por 24, 48 y 72 h. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (Significancia si $P < 0.05$ vs células no tratadas).

MTT pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima

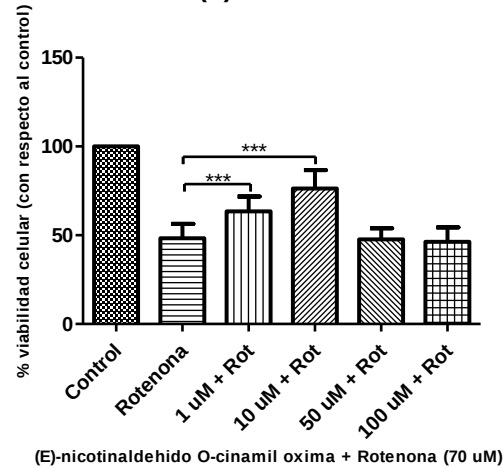


Figura 3. El efecto del pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (antes de la aplicación de la IC₅₀ de rotenona (70 µM)) sobre la viabilidad celular, fue examinado en células SH-SY5Y. Las

células fueron pre-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina por 24 horas. Posteriormente se aplicó IC50 de rotenona (70 μ M) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (***) $P < 0.0001$ comparado con 0 μ M).

MTT pre-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7^a-hexahidrobencol[d]isoxazol

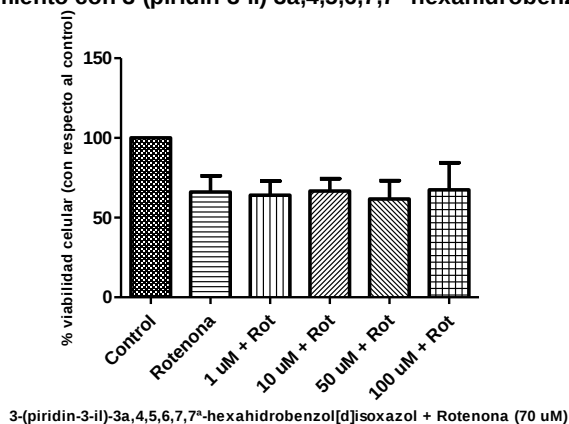


Figura 4. El efecto del pre-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol (antes de la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μ M)) sobre la viabilidad celular, fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron pre-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina por 24 horas. Posteriormente se aplicó IC50 de rotenona (70 μ M) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (Ningún P resultó < 0.05).

MTT co-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima

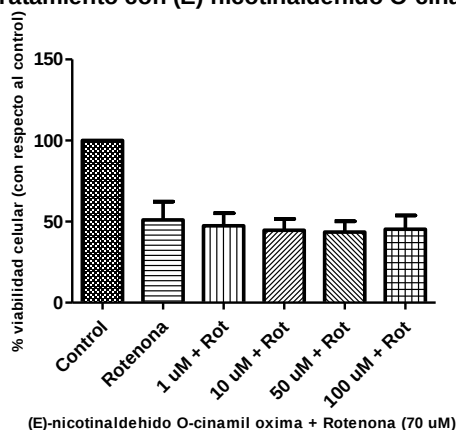


Figura 5. El efecto del co-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (al mismo tiempo de la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μ M)) sobre la viabilidad celular, fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron co-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina y la IC50 de rotenona durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (Ningún P resultó < 0.05).

MTT co-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7^a-hexahidrobencol[d]isoxazol

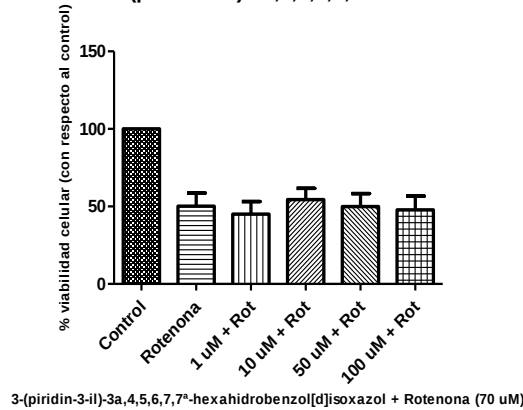


Figura 6. El efecto del co-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobencol[d]isoxazol (al mismo tiempo de la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μM)) sobre la viabilidad celular, fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron co-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina y la IC50 de rotenona durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (Ningún *P* resultó <0.05).

MTT post-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima

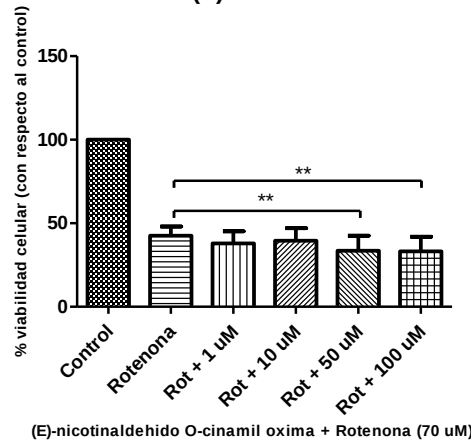


Figura 7. El efecto del post-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (posterior a la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μM)) sobre la viabilidad celular, fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron post-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina por 24 horas. Con anterioridad se aplicó IC50 de rotenona (70 μM) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (** *P*=0.0024 para 50 μM y 0.0029 para 100 μM, al compararlos con 0 μM).

MTT post-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7^a-hexahidrobencol[d]isoxazol

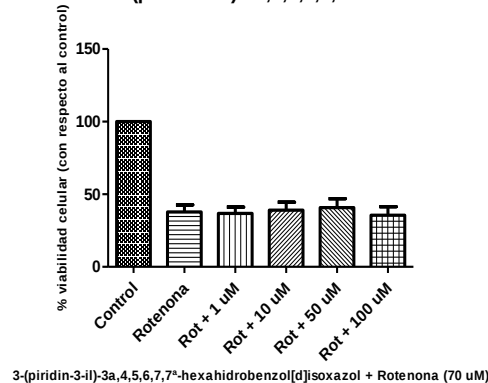


Figura 8. El efecto del post-tratamiento con 3-(piridin-3-il)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidrobenzol[d]isoxazol (posterior a la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μ M)) sobre la viabilidad celular, fue examinado en células SH-SY5Y. Las células fueron post-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina por 24 horas. Con anterioridad se aplicó la IC50 de rotenona (70 μ M) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular y la desviación estándar (Ningún *P* resultó <0.05).

Citometría de Flujo con Ioduro de Propidio (Pretratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima)

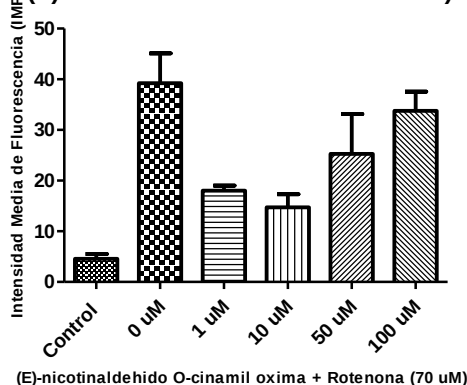


Figura 9. El efecto del pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (anterior a la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μ M)) sobre la viabilidad celular, fue confirmado en células SH-SY5Y mediante citometría de flujo con Ioduro de Propidio. Las células fueron pre-tratadas usando varias concentraciones de éste análogo de nicotina por 24 horas. Posteriormente se aplicó IC50 de rotenona (70 μ M) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como la IMF y la desviación estándar (* *P*=0.0169 para 1 μ M, 0.0173 para 10 μ M y 0.0399 para 50 μ M al compararlos con 0 μ M).

Citometría de Flujo con DHE (Pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima vs no pre-tratamiento)

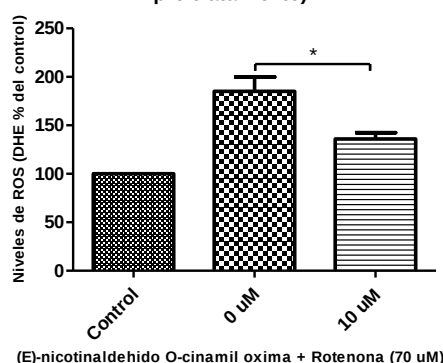


Figura 10. El efecto del pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (anterior a la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μ M)) sobre la producción de ROS (aniones superóxido), fue establecido en células SH-SY5Y mediante citometría de flujo con DHE. Las células fueron pre-tratadas con 10 μ M de éste análogo de nicotina por 24 horas. Posteriormente se aplicó IC50 de rotenona (70 μ M) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de tinción con DHE (niveles de ROS) con respecto al control, junto con la desviación estándar (* *p* = 0.0104 para el pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima en comparación con las células no pre-tratadas).

Citometría de Flujo con DCFDA (Pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima vs no pre-tratamiento)

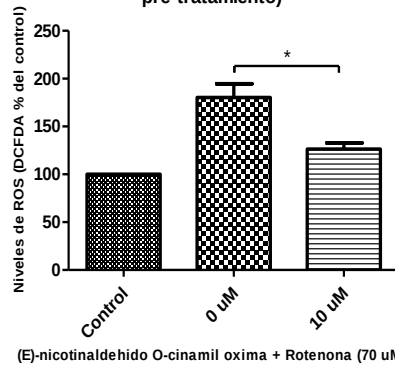


Figura 11. El efecto del pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima (anterior a la aplicación de la IC50 de rotenona (70 μ M)) sobre la producción de ROS (peróxido de hidrógeno), fue establecido en células SH-SY5Y mediante citometría de flujo con DCFDA. Las células fueron pre-tratadas con 10 μ M de éste análogo de nicotina por 24 horas. Posteriormente se aplicó IC50 de rotenona (70 μ M) durante 48 horas. Se realizaron experimentos independientes por triplicado. Los resultados se presentan como el porcentaje de tinción con DCFDA (niveles de ROS) con respecto al control, junto con la desviación estándar (* $p = 0.0132$ para el pre-tratamiento con (E)-nicotinaldehído O-cinamil oxima en comparación con las células no pre-tratadas).