



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Caracterización del efecto neuroprotector de alcaloides quinolizidínicos aislados de *Cytisus scoparius* en un modelo neuronal de la Enfermedad de Alzheimer



Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
para optar al Título de Biólogo

Javiera Andrea Gavilán Gavilán

Concepción, Enero de 2016

RESUMEN

Cytisus scoparius o “retamo” es una planta herbácea, introducida en Chile y que pertenece a la familia Fabaceae. Se ha descrito que esta familia posee compuestos de gran valor farmacológico, específicamente por la presencia de alcaloides quinolizidínicos, éstos son metabolitos secundarios que se caracterizan por actuar como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), por lo que podrían ejercer efectos neuroprotectores en el Sistema Nervioso Central (SNC) ante la aparición de enfermedades neurodegenerativas seniles como la Enfermedad de Alzheimer (EA). Este tipo de patologías ha ido aumentando en Chile debido al incremento de la esperanza de vida de la población, llegando a una incidencia del 50% en personas mayores de 85 años. La principal causa en el desarrollo de la EA es el péptido β -amiloide (β A), el cual afecta la neurotransmisión, causando una falla sináptica crónica y la posterior muerte celular.

En estudios previos se han descrito las propiedades neuroprotectoras de la nicotina en la EA, la cual previene la neurotoxicidad inducida por el péptido β A, mediante su acción sobre receptores nicotínicos del subtipo $\alpha 7$ y la subsecuente activación de sobrevida celular PI3K/AKT/Bcl-2. Esta evidencia plantea la posibilidad de buscar nuevos agonistas $\alpha 7$ como posibles nuevas terapias para la EA, que no posean los efectos secundarios y adversos de la nicotina. Por este motivo, en este trabajo de tesis, se evaluó si los alcaloides aislados de *Cytisus scoparius* tienen un efecto protector frente a la toxicidad inducida por el péptido β A en un modelo neuronal *in vitro* de la EA.

El material vegetal fue recolectado en la Comuna de Coronel, Región del Bio-Bío. La obtención de los alcaloides quinolizidínicos se llevó a cabo mediante extracción líquido-líquido con solventes orgánicos, para luego ser analizados y purificados mediante técnicas cromatográficas convencionales. Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se detectó la presencia de tres alcaloides quinolizidínicos en *C. scoparius*: Esparteína, 17-oxo-esparteína y lupanina.

Para evaluar el efecto neuroprotector de estos alcaloides se realizaron ensayos de viabilidad celular, microfluorimetría de calcio citosólico y western blot, utilizando neuronas hipocámpales de rata y las líneas celulares PC-12 y HEK293.

Los resultados muestran que el extracto total de *C. scoparius* y esparteína no producen incrementos significativos en la viabilidad de células PC-12, sin embargo, 17-oxo-esparteína y lupanina aumentan significativamente la viabilidad celular, obteniéndose valores de $136,4 \pm 7,4\%$ y $144,3 \pm 9\%$, respectivamente. Además, estos alcaloides previnieron la toxicidad inducida por β A (β A: $52 \pm 6\%$; 17-oxo-esparteína + β A: $109,6 \pm 7\%$ y lupanina + β A: $116,6 \pm 8\%$). Este efecto protector fue bloqueado al utilizar el antagonista nicotínico $\alpha 7$ α -bungarotoxina (β A: $74 \pm 1,8 \%$; 17-oxo-esparteína + β A: $78,4 \pm 2,1\%$ y lupanina + β A: $80,3 \pm 1,6\%$). Adicionalmente, no se observó un efecto protector en células HEK293, las cuales no expresan receptores nicotínicos (β A: $78,9 \pm 6,5 \%$; 17-oxo-esparteína + β A: $82,2 \pm 4,3\%$ y lupanina + β A: $84,5 \pm 6,7\%$).

En los ensayos de microfluorimetría de calcio citosólico con neuronas hipocampales se observó que 17-oxo-esparteína y lupanina incrementan la frecuencia de las transitorias de calcio intracelular con valores de $140 \pm 3,4 \%$ y $164 \pm 4,6 \%$, respectivamente. Además, βA redujo la frecuencia a un $63,2 \pm 2\%$ y esta disminución fue prevenida con ambos alcaloides (17-oxo-esparteína + βA : $115 \pm 3,6\%$ y lupanina + βA : $120 \pm 2,7\%$).

Los ensayos de western blot muestran que 17-oxo-esparteína y lupanina aumentan la fosforilación de Akt en células PC-12 a 1 h (βA : $104,3 \pm 6,9\%$; 17-oxo-esparteína + βA : $131,8 \pm 14,7\%$ y lupanina + βA : $162,5 \pm 12,4\%$) y a 3 h (βA : $78,96 \pm 5,3\%$; 17-oxo-esparteína + βA : $113 \pm 7\%$ y lupanina + βA : $130 \pm 4,5\%$)., permitiendo correlacionar la actividad de nAChR con una señalización neuroprotectora intracelular.

Nuestros resultados sugieren que 17-oxo-esparteína y lupanina ejercen neuroprotección frente a los efectos tóxicos del péptido βA por medio de la activación de nAChR $\alpha 7$, lo cual puede representar un punto de partida en la caracterización de nuevas moléculas anti-EA a partir de fuentes naturales.

