



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NUEVOS COMPUESTOS
INVESTIGACIONALES SOBRE RECEPTORES SIGMA-1**

Marisa Pardines Ortiz

Trabajo final de Grado Biotecnología 2020

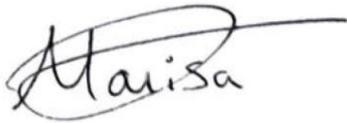
Tutor académico y supervisor: Francesc Xavier Sureda Batlle, Titular de Farmacología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universitat Rovira i Virgili, francesc.sureda@urv.cat

En cooperación con: Departamento de Ciencias Médicas Básicas

Fecha de la defensa: 10 de julio

Yo, Marisa Pardines Ortiz, con DNI 20053779-X, soy concedora de la guía de prevención del plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de julio de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marisa', with a long horizontal flourish extending to the right.

ÍNDICE

1.	AGRADECIMIENTOS.....	1
2.	DATOS DEL CENTRO	2
3.	RESUMEN	3
4.	INTRODUCCIÓN	4
	4.1 Receptores opioides	4
	4.2 Receptor sigma-1	4
	4.3 Receptor sigma-2	10
	4.4 Características farmacológicas del receptor sigma-1	13
	4.5 Agonistas.....	19
	4.6 Antagonistas	20
5.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
6.	METODOLOGÍA.....	23
	6.1 Sustrato biológico	23
	6.2 Material.....	24
	6.3 Protocolos y mantenimiento.....	25
	6.4 Diferenciación con NGF	28
	6.5 Potenciación	28
	6.6 Tratamiento de los datos y estadística	29
7.	RESULTADOS	30
8.	DISCUSIÓN.....	36
9.	CONCLUSIÓN	37
10.	BIBLIOGRAFÍA	38
11.	AUTOEVALUACIÓN	41

1. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres, por enseñarme a no rendirme y a valorar las cosas importantes, por su apoyo incondicional, su paciencia infinita y por la confianza depositada en mí.

A Vanessa Sánchez Martos, técnica del laboratorio, por haberme ayudado en todo lo que podía, por explicarme el correcto funcionamiento de los equipos de laboratorio, pero, sobre todo, por tener siempre unas palabras amables.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a mi tutor, el Dr. Francesc Xavier Sureda Batlle, por darme la gran oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Desde el primer día me ha mostrado su apoyo y su confianza, lo que me ha permitido crecer como investigadora y como persona. Esta experiencia me ha brindado la oportunidad de obtener nuevos conocimientos y experiencias profesionales que estoy segura de que serán de suma importancia en mi carrera profesional y me abrirán puertas para seguir estudiando e investigando. El Dr. Sureda me ha sabido motivar en todo momento y, ante todas las dificultades que se han presentado, siempre ha estado dispuesto a dedicarme su tiempo y conocimiento.

2. DATOS DEL CENTRO

El trabajo se ha realizado en base a las prácticas externas realizadas en la Unidad de Farmacología perteneciente al Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de Reus de la Universitat Rovira i Virgili.

El grupo de investigación FARBIOLO (Farmacobiología Celular) trabaja en diferentes líneas de investigación: Estudios de intervención nutricional en modelos animales sanos y afectos de diversas patologías como el síndrome metabólico, estudios de marcadores de diagnóstico, funcionalidad y mecanismos de acción de estrés oxidativo e inflamación, así como en el estudio de los procesos de neuroprotección y neurodegeneración en cultivos celulares.

El estudio se lleva a cabo en la última línea de investigación mencionada y se enmarca en el proyecto del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad “Síntesis de compuestos con mecanismos innovadores contra enfermedades neurodegenerativas”.

La Unidad de Química Farmacéutica de la Universitat de Barcelona, dirigida por el Dr. Santiago Vázquez, se encarga de la síntesis de compuestos investigacionales, mientras que la evaluación de la actividad farmacológica está liderada por el Dr. Francesc Xavier Sureda.

3. RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías multifactoriales que alteran la integridad neuronal. El principal inconveniente que presentan los medicamentos actuales es que sólo permiten aliviar parte del cuadro sintomático. Por tanto, es importante comprender mejor los procesos y mecanismos involucrados en la neurodegeneración con el objetivo de identificar una nueva diana terapéutica que sea capaz de restablecer la integridad neuronal o como mínimo, detener su evolución.

Este trabajo se ha centrado en la enfermedad del Alzheimer (EA) y el dolor neuropático (DN). El fundamento del proyecto es la evaluación de una serie de compuestos sintetizados que dirigen su efecto a dos dianas involucradas en la aparición de EA y DN: la epóxido-hidrolasa soluble (sEH: *soluble epoxide-hydrolase*) y el receptor σ_1 . Se ha demostrado la interacción de un importante número de nuevos compuestos sobre ambas dianas. No obstante, es necesario caracterizar la naturaleza de su actividad. Si el compuesto actúa como agonista potencialmente puede ser neuroprotector y, por tanto, de interés para la EA. Contrariamente, si su efecto es antagonista actuará como analgésico y será de interés para el DN.

Para llevar a cabo este estudio, se han utilizado células PC12 porque son un excelente modelo para estudiar el efecto de nuevos compuestos sobre la diferenciación y el crecimiento neuronal. Desafortunadamente, debido a la pandemia de COVID-19, se interrumpió el estudio y solo se obtuvieron resultados preliminares con *Nerve growth factor* (NGF), el cual potenciaba el número de células diferenciadas y la longitud de sus dendritas.

Palabras clave: Receptor sigma-1 (σ_1), *Nerve growth factor* (NGF), agonista, antagonista, enfermedad del Alzheimer (EA), dolor neuropático (DN).

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Receptores opioides

El descubrimiento de los receptores opioides se remonta a la década de 1950. Se caracterizaban por mostrar afinidad por la morfina, un alcaloide obtenido de la adormidera (*Papaver somniferum*), de la cual se obtiene un látex que se conoce como opio. La morfina actúa como agonista de los receptores, mientras que la naloxona fue el primer antagonista opioide ampliamente utilizado por la comunidad científica.

Los primeros receptores opioides fueron nombrados a partir de la primera letra de sus ligandos: receptores opioides mu (μ), involucrados en la analgesia inducida por morfina, receptores opioides kappa (κ) que mostraban afinidad por la ketazocina, y los receptores opioides sigma (σ) que mediaban los efectos psicotomiméticos inducidos por una mezcla racémica de SKF-10047 (benzomorfanos). Años más tarde, se identificó un nuevo receptor opioide en el conducto deferente de la rata, el cual fue nombrado delta (δ), que interactuaba con encefalinas. En 1982 se utilizó el isómero (+)-SKF-10047 para estudiar los sitios de unión de σ . Se observó que el receptor σ mostraba afinidad por (+)-SKF-10047, otros (+)-benzomorfanos y múltiples moléculas pequeñas estructuralmente diferentes entre sí, pero no interactuaba con péptidos opioides (encefalinas, dinorfinas y β -endorfinas), que son sustancias que se consideran los ligandos endógenos de estos receptores opioides. Por ello, se concluyó que el receptor σ no era un receptor opioide.

Posteriormente, se desarrolló un radioligando específico del receptor σ , conocido como [3H](+)-pentazocina, con el objetivo de perfilar el sitio de unión de los ligandos y conocer más ligandos selectivos. A partir de este momento se identificaron dos sitios de unión de receptores σ diferentes, que permitió clasificar los receptores como sigma-1 (σ_1) y sigma-2 (σ_2) y además se determinó la estructura del farmacóforo, que es la estructura química responsable de la especificidad en las interacciones. ^[1,2,3]

4.2 Receptor sigma-1

4.2.1 Características moleculares

El receptor σ_1 se caracteriza por mostrar una alta afinidad a los (+)-benzomorfanos, ditolilguanidina (DTG) y haloperidol. Es una proteína transmembrana formada por 223 aminoácidos que reside en la membrana del retículo endoplasmático (RE) del sistema

nervioso central (SNC) y en órganos periféricos como el hígado y el bazo. Se localiza mayoritariamente en los microdominios específicos del RE denominados membranas asociadas a mitocondrias (MAM) y puede translocarse dinámicamente entre las células. Los dominios MAM son una región especializada de la membrana del RE, rica en lípidos, que tiene contacto con la membrana mitocondrial. Por tanto, el receptor $\sigma 1$ está involucrado en diferentes procesos como la regulación de la homeostasis del calcio, la reducción del estrés oxidativo, el mantenimiento de la estabilidad de las MAM, la distribución de lípidos y el plegamiento de proteínas. [4,5,6]

Actúa como una chaperona molecular, participando en el proceso de plegamiento de otras proteínas. La proteína no está ligada a ATP y su regulación está controlada por ligandos no glicosilados. Los ligandos se clasifican en: agonistas, aquellos que activan el receptor para inducir una respuesta de señalización biológica o antagonistas, que inactivan el receptor atenuando la respuesta. [3]

El receptor $\sigma 1$ fue clonado en 1996 y reveló que, a pesar de estar conservado entre los vertebrados, no compartía una homología significativa con ninguna otra proteína codificada en el genoma de mamíferos. Su homólogo más cercano es la levadura C8-C7 isomerasa esterol codificada por el gen ERG2p, con una identidad del 30% y una similitud del 67%. La función de esta enzima es mover un doble enlace entre los carbonos C9 y C8 a C8 y C7. Sin embargo, el receptor $\sigma 1$ carece de esta actividad isomerasa. [3,7]

Su gen codificante en humanos es SIGMAR1 y se encuentra en la banda p13 del cromosoma 9. Tiene una longitud aproximada de 7kbp y contiene cuatro exones y tres intrones, donde el exón 3 es el fragmento más corto (93 pb) y el exón 4 el más largo (1132 pb). [5,8]

Es un polipéptido de 29 kDa y su estructura tridimensional ha generado siempre controversia. Los análisis de hidrofobia realizados en 1996 [9] postulaban que la estructura estaba formada por un único dominio transmembrana. No obstante, estudios posteriores predijeron un modelo transmembrana de dos dominios. Este modelo fue aceptado durante mucho tiempo y se ha usado como base estructural para estudiar el acoplamiento de los ligandos. Uno de los grupos de investigación que apoyaron esta hipótesis fueron *Aydar y colaboradores en 2002* [10]. Realizaron ensayos basados en la tinción de anticuerpos y definieron dos dominios transmembrana, el TM1 entre los aminoácidos 11-29 y el TM2 entre 80-100. [4]

En el año 2016 *Schmidt y colaboradores* [11] determinaron la primera estructura cristalina humana del receptor $\sigma 1$ utilizando difracción de rayos X. Se definieron con cinco

ligandos diferentes: PD 144418, haloperidol, NE-100, 4-IBP y (+)-pentazocina. En todas las estructuras el receptor cristalizó como un homotrímero con un único dominio transmembrana y se confirmó que estaba constituido por cinco hélices α y diez láminas β (Figura 1). Las hélices α incluían el dominio transmembrana, estando las hélices 4 y 5 incrustadas en la membrana, mientras que las láminas β formaban el dominio de unión de ligandos (Figura 2). [3,12]

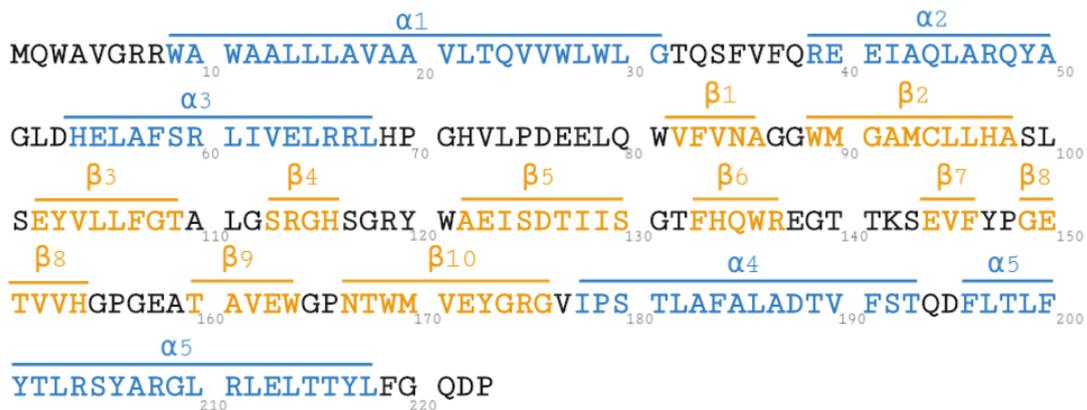


Figura 1. Secuencia de aminoácidos del receptor σ 1. Se muestran las hélices α en azul y las láminas β en naranja. Adaptación de Schmidt y colaboradores (2019). [3]

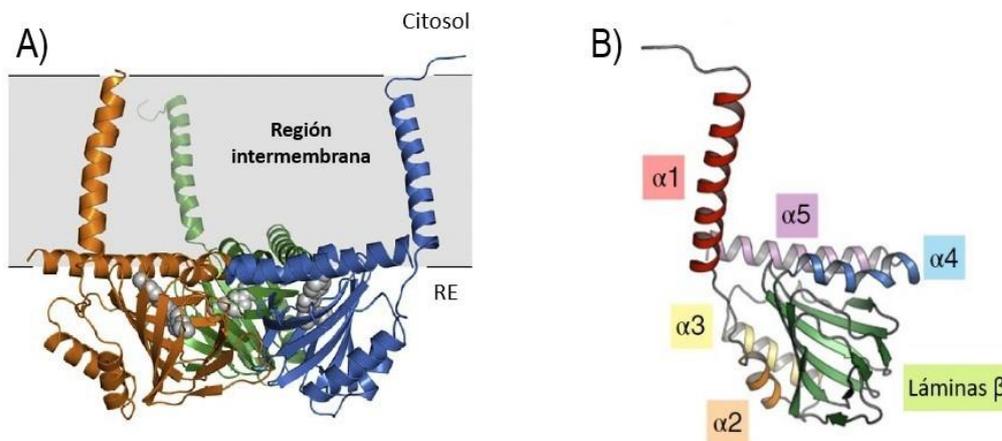


Figura 2. A) Representa la estructura del receptor σ 1. Cada monómero se observa en un color diferente. [3]
B) Muestra la estructura secundaria de un monómero con las hélices α y láminas β . [12]

4.2.2 Características fisiológicas

El receptor σ 1 es una proteína multitarea, por tanto, se clasifican sus funciones dependiendo de su localización: en la membrana del retículo plasmático (RE), membrana plasmática, membrana mitocondrial o membrana nuclear (Figura 3).

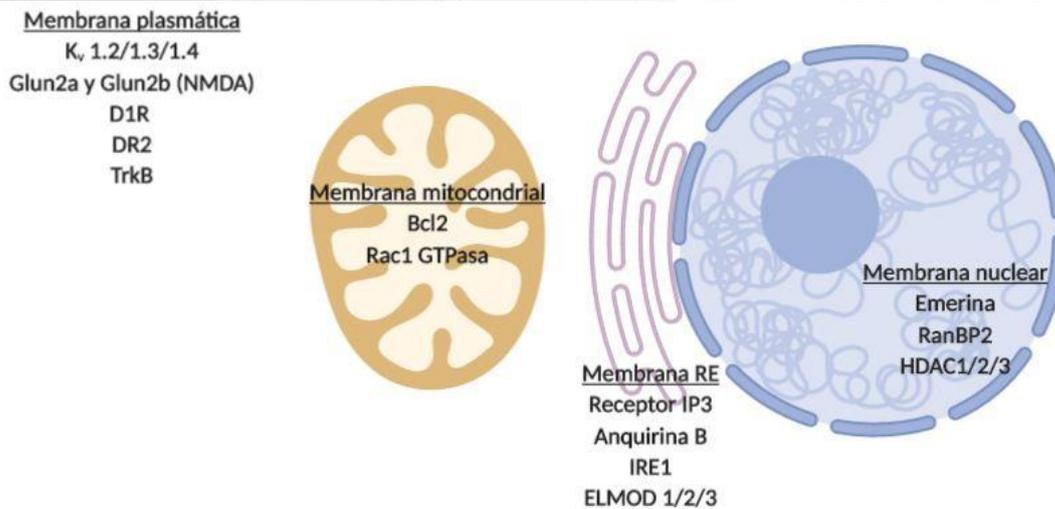


Figura 3. Diferentes localizaciones y proteínas con las que interactúa el receptor $\sigma 1$ después de translocarse de la región MAM. Elaboración propia.

Los primeros estudios propusieron que el extremo C-terminal tenía actividad chaperona en el RE, favoreciendo el correcto plegado de las nuevas proteínas sintetizadas. Las chaperonas son importantes porque protegen de las acumulaciones tóxicas de proteínas y promueven la supervivencia celular en condiciones de estrés. La proteína de unión de cadena pesada de la inmunoglobulina (BiP), codificada por el gen GRP78, regula la actividad chaperona de los receptores $\sigma 1$. Cuando el receptor $\sigma 1$ interactúa con BiP la actividad chaperona se reduce al mínimo, por el contrario, cuando ambos se separan el receptor $\sigma 1$ se transloca del RE a diferentes membranas y aumenta la actividad. Asimismo, los compuestos agonistas y las situaciones de estrés (como la baja concentración de Ca^{2+}) promueven la disociación del receptor $\sigma 1$ y BiP. Esto favorece la translocación del receptor $\sigma 1$ y la interacción con canales iónicos, quinasas y otros receptores, como IP3R3, lo que conllevaría una transferencia prolongada de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias. Contrariamente, los compuestos antagonistas refuerzan la unión con el objetivo de disminuir la actividad chaperona (figura 4). Se ha demostrado que la actividad chaperona del receptor $\sigma 1$ tiene efectos sobre numerosas funciones celulares como la señalización de Ca^{2+} , neurotransmisión, procesos redox, la actividad de los canales iónicos, formación de sinapsis y en procesos inflamatorios. Finalmente, se reveló que la sobreexpresión del receptor $\sigma 1$ o la interacción con un agonista podía proteger la célula frente situaciones de estrés del RE, mientras que el *knockdown* del receptor $\sigma 1$ o tratamiento con antagonistas podía debilitar las células. ^[1,3,6]

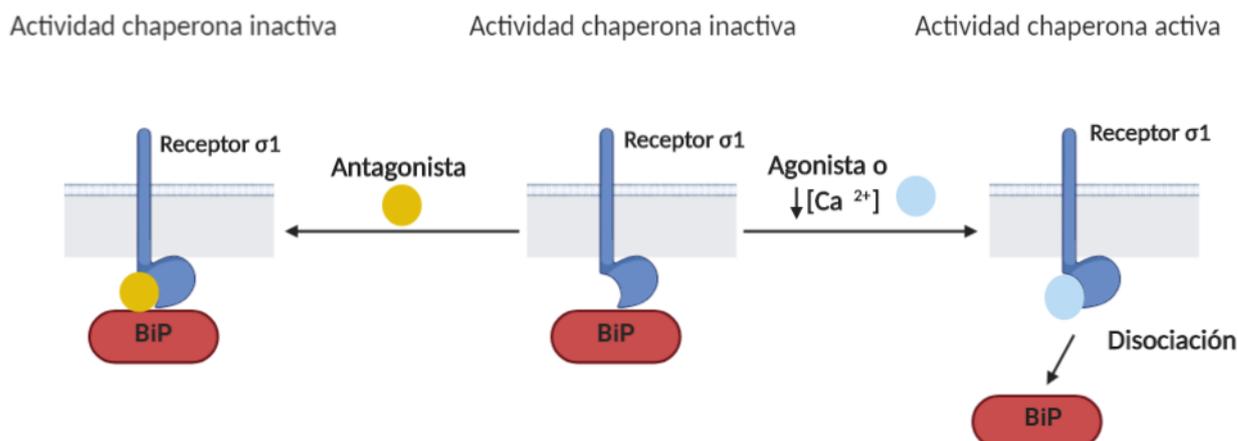


Figura 4. Regulación de la actividad chaperona por BiP. Adaptación de *Adaptación de Schmidt y colaboradores (2019)*.^[3]

- **En la membrana del retículo endoplasmático**

El receptor $\sigma 1$ modula diferentes vías de señalización, concretamente la del receptor acoplado a la proteína G (GRPC) y la de canales iónicos. Hasta la fecha, se ha notificado que el receptor $\sigma 1$ interacciona con aproximadamente 50 proteínas diferentes en estructura y secuencia. Para evaluar si los efectos de la modulación de vías de señalización eran causa directa de las interacciones se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) o ligadura de proximidad (PLA, del inglés *Proximity Ligation Assay*) combinados con ensayos bioquímicos y biofísicos. Se observó que el receptor era capaz de modular la proteína reguladora de la respuesta de estrés del RE (IRE1). Sus funciones principales son regular las vías de señalización y la producción de citocinas inflamatorias. Su activación está mediada por el ligando TLR4 pero se ha descrito que el *knockout* del receptor $\sigma 1$ también mejoraba su activación. Además, los receptores $\sigma 1$ podían bloquear los canales de potasio y formar un complejo trimérico con anquirina B y el receptor IP3, involucrados en la señalización del calcio.^[3,13]

- **En la membrana plasmática**

El receptor $\sigma 1$ influye en diferentes funciones sinápticas a través de las interacciones en la membrana plasmática. Se describió que facilitaba la neurotransmisión de los receptores NMDA, codificados por el gen NMDAR e involucrados en procesos como la memoria, aprendizaje, plasticidad neuronal y potenciación del hipocampo. Sin embargo, sus niveles fisiopatológicos pueden desencadenar excitotoxicidad.

Los canales de sodio con voltaje (Nav) están involucrados en la iniciación y propagación del potencial de acción de células nerviosas, musculares y neuroendocrinas. Se ha demostrado que su interacción con el receptor $\sigma 1$ altera el impulso eléctrico. Se cree

que es a través de este mecanismo que los ligandos sigma podrían intervenir en la sensibilidad dolorosa.

Finalmente, también hay interacción entre receptores σ_1 y receptores dopaminérgicos. Los receptores dopaminérgicos están involucrados en procesos cognitivos, de memoria y en funciones motoras. Se ha descrito la existencia de heterodímeros entre receptor σ_1 -D1 y receptor σ_1 -D2. [4,14]

- **En la membrana mitocondrial**

Diferentes autores han hipotetizado que los receptores σ_1 poseen importantes funciones sobre la mitocondria. Así, se han propuesto que, de algún modo:

1. Mantienen la integridad de la mitocondria

Los iones de Ca^{2+} que se liberan del RE a la matriz mitocondrial pueden afectar las funciones mitocondriales, como la activación de enzimas productoras de ATP o enzimas involucradas en procesos apoptóticos. El receptor σ_1 regula la homeostasis de la mitocondria interactuando con diversas proteínas. Una de las proteínas descritas mediante un ensayo de inmunoprecipitación fue la Rac1 mitocondrial, que regula los procesos de neurogénesis. El silenciamiento del receptor σ_1 en las neuronas conduce a unas mitocondrias más cortas y pequeñas con membranas aberrantes.

2. Mejoran la supervivencia celular y la respuesta al estrés en mitocondrias

El receptor σ_1 regula Bcl2 que es una familia de proteínas involucradas en procesos de permeabilización mitocondrial y relacionadas con procesos de apoptosis.

3. Regulan el estrés oxidativo y la autofagia

Se ha evidenciado que el receptor σ_1 está implicado en la neuroplasticidad mediante su interacción con la Rac1 GTPasa. Además, participa en mecanismos de neuroprotección, contrarrestando el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y regulando las respuestas al estrés oxidativo y procesos de autofagia. [15]

- **En la membrana nuclear**

El receptor σ_1 puede translocarse a las membranas nucleares externa e interna y regular procesos de transcripción mediante reclutamiento. Una vez localizado en la envoltura nuclear interacciona con la emerina, una proteína de membrana nuclear interior, y con la proteína Ran-binding2 (RanBP2), formadora del complejo de poros nucleares. [4,14]

Finalmente, también se ha estudiado la relación entre el receptor σ_1 y la proteína Tau. La proteína está relacionada con la estabilización del citoesqueleto neuronal. El receptor

$\sigma 1$ reduce la fosforilación de Tau mediante la regulación indirecta de la cinasa 5 dependiente de ciclina (cd5k), protegiendo la elongación de los axones. [5]

4.3 Receptor sigma-2

4.3.1 Características moleculares

El receptor $\sigma 2$ fue descubierto en 1990 y se caracteriza por su afinidad a DTG y haloperidol. A diferencia del receptor $\sigma 1$ no presenta afinidad por los (+)-benzomorfanos y se sabe relativamente poco sobre sus papeles biológicos y fisiológicos. Se destaca la importancia del haloperidol porque es un antipsicótico que muestra una elevada afinidad tanto para los receptores $\sigma 1$ y $\sigma 2$ como para los receptores dopaminérgicos. Se ha descrito su actividad como antagonista de receptores $\sigma 1$ y D2 y agonista de receptores $\sigma 2$. [16]

El receptor $\sigma 2$ es una proteína de membrana intracelular de 18-22 kDa localizada principalmente en el SNC, hígado y riñón, así como en líneas celulares de cáncer y tumores proliferantes. Se evidenció que el gen que codificaba para el receptor $\sigma 2$ no provenía de SIGMAR1, sin embargo, hasta el 2017 no se identificó la secuencia génica (figura 5). [3]

En 2006 *Colabufo y colaboradores* [17] propusieron que el receptor $\sigma 2$ era una histona. Posteriormente, estudios con ligandos fluorescentes debilitaron la hipótesis. En 2011 [18] se reveló que el sitio de unión del receptor $\sigma 2$ residía dentro del complejo de proteínas del componente 1 de la membrana del receptor de progesterona (PGRMC1). Esta hipótesis también fue descartada ya que los experimentos realizados con ligandos fluorescentes concluyeron que los niveles de unión del receptor $\sigma 2$ no se veían alterados si se sobreexpresaba o disminuía la expresión de PGRMC1. Finalmente, *Alon y colaboradores* en 2017 [20] purificaron el receptor $\sigma 2$ y determinaron que estaba codificado por TMEM97, una familia de genes transmembrana implicada en la homeostasis del colesterol. El ensayo se basaba en realizar una cromatografía de afinidad utilizando un ligando específico de $\sigma 2$ fijado en una columna con el fin de obtener las proteínas candidatas. Seguidamente, se identificaron mediante espectrometría de masas y se caracterizó su expresión y perfil farmacológico. [3,19,20]

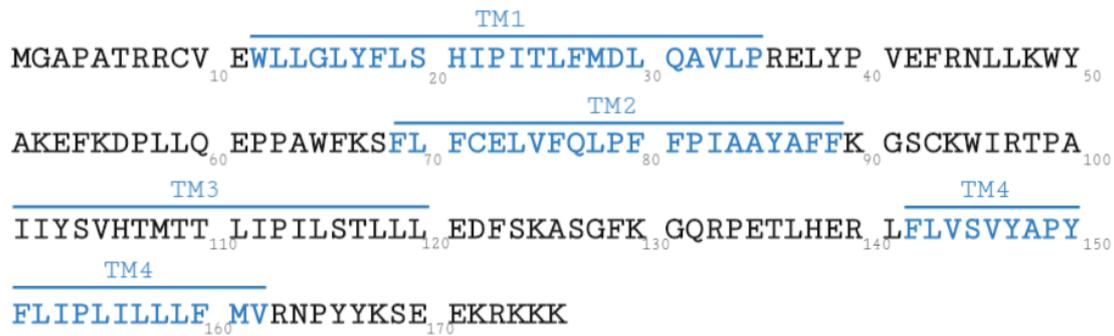


Figura 5. Secuencia de aminoácidos del receptor $\sigma 2$. En azul se indican las hélices transmembrana.^[20]

Si TMEM97 es el receptor $\sigma 2$ su expresión y perfil farmacológico debería ser idéntico. En primer lugar, se cuantificó la expresión mediante un *knockdown* del mRNA del gen TMEM97. Los resultados revelaron que la reducción de su expresión era similar a la del receptor $\sigma 2$. Posteriormente, el perfil farmacológico se evaluó sobreexpresando el gen TMEM97 humano en células de insectos que carecían de un homólogo endógeno a este y no mostraban afinidad por el ligando DTG. La expresión de TMEM97 reveló interacciones con DTG con unos valores dentro del rango establecido. Además, los experimentos de unión a ligandos evidenciaron que las afinidades que mostraban los ligandos por TMEM97 eran idénticas a las que mostraban por el receptor $\sigma 2$, y a la inversa. Por tanto, se concluyó que TMEM97 y el receptor $\sigma 2$ era la misma proteína.

Posteriormente, se realizó una mutagénesis dirigida de los residuos Glu y Asp para determinar los aminoácidos esenciales en la unión de ligandos. Se postuló que podían estar involucrados estos aminoácidos por la amina básica que caracteriza su estructura. Los resultados confirmaron que los aminoácidos esenciales eran Asp29 y Asp56.

El receptor $\sigma 2$ también se conoce como proteína asociada al meningioma (MAC30) y se ubica en el brazo 11.2q del cromosoma 17. La predicción conformacional evidenció que el receptor $\sigma 2$ estaba formado por 4 dominios transmembrana donde los dos residuos de Asp citados anteriormente estaban muy cerca (figura 6).^[3,20]

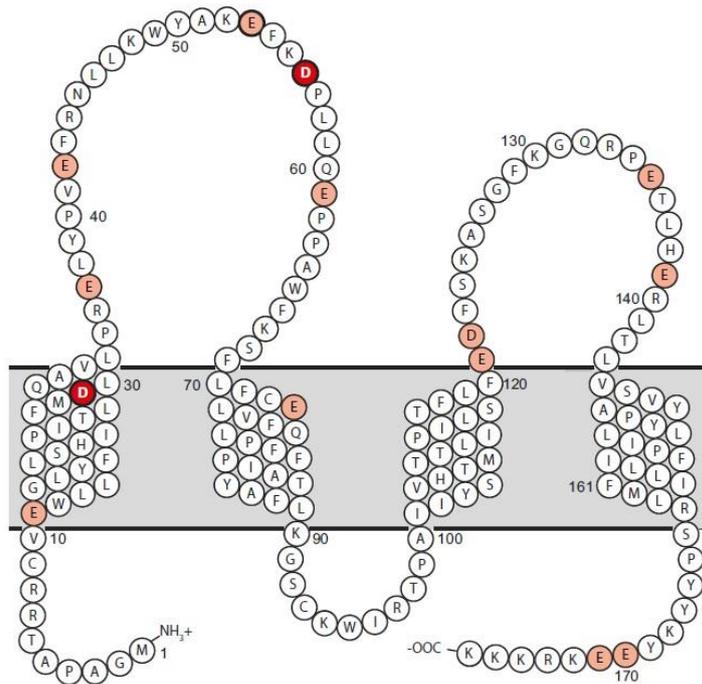


Figura 6. Predicción de la estructura del receptor $\sigma 2$. Se observan 4 dominios transmembrana con los residuos Glu y Asp mutados. Los residuos Asp29 y Asp56 en rojo intenso. [20]

Además, se observó la relación entre el receptor $\sigma 2$ y la proteína de unión emopamil (EBP), que es la isomerasa C8-C7 esteroide de mamíferos. Ambas pertenecen a la superfamilia EBP expandida (EXPERA), que es un dominio formado por 5 proteínas: EBP, EPBL, TMEM97, TM6SF1 y TM6SF2 implicado en la vía metabólica del colesterol.

Por lo tanto, aunque el receptor $\sigma 1$ y $\sigma 2$ no están relacionados genéticamente entre sí, sus homólogos más cercanos realizan la misma función y sus perfiles farmacológicos son similares. Es probable que sea consecuencia de la evolución convergente. [3,20]

4.3.2 Características fisiológicas

Desde hace muchos años, se determinó que el receptor $\sigma 2$ se sobreexpresaba en varias líneas celulares de cáncer de rata y humano. Destacan cánceres epiteliales, de pulmón, de colon, ovario y de mama. En algunos de ellos, la expresión del receptor $\sigma 2$ se ha correlacionado con un mal pronóstico que ha desarrollado metástasis.

Actualmente, las funciones en las que está involucrado el receptor $\sigma 2$ no están totalmente elucidadas. El receptor $\sigma 2$ está relacionado con la neurogeneración y se han definido compuestos afines que mejoran el crecimiento aberrante neuronal. Este procedimiento es fundamental para mantener la correcta función del sistema nervioso.

Finalmente, estudios recientes revelan que el receptor $\sigma 2$ participa en la homeostasis del colesterol, vinculándose al transportador de colesterol lisosómico NPC1. Sin embargo, el hallazgo de la secuencia abre puertas a próximas líneas de investigación que permitan comprender mejor los mecanismos de acción y efectos del receptor $\sigma 2$. [20,21]

En el proyecto en el que se enmarca este trabajo se pretende evaluar la actividad de compuestos sobre el receptor $\sigma 1$, por lo que a continuación se procede a una revisión de los datos más relevantes disponibles en la bibliografía.

4.4 Características farmacológicas del receptor sigma-1

4.4.1 Oligomerización

El año 2018 *Schmidt y colaboradores* [12] detallaron las diferencias conformacionales en el receptor $\sigma 1$ entre la interacción con agonista o antagonista. Se observó que existía en estados oligoméricos diferentes y el cambio estaba vinculado a la unión de ligandos. Se propuso un modelo que postulaba que la unión de agonistas promovía la disociación del receptor $\sigma 1$ en monómeros, estabilizando las especies con bajo peso molecular. De esta forma, se facilitaba la redistribución del receptor $\sigma 1$ a otros compuestos subcelulares y su interacción con diferentes proteínas. En cambio, los antagonistas estabilizaban la oligomerización y mantenían un elevado peso molecular. Por tanto, se sugirió que las formas oligoméricas interactuaban con los ligandos, mientras que las monoméricas perdían esta propiedad. Además, el estado monomérico obtenido tras la unión de un agonista a la forma oligomérica, es una conformación activa con capacidad de interacción con diferentes proteínas (figura 7). [4]

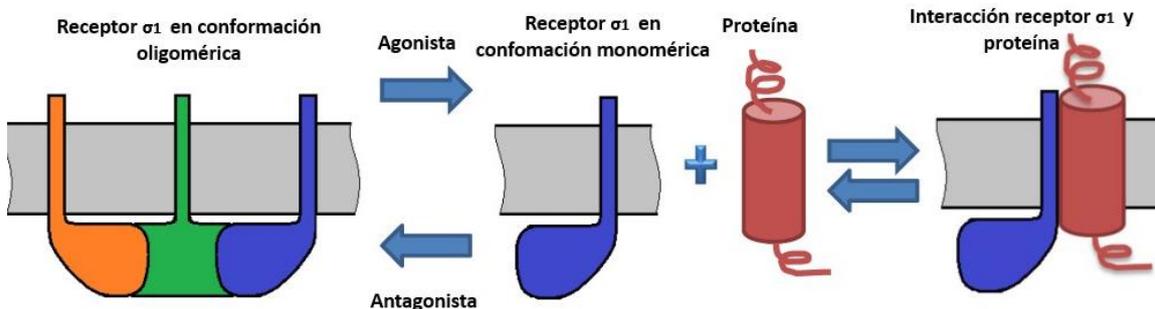


Figura 7. Modelo que representa las diferentes formas oligoméricas según la interacción con agonista o antagonista. [4]

La oligomerización del receptor $\sigma 1$ puede ser interrumpida por mutaciones en el motivo GxxxG que corresponden a los aminoácidos 87-91, los cuales forman una hoja β en el

dominio citosólico y son necesarios para la oligomerización y la unión de ligandos. La distancia entre los átomos de C_{α} y la Gly88 es de 6 Å en cada protómero. En consecuencia, mutaciones en este residuo pueden interferir estéricamente la asociación de subunidades, dando lugar a un estado monomérico. También se han relacionado con la reducción de expresión del receptor $\sigma 1$.

La oligomerización fue caracterizada por datos cristalográficos y permitió definir los aminoácidos involucrados en las interacciones entre subunidades. La superficie de trimerización está formada principalmente por residuos hidrofóbicos dentro de los extremos C-terminal de los dominios. Sin embargo, a pesar de la detallada caracterización de las diferentes formas de oligomerización que presenta el receptor $\sigma 1$, no se ha comprendido la importancia de las transiciones oligómero-monómero en la regulación de sus funciones. Se ha propuesto que podría estar vinculado con las interacciones entre proteínas. [3,22,23]

4.4.2 Farmacóforo y bolsillo de unión

La caracterización del farmacóforo ha sido un trabajo exhaustivo desde el año 1994. Se describieron diferentes modelos bidimensionales, pero no fue hasta el año 2005 cuando *Laggner y colaboradores* [24] presentaron el primer modelo tridimensional basado en 23 ligandos diferentes, entre ellos la (+)-pentazocina, como se ha comentado anteriormente. El farmacóforo consistía en dos regiones hidrofóbicas flanqueadas por una amina básica. La amina puede ser primaria, secundaria o terciaria. En caso de que sea cuaternaria, solo puede contener sustituyentes pequeños. Además, se midió una distancia de 6-10 Å entre el grupo amino y la región hidrofóbica primaria y de 2,5-3,9 Å entre el grupo amino y la región hidrofóbica secundaria (figura 8). [3,25,26]

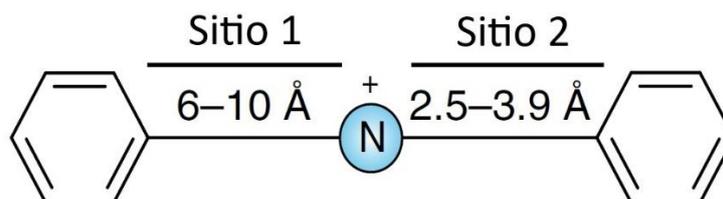


Figura 8. Farmacóforo con las dos regiones hidrofobas. [3]

El farmacóforo del ligando se une al bolsillo de unión del receptor $\sigma 1$ con una estequiometría 1:1, es decir, cada ligando se une a uno de los receptores (figura 9). El bolsillo de unión es una región hidrofóbica a excepción de dos residuos de aminoácidos y se ubica en el centro de las láminas β .

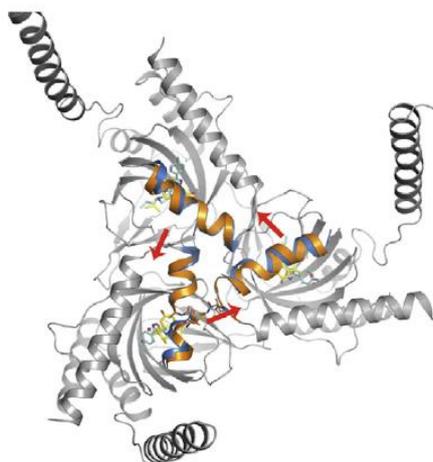


Figura 9. Se observa la estequiometría 1:1 ligando-receptor. [3]

Se necesita un modelo preciso del bolsillo de unión para comprender el mecanismo de entrada, así como su cinética de unión (figura 10). Estudios recientes basados en estructuras cristalinas revelaron que era capaz de unirse con alta afinidad a muchos ligandos estructuralmente diferentes. Generalmente, se forma una interacción electrostática entre el aminoácido conservado Glu172 del bolsillo de unión y el nitrógeno básico presente en el farmacóforo del ligando. Este enlace es estabilizado por la unión de Aps126 y Tyr103. También es importante que se adapte estéricamente.

Sin embargo, el receptor σ_1 puede unirse a algunos neuroesteroides que carecen del átomo de nitrógeno básico. La unión es de baja afinidad y se ha propuesto que tal vez la interacción tenga lugar porque el Glu172 se protone. No obstante, hasta el momento no se ha obtenido una estructura cristalina de esta unión. [3,4,26]

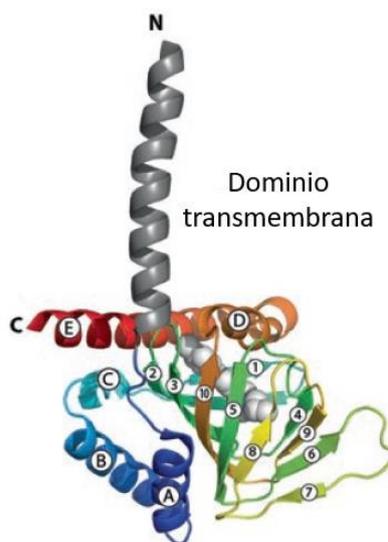


Figura 10. Diagrama de un protómero del receptor σ_1 unido al compuesto antagonista PD144418. El dominio transmembrana está coloreado de color gris. Las hélices α se numeran con letras, mientras que las hojas β con números. [26]

4.4.3 Cinética de asociación y disociación

La dinámica de los bolsillos de unión de proteínas es decisiva para su especificidad de interacción. Con el fin de obtener una mayor comprensión acerca de los procesos de asociación y disociación de los ligandos se realizaron análisis de cinética de unión. Para ello, se combinó la cinética del compuesto agonista (+)-pentazocina a diferentes concentraciones y su dinámica molecular (DM).

Los estudios informaron que era necesario un cambio conformacional del receptor que posibilitara la interacción con los ligandos. Los resultados sugirieron que la unión al receptor no era monofásica, sino que seguía un modelo de asociación de dos pasos (figura 11). El primer paso es la ruptura de los enlaces de hidrógeno específicos localizados entre Trp136 (cadena 6) y Ala161 (cadena 9), que permite la apertura de la “tapa”. Seguidamente, las láminas β se desplazan como consecuencia de la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre Glu123 (cadena 5) y Arg175 (cadena 10) y se abre el bolsillo de unión. Esta etapa sigue la cinética de reacción de orden cero, por lo tanto, no depende de la concentración y está representada por k_{lenta} . El segundo paso está formado por el acceso del ligando al bolsillo de unión y su posterior unión. Después de la interacción, el bolsillo vuelve a cerrarse. Esta etapa sigue una reacción de orden uno, donde la asociación del ligando es dependiente de concentración y está modelado por $k_{rápida}$. Por tanto, se propone un equilibrio entre la fase “lenta” caracterizada por el cambio conformacional del receptor y la fase “rápida” donde el ligando se une al receptor. [27]

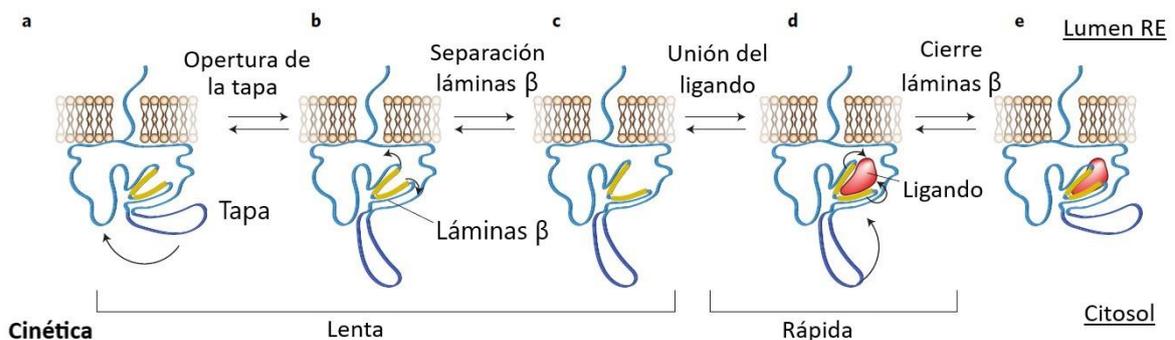


Figura 11. Modelo bifásico que explica los requisitos para la unión de ligandos. [27]

El proceso de disociación mostraba una cinética monofásica y era modelado por $k_{disociación}$. Además, se hipotetizó que podía haber cooperatividad en la unión de ligandos ya que las constantes $k_{rápida}$ y $k_{disociación}$ no variaban linealmente con la concentración y la curva de disociación era no lineal cuando se representaba en un formato semi-log. [12,27]

4.4.4 Ligandos endógenos

Hasta el presente no se han definido ligandos endógenos para los receptores σ_1 . Varias moléculas endógenas, entre las que se destacan los esteroides, principalmente la progesterona, esfingolípidos como la D-eritro-esfingosina y la N,N-dimetiltriptamina (DMT) interaccionan con los receptores σ_1 . No obstante, no se han relacionado con una regulación endógena del receptor σ_1 y unos estímulos extracelulares consecuentes. [28]

Los receptores σ_1 mostraron afinidad por la progesterona. Sin embargo, se determinó que las concentraciones de ésta a nivel fisiológico eran insuficientes en comparación a su K_d para el receptor σ_1 , de modo que no podía actuar como un ligando endógeno.

Otros ensayos determinaron que el alucinógeno DMT mostraba una afinidad de 14,75 μM para el receptor σ_1 , pero sus concentraciones plasmáticas no superaban los 500 nM, de tal forma que se dificultaba la unión entre ligando endógeno y receptor. Además, también se demostró que el DMT tenía una mayor afinidad con los receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT), vinculados con los efectos alucinógenos.

Finalmente, los valores de afinidad de la D-eritro-esfingosina por el receptor σ_1 eran diferentes según las condiciones establecidas por el ensayo y no se demostró que la unión tuviera lugar en células vivas. [3]

Recientes estudios, se centran en el estudio de la colina como ligando endógeno. Ésta se une a los receptores σ_1 y actúa como agonista, potenciando las señales de Ca^{2+} . [28]

4.4.5 Mutaciones

Las mutaciones en el receptor σ_1 pueden afectar a diferentes niveles moleculares. Se han caracterizado mutaciones que principalmente afectan a la pérdida de función, afinidad y oligomerización.

Las mutaciones de pérdida de función autosómica recesiva se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP) y enfermedad de Huntington (EH), lo que ha motivado que se propusieran que los agonistas de estos receptores pudieran ser útiles en trastornos neurodegenerativos. Se observan mutaciones que eliminan regiones funcionales del receptor, cambian la pauta de lectura, afectan a la región UTR o sustituyen un aminoácido en la proteína. En el último caso se destacan las mutaciones: L65Q, E102Q, E138Q, y E150K. La mutación L65Q introduce un grupo hidrófilo en una región hidrofóbica, dando lugar a una energía desfavorable. Glu102 es un aminoácido conservado, por tanto, una mutación en E102Q se ha

relacionado con la interrupción de los enlaces de hidrógeno necesarios para el plegado de los receptores y del ELA. La mutación de E138Q también dificulta enlaces de hidrógeno para el plegado y se ha vinculado con la neuropatía motora distal hereditaria. Finalmente, la mutación E150K es a nivel de codificación y se ha relacionado también con una disfunción motora. [3,4,23]

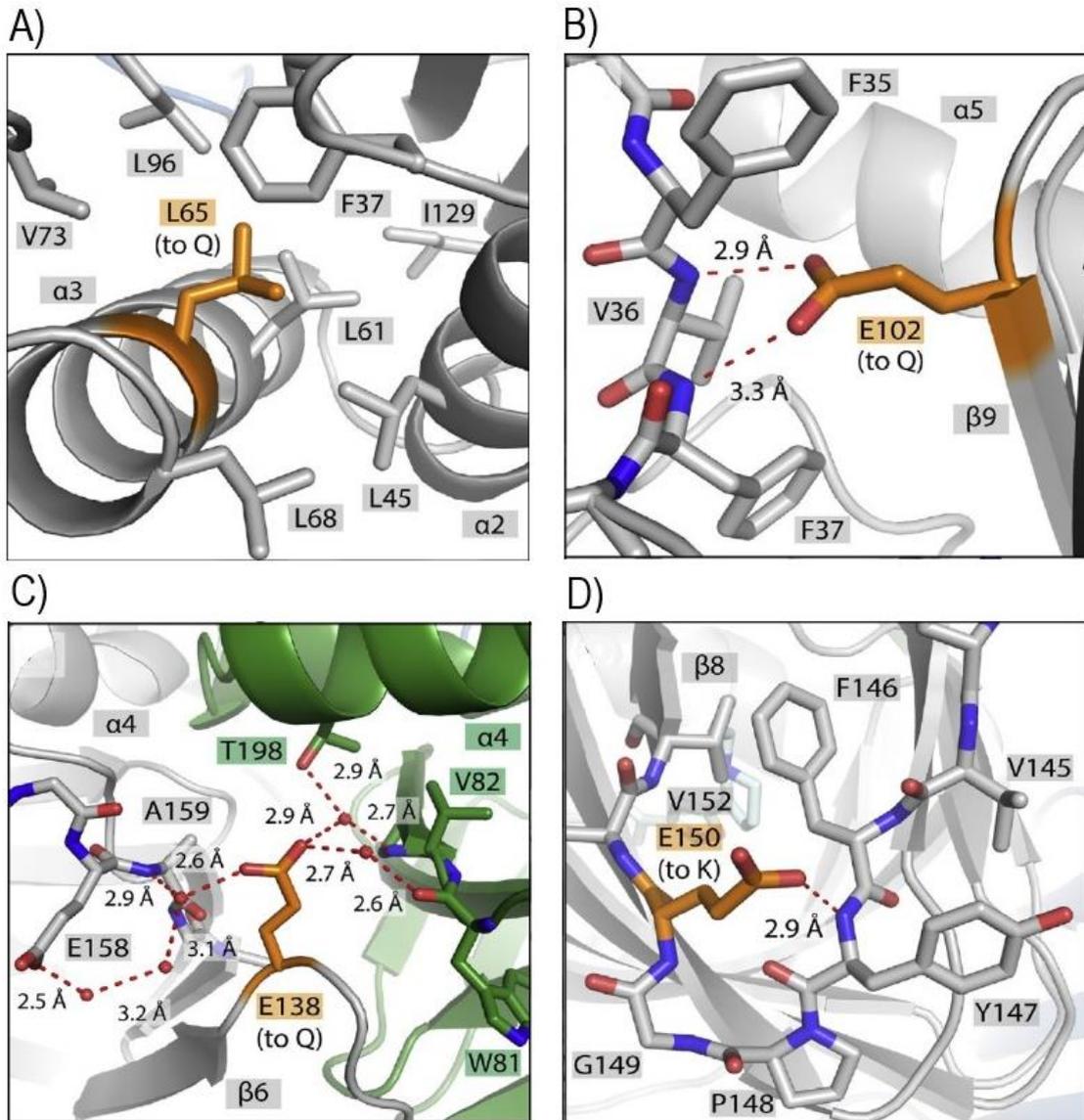


Figura 12. A) Mutación en L65. B) Mutación en E102. C) Mutación en E138. D) Mutación en E150. [3]

Las mutaciones también pueden afectar a la afinidad del ligando, bien se encuentren cerca o lejos del sitio de unión. Las sustituciones en D126 o E172 eliminan la afinidad del ligando mientras que el cambio en Y103 por fenilalanina (F) redujo la afinidad por el agonista (+)- pentazocina y el antagonista NE-100.

Finalmente se destaca una mutación en 119A que se encuentra entre las láminas $\beta 4$ y $\beta 45$ y desestabiliza la oligomerización. [3,4,23]

4.5 Agonistas

El receptor σ_1 se une a una gran cantidad de compuestos farmacológicamente activos con una elevada afinidad. Los agonistas de receptores σ_1 presentan una gran variedad de efectos en modelos experimentales y en humanos. Entre ellos se encuentran: (+)-benzomorfanos, neuroprotectores, antiamnésicos, psicotomiméticos y antidepresivos. Intervienen en procesos de memoria, cognición, depresiones psicóticas, delirio, acatisia y otros trastornos hiperkinéticos. Se destacan sus funciones de señalización, supervivencia y su capacidad de promover la plasticidad sináptica y la resistencia neuronal. Algunos agonistas actúan de forma selectiva y limitan sus efectos secundarios: (+)-benzomorfanos como (+)-pentazocina y (+)-SKF-10047 y antidepresivos como PRE-084. [1,29]

La primera estructura cristalina reportada del receptor σ_1 fue con el antagonista PD 144418 (figura 13). Como se ha comentado anteriormente, el receptor cristalizó como trímero y cada protómero estaba formado por un único dominio transmembrana con hojas β flanqueadas por hélices α . [3,12,29]

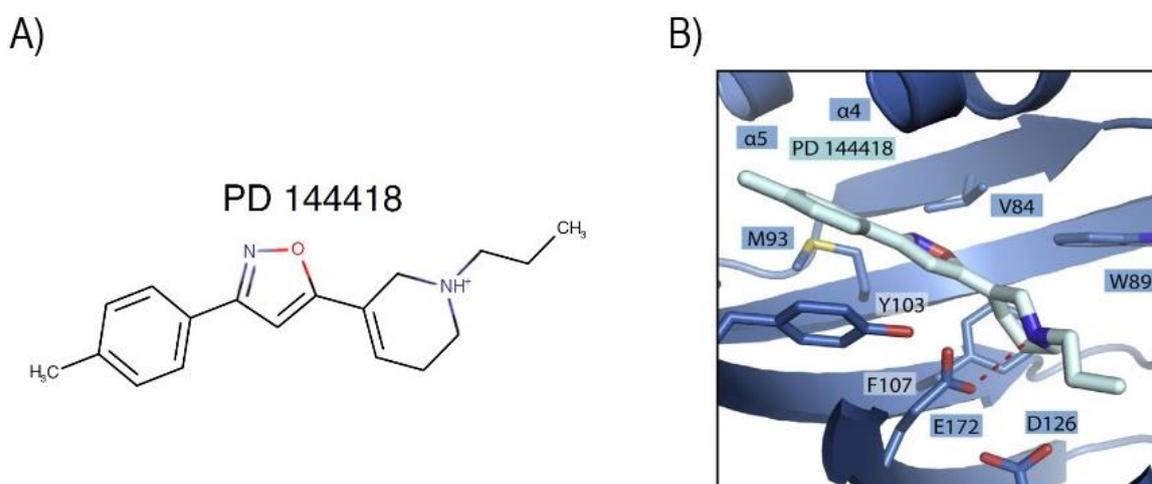


Figura 13. A) Estructura PD 144418 y B) Interacción en el bolsillo de unión. La línea discontinua roja indica la interacción electrostática entre Glu172 y el nitrógeno básico del ligando. [3]

Posteriormente, se propusieron diferentes estudios estructurales para comprender las bases moleculares de la unión de agonistas y antagonistas. En general, ambos cristalizan de manera similar y la forma del receptor no se altera de manera relevante. No obstante, en algunos compuestos hay una excepción. Si se compara la estructura cristalizada tras la interacción del receptor σ_1 con PD 144418 y el receptor σ_1 con el agonista (+)-pentazocina (figura 14) se observa que la hélice α_4 se aleja de la hélice α_5

aproximadamente 1,8 Å. El motivo de el reordenamiento estructural reside en que la (+)-pentazocina se localiza en un lugar diferente del bolsillo de unión que el resto de los ligandos. El sitio 1 del farmacóforo se sitúa más cerca de la hélice $\alpha 4$ y más lejos de la hélice $\alpha 5$. De esta forma, para evitar un choque estérico entre el residuo Ala185 de la hélice $\alpha 4$ y el anillo aromático de la (+)-pentazocina la hélice $\alpha 4$ se aleja del ligando. Por esta razón, se rompe el enlace electrostático entre Gln194 (cadena C) y la estructura principal de la cadena A. [12]

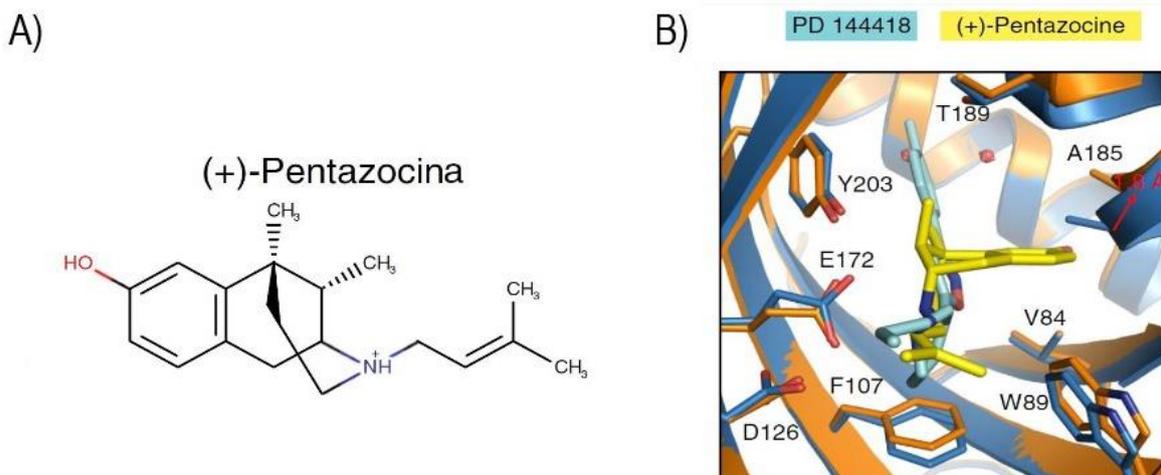


Figura 14. A) Estructura de la (+)-pentazocina B) Comparación de la unión al receptor $\sigma 1$ entre (+)-pentazocina y PD 144418. [3]

Estudios recientes describieron las uniones de diferentes compuestos agonistas para determinar si también se observaba un desplazamiento de la hélice $\alpha 4$. Los resultados revelaron que el agonista PRE-084 se acopló a la estructura del receptor $\sigma 1$ unido a la (+)-pentazocina y mostraron una conformación donde un anillo de carbono se localizaba muy próximo a la hélice $\alpha 4$. Este cambio conformacional, que no se observa en la unión a antagonistas por problemas estéricos, es importante para la eficacia de los agonistas. [12]

4.6 Antagonistas

Los compuestos antagonistas no están tan estudiados como los agonistas. Pueden mostrar efectos antipsicomiméticos, antinociceptivos y analgésicos, aunque una parte importante de estos efectos se deriva de su interacción con otras dianas. Los antagonistas específicos han sido propuestos como una idea innovadora y alternativa para tratar el dolor, concretamente el dolor neuropático. Este tipo de dolor es crónico y puede ser altamente invalidante para el individuo. Los antagonistas pueden combinarse con compuestos opiáceos y potenciar su efecto sin aumentar los efectos secundarios. Esto permite una reducción del uso de opiáceos que se refleja en una disminución de

efectos no deseados. [1,30] Además, también se ha propuesto identificar una molécula que actúe a la vez como antagonista de receptores σ_1 y agonista de receptores mu (μ). [31,32]

Con el objetivo de detallar las conformaciones estructurales del receptor σ_1 tras su interacción con antagonistas se utilizaron dos compuestos distintos estructuralmente: haloperidol, que muestra un efecto antipsicomimético (figura 15) y NE-100, que es selectivo (figura 16). Se observaron conformaciones similares entre ellas y en relación con las simulaciones sin ligandos, por lo que se prueba que el cambio conformacional de la hélice α_4 es consecuencia directa de la interacción con un agonista.

La molécula se acopla con una postura lineal al espacio libre de regiones hidrofóbicas del bolsillo de unión y tiene lugar la interacción entre el nitrógeno del farmacóforo y el residuo Glu172 del bolsillo de unión. La región hidrofóbica más larga se ubica cerca del espacio entre las hélices α_4 y α_5 , mientras que la más corta ocupa el fondo de las láminas β , cerca de Asp126. [3,12]

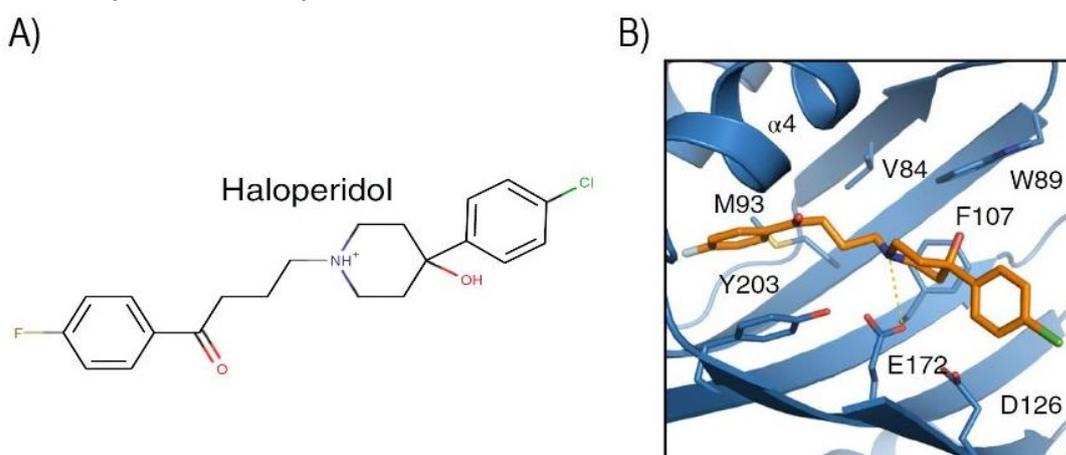


Figura 15. A) Estructura del haloperidol [3] y B) Unión haloperidol y receptor σ_1 . [12]

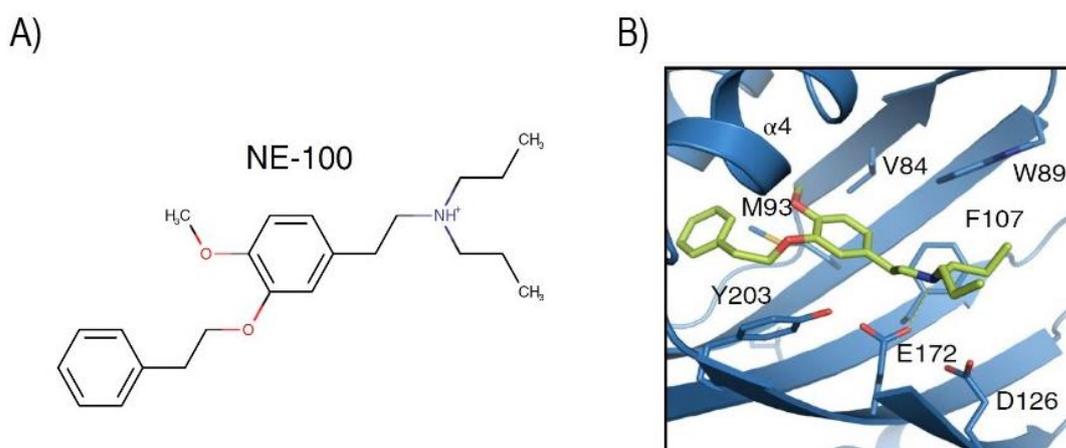


Figura 16. A) Estructura de NE-100 [3] y B) Unión NE-100 y receptor σ_1 . [12]

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías multifactoriales caracterizadas por la pérdida progresiva de la integridad neuronal. Este trabajo se centra en la enfermedad del Alzheimer (EA) y el dolor neuropático (DN). Los medicamentos actuales están relacionados con el tratamiento sintomático de estos trastornos y sólo permiten una resolución parcial de la afectación del paciente. Es necesario identificar una nueva diana terapéutica que proteja y restaure la integridad neuronal o actúe de manera más satisfactoria en el control del dolor neuropático.

Para ello, y por lo que se refiere a los trastornos degenerativos, es importante comprender mejor los mecanismos y procesos que intervienen en la neurodegeneración y regeneración. En los últimos años ha surgido una estrategia innovadora que se basa en fármacos que actúan sobre diferentes dianas, capaces de modular simultáneamente diferentes mecanismos patológicos implicados en estas enfermedades. ^[33]

Por tanto, la **hipótesis** del proyecto en el que se enmarca este trabajo es que ***los fármacos que actúen frente a la epóxido-hidrolasa soluble (sEH: soluble epoxide-hydrolase) y sobre el receptor σ 1 al mismo tiempo puedan dar origen a fármacos que curen o retrasen estas enfermedades.*** Se han escogido estas dianas porque modulan vías y mecanismos involucrados en la aparición de EA y DN.

Se ha sintetizado ya una familia de 30 moléculas que son potentes inhibidores del sEH (sEHI) y ligandos selectivos del receptor σ 1. Los sEHI son de interés para la EA y DN, pero la actividad de los ligandos sobre el receptor σ 1 depende de si son agonistas o antagonistas.

En estudios previos se han seleccionado los compuestos que actúan de forma dual y se han evaluado las propiedades DMPK (*Drug Metabolism and Pharmacokinetics*). Posteriormente, se ha llevado a cabo este trabajo que presenta como **objetivo la evaluación farmacológica in vitro de esta serie de compuestos para determinar su efecto agonista o antagonista mediante la utilización de un modelo in vitro con células PC12**. Si actúan como agonistas pueden ser desarrollados como neuroprotectores, y por lo tanto pueden ser de interés para la EA, mientras que si su efecto es antagonista actuarán como analgésicos y serán de interés para el DN.

6. METODOLOGÍA

En este apartado se realiza una descripción de la línea celular.

6.1 Sustrato biológico

Para llevar a cabo este estudio se utilizan células PC-12 (ECACC 88022401). Es una línea celular derivada de un feocromocitoma de la médula suprarrenal trasplantable de rata inicialmente aislada en Estados Unidos. Ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudiar la diferenciación y el crecimiento neuronal. Responde de forma reversible al factor de crecimiento neuronal (NGF) mediante la inducción del fenotipo neuronal. Crecen en suspensión y se ha observado que su crecimiento en presencia de colágeno da lugar a fibroblastos neuronales mientras que la ausencia muestra racimos esféricos.

24 horas después de la post resucitación:

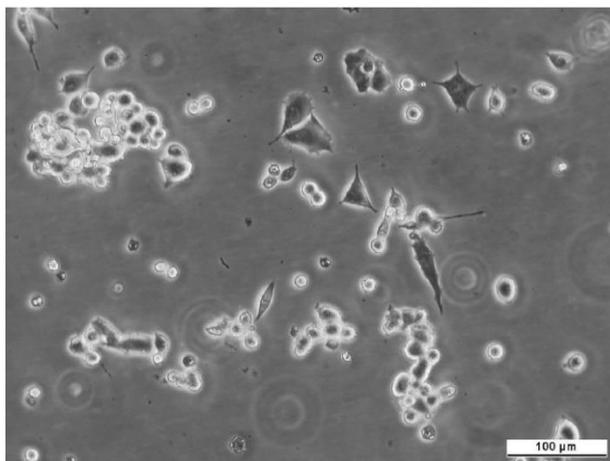


Figura 17. Células PC12 24h después de la post resucitación (Ficha técnica del producto. ECACC).

Antes de la criopreservación (cultivado en colágeno tipo IV):

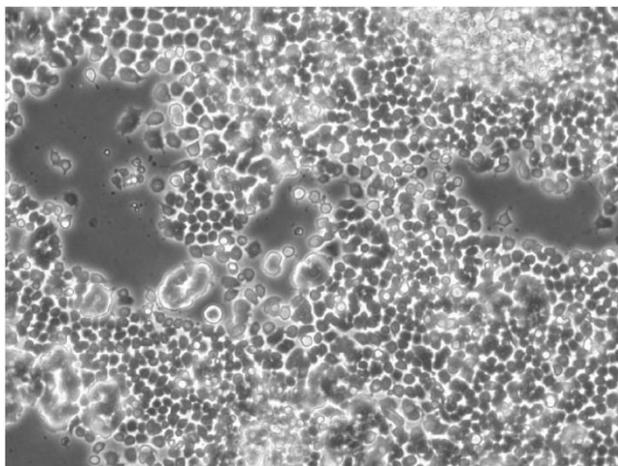


Figura 18. Células PC12 previo a la criopreservación. (Ficha técnica del producto. ECACC).

6.2 Material

Productos bioquímicos para el mantenimiento y diferenciación de la línea celular.

- *Nerve growth factor-2.5S from murine submaxillary gland* (NGF). Polvo liofilizado, adecuado para el cultivo de células. Referencia del producto: N6009-4X25UG (Merck Sigma-Aldrich)
- *Collagen from human placenta*. El colágeno tipo IV se localiza en la membrana basal y son proteínas formadoras de redes. Entre muchas de sus aplicaciones, se ha destacado su papel en la diferenciación de células pluripotentes de rata. Referencia del producto: C5533-5MG (Merck Sigma-Aldrich)
- *Horse serum heat inactivated* (HS). Referencia del producto: H1138-500ML
- *RPMI-1640 Medium*. Con bicarbonato de sodio, sin L-glutamina, líquido, filtrado estéril, apto para cultivo celular. Referencia del producto: R0883-500ML (Merck Sigma-Aldrich)
- NE-100. Es un potente y selectivo antagonista del receptor σ_1 con un valor IC_{50} de 1,54 +/- 0,26 nM para los receptores σ_1 . Referencia del producto: SML0631-5M (Merck Sigma-Aldrich)
- PBS estéril. Referencia del producto: P3813 (Merck Sigma-Aldrich)
- *Penicillin-Streptomycin* (PS; 5,000 U/mL). Se utiliza para impedir la contaminación bacteriana de los cultivos celulares debido a su eficaz acción combinada contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Referencia del producto: 15070063 (Thermofisher Gibco)
- *StemPro™ Accutase® Cell Dissociation Reagent*. Solución de enzimas proteolíticas y colagenolíticas que se utilizan para disociar las aglomeraciones celulares de los plásticos. Referencia del producto: A1110501 (Thermofisher Gibco)
- *Fetal Bovine Serum* (FBS) Referencia del producto: 10500-064 (Thermofisher Gibco)

6.3 Protocolos y mantenimiento

Una vez se han recibido las células es aconsejable preparar el stock propio congelado.

Congelación

1. Observar que las células están en la fase logarítmica del crecimiento para llevar a cabo el procedimiento
2. Se recomienda congelar las células en una solución de crioconservación formada por un 90% de suero y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO Referencia del producto: D8418) (Merck Sigma-Aldrich)
3. Centrifugar las células a 150 x g durante 5 minutos para formar un pellet. Resuspenderlo en una solución de criopreservación
4. Congelar el vial de células con una tasa de 1-3°C /minuto. Posteriormente, se transfiere a un congelador a -80 °C durante 24 horas y finalmente a un recipiente con nitrógeno líquido en fase gaseosa

Descongelación y mantenimiento

1. Transferir el vial a un baño de agua a 37°C durante 1-2 minutos. La descongelación rápida es esencial
2. Limpiar el vial con EtOH al 70% antes de abrir
3. Abrir y pipetear todo el contenido a un tubo Falcon de 15 ml estéril. Añadir lentamente 5 ml de medio completo (CM; ver composición más adelante)
4. Contar las células viables y ajustar a 20.000-40.000 células/cm² (aproximadamente 1,5 -3 Mcélulas/por placa de Petri de unos 100 mm de diámetro o en un frasco de cultivos de 25 cm²)
5. Después de incubar toda la noche en incubador celular, se debe centrifugar 4 minutos a 140 x g en centrífuga con rotor basculante (IEC Centra MP4R) y descartar el sobrenadante. Adicionar suficiente CM en las condiciones deseadas hasta que se alcance la densidad requerida
6. Incubar a 37°C en CO₂

Para las células adherentes, una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células pueden ser pasadas a otros frascos en relación 1:2 o 1:3 o congeladas. En este caso, al crecer en suspensión, los pases se realizaban cada 5-7 días.

Preparación de la solución de colágeno y recubrimiento

Las células crecen formando pequeñas agrupaciones (racimos) pero se adhieren poco al plástico. Se utilizan frascos recubiertos de colágeno para fijar las células y facilitar su crecimiento. Se utiliza colágeno de placenta humana del tipo IV, el cual requiere una preparación:

1. Añadir 5 mg de colágeno a una solución estéril de ácido acético anhídrido de 50 ml 0,1 M para obtener una solución de colágeno al 0,01%. Es decir, 0,285 ml de ácido acético y 49,715 ml de H₂O estéril
2. Disolver durante varias horas a una temperatura entre 2-8 °C y agitar en ocasiones hasta su completa disociación

Las placas de plástico de cultivo de 24 pocillos se colagenaron con un volumen de 0,5 ml por cada pocillo y se dejaron secar al aire en cabina de flujo laminar (3-4 h). Otra manera de recubrir las placas de plástico puede ser preincubando la solución durante la noche a 2-8 °C, o varias horas a 37 °C, sin secado al aire. En todas las ocasiones se optó por la primera opción descrita.

Las placas recubiertas secas pueden esterilizarse durante la noche mediante la exposición a la luz UV en una campana de cultivo estéril o mediante el lavado con etanol al 70%.

Preparación de medios de cultivos

Para los medios de cultivo se usa el medio basal RPMI 1640. En su composición se destaca la presencia del rojo fenol (indicador de pH) y la ausencia del aminoácido L-glutamina. Esto es debido a que, en solución acuosa, la glutamina tiende a metabolizarse a glutamato. Por ello, en primer lugar, se prepara una solución madre de glutamina a partir del reactivo en polvo que aporte la cantidad deseada de este aminoácido. Se pesan 30 mg de glutamina en la balanza analítica y seguidamente se disuelven en 10 ml de RPMI 1640. A continuación, se esteriliza la solución mediante un filtro para jeringa de 0,22 µm de poro por presión positiva. Se utilizaron dos tipos de medio completo (*Complete medium*: CM). La diferencia principal entre ambos medios radica en que el CM se usa para incubar las células y que proliferen, mientras que el CM Low es eficaz para la adhesión de las células en placas colagenadas y posteriormente diferenciarlas con NGF.

Preparación 50 ml CM:

- 5 ml de la solución madre de Gln
- 5 ml *horse serum* (HS)
- 2,5 ml *fetal bovine serum* (FCS)
- 0,5 ml de antibiótico penicilina-streptomina (P/S)
- 37 ml de RPMI 1640

Preparación de 25 ml de CM Low:

- 2,5 ml solución madre de Gln
- 125 µl FCS
- 250 µl P/S
- 22,125 ml RPMI 1640

Los medios de cultivo se almacenan en frascos y se conservan en el frigorífico. Han sido empleados en un período máximo de una semana para evitar la degradación de los principios activos presentes en los sueros.

Mantenimiento diario

Las células PC12 forman colonias que son difíciles de disociar mediante el uso de pipetas. Para su disociación es necesario incubar con Accutase® (Gibco) o EDTA-Tripsina. El preparado Accutase® afecta menos la viabilidad celular, por lo que se utilizó durante toda la estancia de prácticas. El uso de EDTA tripsina puede ser una alternativa igual de eficaz, pero exige un control más estricto de los tiempos de incubación.

1. Para llevar a cabo este procedimiento se transfieren células PC12 del frasco a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml en cabina de flujo laminar
2. Centrifugar a 140 x *g* (900 rpm) durante 4 minutos en centrífuga con rotor basculante
3. Descartar sobrenadante
4. Añadir 5ml de PBS estéril con una pipeta y resuspender. El PBS es un tampón isotónico y no tóxico para las células. Se utiliza para diluir sustancias para el cultivo celular y para lavar células a través de centrifugación. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio
5. Centrifugar a 140 x *g* (900 rpm) durante 4 minutos
6. Descartar sobrenadante
7. Añadir 1 ml de *Accutase*® y resuspender con una pipeta Pasteur estéril

8. Incubar en incubador de CO₂ a 37°C durante 15 minutos. A los 7 minutos aproximadamente agitar suavemente para favorecer a la disociación
9. Pipetear con la pipeta Pasteur diversas veces y añadir 5 ml de CM
10. Centrifugar y resuspender en 5 ml de CM. Pipetear con una pipeta Pasteur estéril
11. Contar células y en caso de ser necesario, hacer un *splitting* 1:2 o 1:3. El *splitting* se realiza completando el frasco hasta los 28 ml con CM y después dividiendo el volumen en dos de 75 cm² (14 ml en cada uno)

6.4 Diferenciación con NGF

Como se ha comentado anteriormente, las células PC12 son un modelo experimental para estudios neuronales. Se caracterizan por su respuesta frente a la administración de factores neurotróficos, como el factor de crecimiento neuronal (NGF), de manera dependiente de la dosis. Se observa una diferenciación en fenotipos similares a las neuronas, el crecimiento de dendritas y la expresión de diferentes proteínas neuronales específicas. ^[34]

6.5 Potenciación

La diferenciación inducida por la administración de NGF a las células PC12 puede verse potenciada mediante el tratamiento con agonistas selectivos del receptor σ_1 , como SKF-10047 y PRE-084, donde se observa un incremento en el número de dendritas y en su longitud. Por el contrario, este efecto puede bloquearse al adicionar antagonistas selectivos del receptor como NE-100.

Lo que se pretende es reproducir los resultados obtenidos por el grupo de Rossi (2011).^[35]

En la Figura 19 se representa la potenciación del efecto de inducción de diferenciación neuronal. En este caso, se ha utilizado el agonista PRE-084 a diferentes concentraciones y el NGF a 2,5 ng/mL.

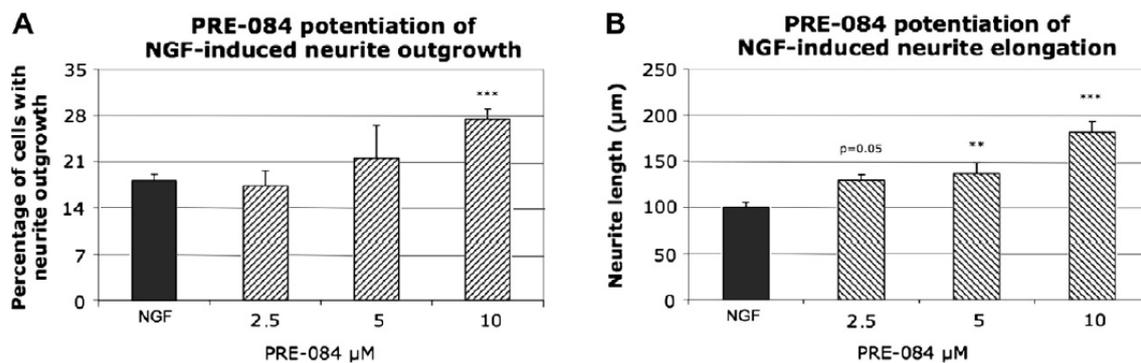


Figura 19. En la figura A se observa la relación entre el incremento de concentración de PRE-084 y las células con dendritas. En la figura B se representa el aumento de la longitud de las dendritas en relación a la concentración de PRE-084. ^[35]

6.6 Tratamiento de los datos y estadística

Todas las imágenes se cuantificaron con el programa de microscopía ToupView 3.7 (ToupTek). Los datos se trataron con GraphPad Prism 5.0 tanto para los gráficos como para la estadística. Para el tratamiento estadístico se aplicó ANOVA con prueba de comparación de medias de Tukey y significación estadística a partir de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

En primer lugar, con el objetivo de determinar la concentración óptima de NGF, se realizó un ensayo con concentraciones progresivas desde 2,5 ng/mL hasta 30 ng/mL. En cada pocillo se añadieron 5 μ l de la solución del factor de crecimiento (figura 20).

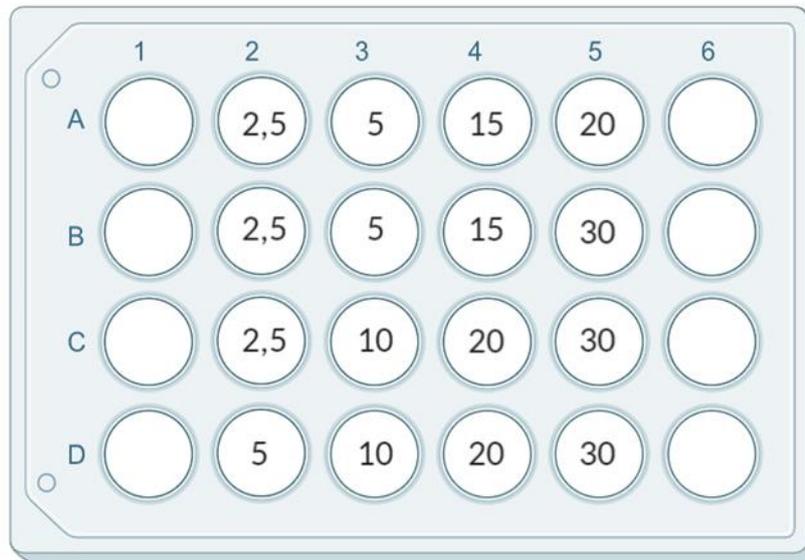


Figura 20. Pocillos con diferentes concentraciones de NGF.

El ensayo con diferentes concentraciones de NGF permite obtener una curva concentración-respuesta. Los cultivos son visualizados en un microscopio Nikon Eclipse TE200. A continuación, se muestran las imágenes representativas de cada uno de los pocillos (20x). Se indican con flechas blancas las células PC12 que se consideran diferenciadas por la presencia de neuritas.

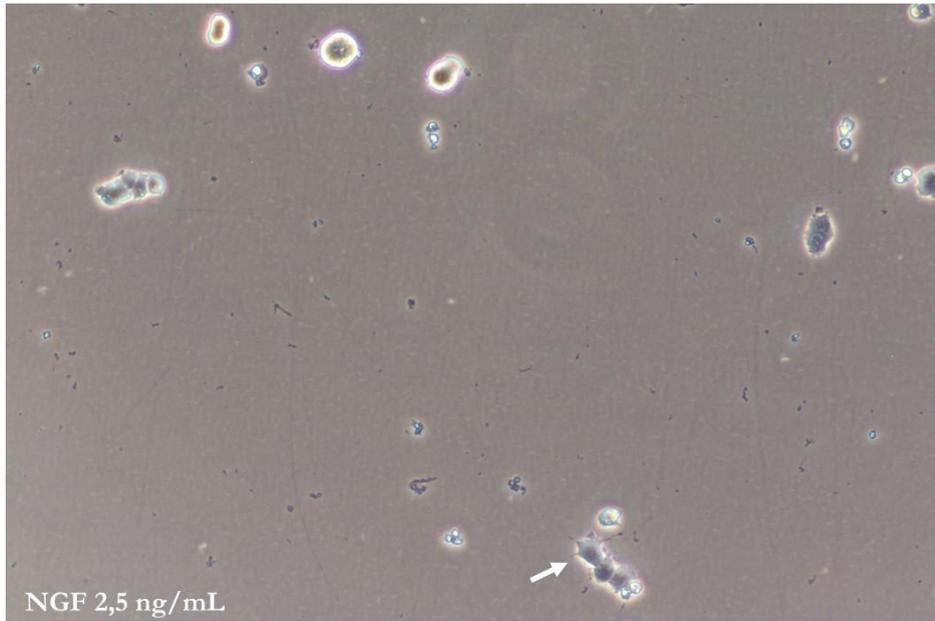


Figura 21. Células PC12 diferenciadas con NGF 2,5 ng/mL.



Figura 22. Células PC12 diferenciadas con NGF 5 ng/mL.

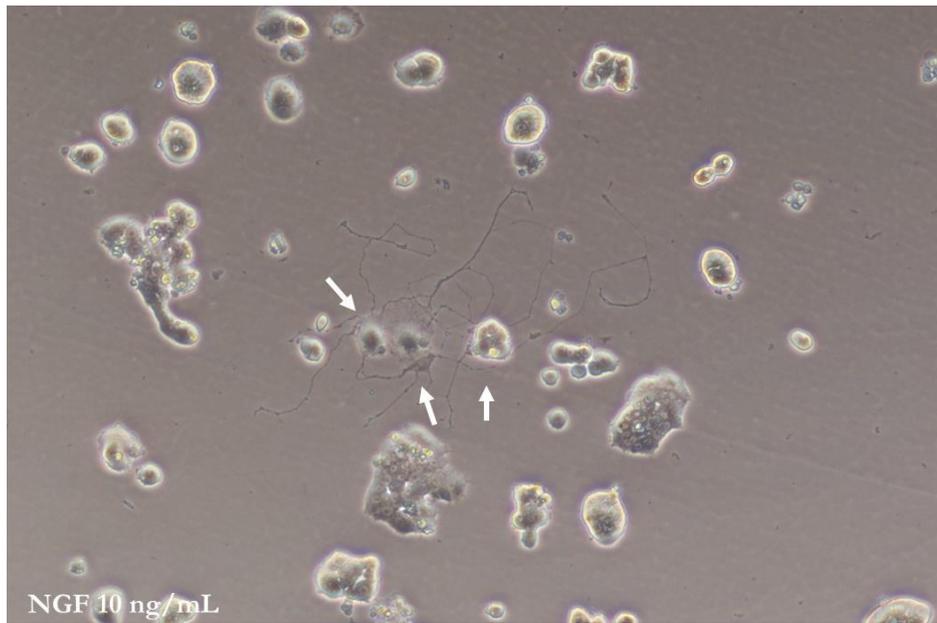


Figura 23. Células PC12 diferenciadas con NGF 10 ng/mL.

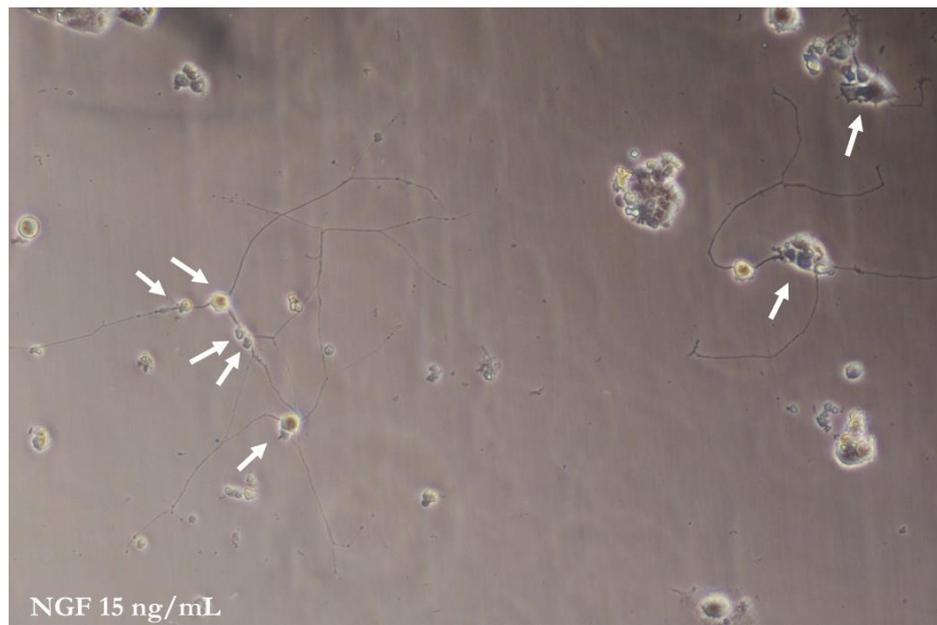


Figura 24. Células PC12 diferenciadas con NGF 15 ng/mL.

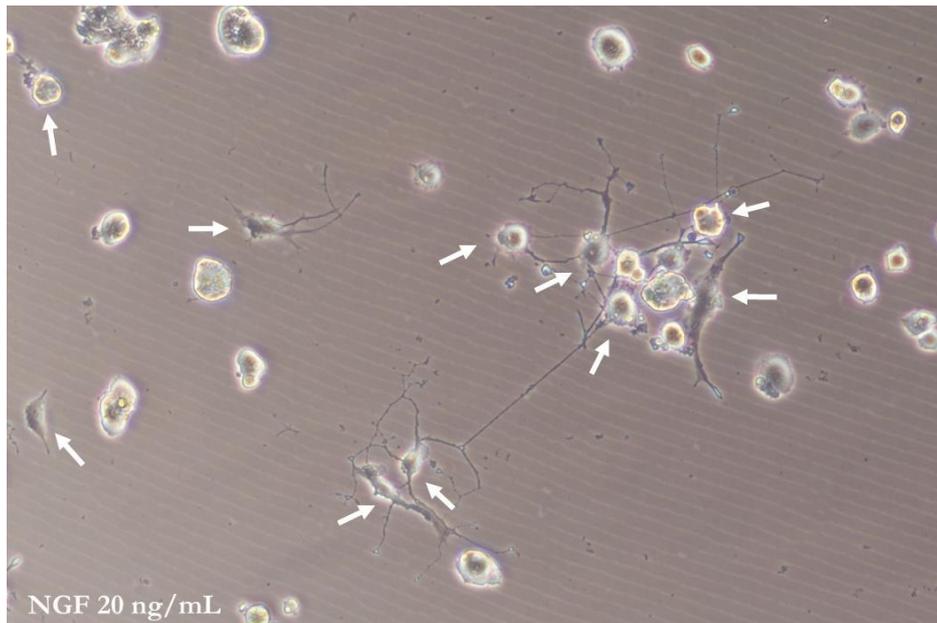


Figura 25. Células PC12 diferenciadas con NGF 20 ng/mL.

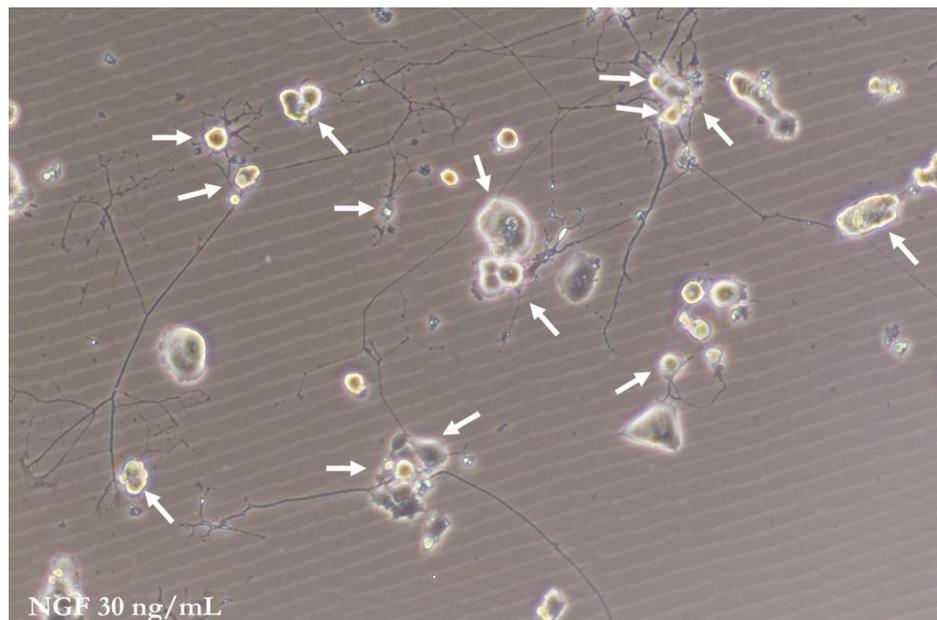


Figura 26. Células PC12 diferenciadas con NGF 30 ng/mL.

Estas imágenes fueron cuantificadas con la ayuda del software de control de la cámara acoplada al microscopio. Se midieron tanto el porcentaje de células diferenciadas como la longitud de dendritas por células ($\mu\text{m}/\text{cel}$). En la figura 27 se observa la cuantificación de la imagen tomada del pocillo con NGF 30 ng/mL como ejemplo.

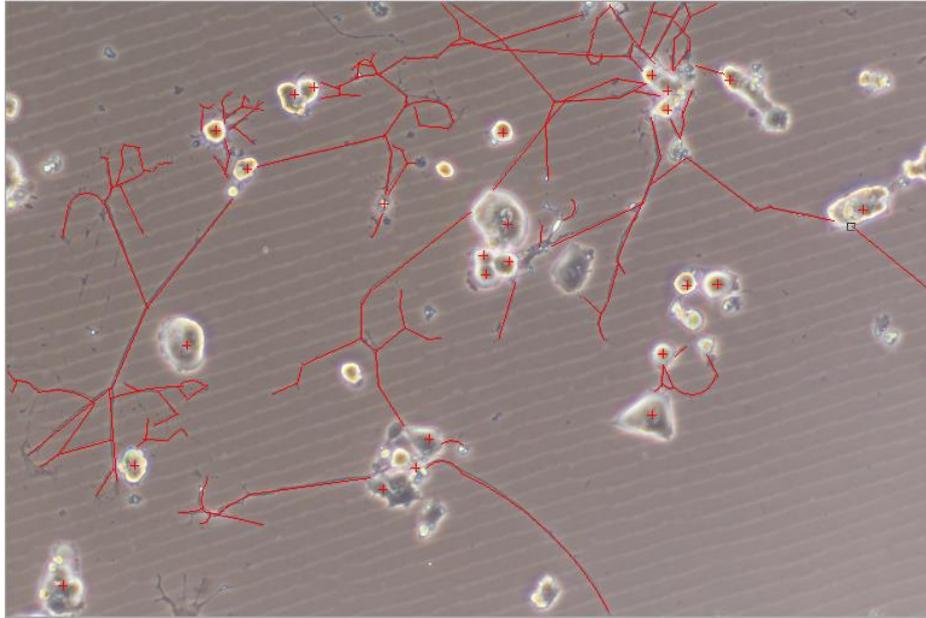


Figura 27. Cuantificación de células PC12 diferenciadas con NGF 30 ng/mL.

Los resultados obtenidos tras la medición se expresan en dos gráficas. En primer lugar, se representó el log [NGF] ng/mL respecto al porcentaje de células PC12 diferenciadas, obteniéndose la siguiente curva concentración-respuesta (figura 28).

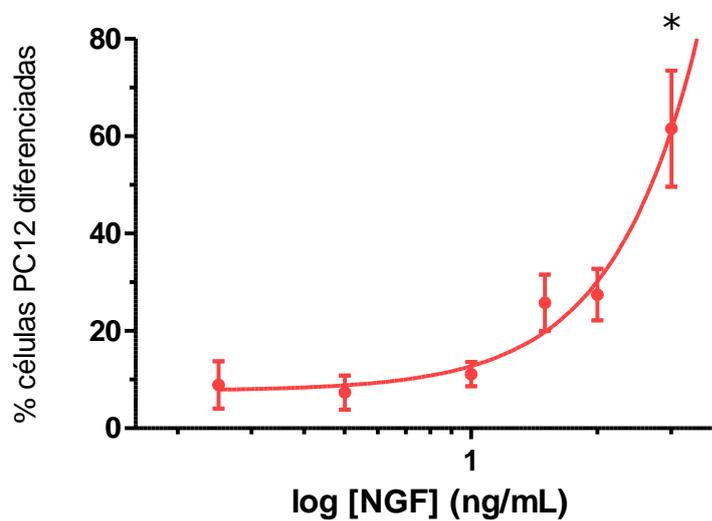


Figura 28. Curva concentración respuesta de NGF sobre la diferenciación de células PC12. Los datos son la media de 2-3 campos representativos para cada una de las concentraciones \pm error estándar. El asterisco indica la significación estadística $p < 0.05$ respecto a las otras concentraciones excepto para 15 ng/mL.

Además, también se representó el [NGF] ng/mL frente la longitud de dendritas por células ($\mu\text{m}/\text{cel}$) (figura 29).

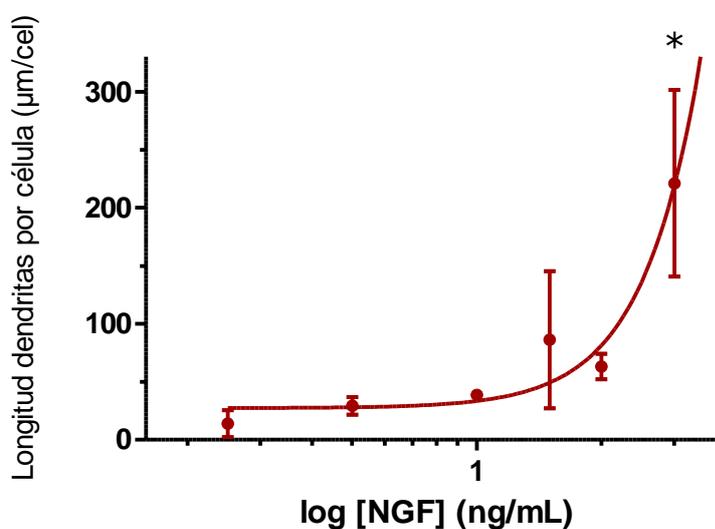


Figura 29. Curva concentración respuesta de NGF sobre la longitud de las dendritas de las células PC12. Los datos son la media de 2-3 campos representativos para cada una de las concentraciones \pm error estándar. El asterisco indica la significación estadística $p < 0.05$ respecto a la concentración de 2,5 ng/mL.

Debido al confinamiento derivado de la pandemia de COVID-19 se interrumpió el estudio y solo se obtuvieron estos datos preliminares. Resultados previos del grupo de investigación sí permitieron establecer que los agonistas σ_1 SKF-10047 y PRE-084 actuaban potenciando la formación de dendritas, mientras que el antagonista NE-100 inhibía este efecto (resultados no mostrados).

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que las células PC12 son sensibles a la diferenciación por NGF. Aunque este es un hecho conocido, la cuantificación de la diferenciación inducida por el factor trófico está sometida a debate. Algunos autores optan por determinar el porcentaje de células diferenciadas, mientras que otros presentan la longitud de las dendritas, pero sin especificar nada más al respecto. Otros parámetros pueden ser también válidos, como el número de dendritas por célula o el número de ramificaciones. En todo caso, deben ajustarse adecuadamente las condiciones del cultivo porque la densidad celular debe ser la justa. Una densidad demasiado baja puede generar excesiva variabilidad y en cambio, densidades demasiado altas pueden dificultar el recuento de las dendritas o la evaluación de su longitud.

Cabe tener en cuenta, además, que los artículos científicos que describen la metodología son muy pocos en este sentido. Al tratarse de revistas de química farmacéutica, se describe el proceso de síntesis de manera mucho más detallada que la parte experimental de farmacología, con lo cual no se describen datos que sí se consideran esenciales en revistas de farmacología, o la descripción en sí es confusa. Por ejemplo, *Ishima y colaboradores* [36] miden el efecto de ligandos σ_1 sobre “crecimiento de neuritas” (*neurite outgrowth*) pero en realidad miden el porcentaje de células diferenciadas (con dendritas). De todos modos, los valores obtenidos en los pocos experimentos que se pudieron realizar son relativamente coincidentes con lo descrito en la bibliografía. Por ejemplo, el grupo de Rossi [35] describe alrededor de un 18% de células diferenciadas a la concentración de 2,5 ng/mL mientras que en nuestros experimentos llegamos al 9%, lo que, teniendo en cuenta la variabilidad que pueden llegar a presentar las células tumorales, ni que sean de la misma cepa, parece aceptable. Además, se obtiene una buena relación concentración-respuesta. Los resultados todavía son más coincidentes en comparación con el grupo de Ishima: obtiene alrededor de un 10% de diferenciación a 2,5 ng/mL y un 32% a 20 ng/mL [36]. En nuestras manos, y a 20 ng/mL obtuvimos un porcentaje de diferenciación de 27,5%. Por lo tanto, se puede considerar que la técnica se puso a punto adecuadamente y que estábamos en condiciones de reproducir la metodología establecida para probar la actividad de los compuestos sintetizados por el grupo del Dr. Vázquez.

Por lo que se refiere a la elección de las condiciones de cultivo para la evaluación de los efectos de los ligandos σ_1 , la concentración de NGF más baja (2,5 ng/mL) parecía

afectar negativamente la cantidad de células supervivientes a lo largo de los días de cultivo (sólo una media de unas 10,6 células por campo, una tercera parte de los valores observados en los otros campos). Concentraciones superiores (5 o 10 ng/mL) al parecer permitían conseguir mantener viables las células sin afectar en exceso el número basal de células diferenciadas, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las tres menores concentraciones.

Finalmente, y por lo que se refiere a los diferentes parámetros medidos, al parecer el recuento de la longitud total de las dendritas por célula está sujeta a una mayor variabilidad, puesto que sólo se obtuvo diferencia estadísticamente significativa a la máxima concentración de NGF y sólo respecto a la menor.

Desafortunadamente, no se pudo establecer el carácter agonista o antagonista de los compuestos proporcionados por el Dr. Vázquez. Cabe mencionar, en todo caso, que el proyecto ha sido valorado positivamente por un panel de expertos en la convocatoria CaixaImpulse y que próximamente será evaluado en exposición presencial y competitiva para ser uno de los 10 finalistas que goce de una ayuda de entre 50.000-100.000 Eur.

Los estudios deben continuar con una caracterización con concentración-respuesta de los efectos de los agonistas que se utilizan como controles positivos y su comparación con cada uno de los compuestos proporcionados por el grupo de síntesis.

9. CONCLUSIÓN

Como se esperaba, y como resultado de los experimentos realizados, las concentraciones crecientes de NGF incrementan el porcentaje de células PC12 diferenciadas, así como la longitud de sus dendritas.

Puede concluirse que el rango de concentraciones óptimas de NGF para seguir con el estudio de determinación de la actividad de ligandos σ_1 se encuentra en el intervalo entre 2,5-10 ng/mL. No obstante, se establece que el intervalo de concentración de NGF más apropiado es de entre 5-10 ng/mL, puesto que mantiene una buena relación entre mantenimiento de la viabilidad celular a la semana de la incubación y todavía no proporcionan diferenciaciones demasiado elevadas que pudieran dificultar observar el efecto de potenciación que se supone deben ejercer los ligandos σ_1 .

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Penke B, Fulop L, Szucs M, Frecska E. *The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases*. *Curr Neuropharmacol*. **2017**; 16:97
2. Smith SB. *Introduction to sigma receptors: Their role in disease and as therapeutic targets*. *Adv Exp Med Biol*. **2017**; 964:1–4
3. Schmidt HR, Kruse AC. *The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future*. *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd. **2019**; 40:636–654
4. Ryskamp DA, Korban S, Zhemkov V, Kraskovskaya N, Bezprozvanny I. *Neuronal sigma-1 receptors: Signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases*. *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A. **2019**; 13:862
5. Chu UB, Ruoho AE. *Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor*. *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. **2016**; 89:142-153
6. Albayrak Y, Hashimoto K. *Sigma-1 receptor agonists and their clinical implications in neuropsychiatric disorders*. *Adv Exp Med Biol*. **2017**; 964:153–161
7. Kim FJ. *Introduction to sigma proteins: Evolution of the concept of sigma receptors*. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC. **2017**; 244:1-11
8. Rousseaux CG, Greene SF. *Sigma receptors [σ R_s]: Biology in normal and diseased states*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. Taylor and Francis Ltd. **2016**; 36:327–388
9. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. *Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1)*. *Biochem Biophys Res Commun*. **1996**; 229:553–558
10. Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB. *The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit*. *Neuron*. **2002**; 34:399–410
11. Schmidt HR, Zheng S, Gurpınar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC. *Crystal structure of the human σ 1 receptor*. *Nature*. **2016**; 532:527–530
12. Schmidt HR, Betz RM, Dror RO, Kruse AC. *Structural basis for σ 1 receptor ligand recognition*. *Nat Struct Mol Biol*. **2018**; 25:981–987
13. Rosen DA, Seki SM, Fernández-Castañeda A, Beiter RM, Eccles JD, Woodfolk JA y cols. *Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis*. *Sci Transl Med*. **2019**; 11:1-21

14. Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY. *The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems*. Trends in Pharmacological Sciences. Elsevier Ltd. **2016**; 37:262-278
15. Weng TY, Tsai SYA, Su TP. *Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases*. Journal of Biomedical Science. BioMed Central Ltd. **2017**; 24:74
16. Longhitano L, Castracani CC, Tibullo D, Avola R, Viola M, Russo G y cols. *Sigma-1 and Sigma-2 receptor ligands induce apoptosis and autophagy but have opposite effect on cell proliferation in uveal melanoma*. Oncotarget. **2017**; 8:91099–91111
17. Colabufo NA, Berardi F, Abate C, Contino M, Niso M, Perrone R. *Is the σ_2 receptor a histone binding protein?* J Med Chem. **2006**; 49:4153–4158
18. Xu J, Zeng C, Chu W, Pan F, Rothfuss JM, Zhang F y cols *Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site*. Nat Commun. **2011**; 2:380
19. Abate C, Niso M, Berardi F. *Sigma-2 receptor: Past, present and perspectives on multiple therapeutic exploitations*. Future Medicinal Chemistry. Future Medicine Ltd. **2018**; 10:1997–2018
20. Alon A, Schmidt HR, Wood MD, Sahn JJ, Martin SF, Kruse AC. *Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2017**; 114:7160–7165
21. Terada K, Migita K, Matsushima Y, Kamei C. *Sigma-2 receptor as a potential therapeutic target for treating central nervous system disorders*. Neural Regeneration Research. Wolters Kluwer Medknow Publications; **2019**; 14:1893–1894
22. Albayrak Y, Hashimoto K. *Sigma-1 receptor agonists and their clinical implications in neuropsychiatric disorders*. Adv Exp Med Biol. **2017**; 964:153–161
23. Alon A, Schmidt H, Zheng S, Kruse AC. *Structural perspectives on sigma-1 receptor function*. Adv Exp Med Biol. **2017**; 964:5–13
24. Laggner C, Schieferer C, Fiechtner B, Poles G, Glossmann H, Langer T. *Discovery of High-Affinity Ligands of sigma1 Receptor, ERG2, and Emopamil Binding Protein by Pharmacophore Modeling and Virtual Screening*. J Med Chem. **2005**; 48:4754-4764
25. Weber F, Wünsch B. *Medicinal chemistry of σ_1 receptor ligands: Pharmacophore models, synthesis, structure affinity relationships, and pharmacological applications*. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Springer New York LLC **2017**; 244:51–79

26. Ossa F, Schnell JR, Ortega-Roldan JL. *A review of the human sigma-1 receptor structure*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC. **2017**; 964:15–29
27. Kim FJ, Pasternak GW. *σ 1 Receptor ligand binding: an open-and-shut case*. Nat Struct Mol Biol. **2018**; 25:992–993
28. Brailoiu E, Chakraborty S, Brailoiu GC, Zhao P, Barr JL, Ilies MA y cols. *Choline Is an Intracellular Messenger Linking Extracellular Stimuli to IP 3 -Evoked Ca 2+ Signals through Sigma-1 Receptors*. Cell Rep. **2019**; 26:330-337
29. Maurice T, Gogvadze N. *Sigma-1 (σ 1) receptor in memory and neurodegenerative diseases*. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Springer New York LLC. **2017**; 244:81–108
30. Merlos M, Burgueño J, Portillo-Salido E, Plata-Salamán CR, Vela JM. *Pharmacological modulation of the sigma 1 receptor and the treatment of pain*. Adv Exp Med Biol. **2017**; 964:85–107
31. Xiong J, Jin J, Gao L, Hao C, Liu X, Liu BF y cols. *Piperidine propionamide as a scaffold for potent sigma-1 receptor antagonists and mu opioid receptor agonists for treating neuropathic pain*. Eur J Med Chem. **2020**; 191: 112144
32. García M, Virgili M, Alonso M, Alegret C, Fernández B, Port A y cols. *4-Aryl-1-oxa-4,9-diazaspiro[5.5]undecane Derivatives as Dual μ -Opioid Receptor Agonists and σ 1 Receptor Antagonists for the Treatment of Pain*. J Med Chem. **2020**; 63:2434–2454
33. Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, Cavendish JZ, Robson MJ, Scandinaro AL y cols. *Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases*. Journal of Pharmacological Sciences. Japanese Pharmacological Society; **2015**; 124:17-29
34. Itoh K, Ishima T, Kehler J, Hashimoto K. *Potentiation of NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by papaverine: Role played by PLC- γ , IP 3 receptors*. Brain Res. **2011**; 1377:32–40
35. Rossi D, Pedrali A, Urbano M, Gaggeri R, Serra M, Fernández L y cols. *Identification of a potent and selective ρ 1 receptor agonist potentiating NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells*. Bioorganic Med Chem. **2011**; 19:6210–6224
36. Nishimura T, Ishima T, Iyo M, Hashimoto K. *Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways*. PLoS One. **2008** ;3(7)

11. AUTOEVALUACIÓN

La realización de mis prácticas externas curriculares y mi trabajo de Fin de Grado en la Unidad de Farmacología ha sido una gran experiencia que me ha permitido crecer profesionalmente en el mundo de la investigación y a nivel personal. He adquirido habilidades relacionadas con los cultivos celulares, como mantenimiento de células, preparación de medios y disoluciones, visualización al microscopio de la morfología y diferenciación celular y finalmente, tratamiento de datos obtenidos. Además, he aprendido a ser más crítica y a trabajar de forma más rigurosa. También he aprendido a exigirme más a mí misma, lo que creo que repercutirá directamente en mi motivación y ganas de seguir aprendiendo e investigando.