



Ministerio  
de Educación  
y Cultura



Universidad de la República Oriental del Uruguay  
Facultad de Ciencias

Tesina de graduación

07/2023

# **Evaluación del efecto de ibogaína y su metabolito activo noribogaína en la viabilidad de células PC12**

**Camila Narbondo**

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientadoras: **Dra. Giselle Prunell**

**Dra. Mariana Pazos**

**Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección**

**Cátedra UNESCO Compuestos Naturales Neuroactivos**

**Departamento de Neuroquímica**

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

## **Agracedimientos**

A Giselle y Mari, por todas sus enseñanzas, paciencia y confianza.

A Caroli, por ser mi pseudotutora.

A Analía y Flavio por formar parte del tribunal.

A Maxi y Agus, por compartirme sus conocimientos de Pokémon. Y a toda la gente del laboratorio por la buena onda.

A mi familia por el apoyo incondicional.

A mis amigxs del alma.

A la Flaki. (En representación de todxs lxs animales que me han acompañado)

# Índice

Glosario.....	4
Resumen .....	5
Palabras clave.....	5
Introducción .....	6
Acción de la ibogaína en el sistema nervioso: .....	6
Línea celular PC12 como modelo neuronal: .....	7
Antecedentes particulares: .....	7
Hipótesis: .....	8
Objetivo general:.....	8
Objetivos específicos: .....	8
Estrategia experimental.....	8
Modelo experimental: .....	8
Estudio de los efectos de ibogaína y noribogaína sobre la viabilidad celular:.....	8
Materiales y métodos.....	9
Compuestos: .....	9
Cultivo de células PC12:.....	9
Evaluación de la viabilidad celular:.....	10
Resultados.....	10
Efecto de ibogaína y noribogaína sobre la sobrevivencia celular .....	10
Discusión .....	13
Conclusión.....	14
Perspectivas .....	14
Bibliografía .....	14

## **Glosario**

SERT: transportadores de serotonina

DAT: transportadores de dopamina

5-HT<sub>2A</sub>: receptor de 5-hidroxi-triptamina

LSD: dietilamida de ácido lisérgico

NGF: factor de crecimiento nervioso

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Formazán: (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán

DMSO: dimetilsulfóxido

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

H<sub>2</sub>O: agua

NaCl: cloruro de sodio

PBS: buffer fosfato salino

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

## **Resumen**

La ibogaína es el principal componente psicoactivo de la planta africana *Tabernanthe iboga* y ha sido usada históricamente por pueblos nativos de África Central en rituales de iniciación. En los últimos años, la ibogaína ha ganado especial interés por sus potenciales efectos beneficiosos en el sistema nervioso. Su mecanismo de acción todavía está siendo investigado, pero parecería actuar a través de complejas interacciones entre múltiples sistemas de neurotransmisores. También, se ha sugerido que ibogaína podría mediar procesos de plasticidad neuronal, ya que tiene la capacidad de modificar la expresión de ciertos factores neurotróficos en el cerebro. Nuestro grupo realizó estudios preliminares con ibogaína y su metabolito activo noribogaína, para caracterizar su acción sobre la sobrevivencia celular y descartar posibles efectos tóxicos en las células PC12. Las células PC12 constituyen un modelo neuronal de utilidad para estudiar el sistema nervioso a nivel molecular y de células únicas, con el cual el laboratorio tiene gran experiencia. Sorpresivamente, los resultados obtenidos sugirieron un mayor número de células en los cultivos tratados con ibogaína y noribogaína en comparación con la condición control.

Dados estos resultados surgió el interés de profundizar en el estudio de este fenómeno. Fue así que para el presente trabajo nos propusimos como objetivo estudiar el efecto de ibogaína y noribogaína, sobre cultivos de células PC12. Se encontró que ibogaína y noribogaína inducen un aumento en la señal en ensayos de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en las células PC12, tanto en su fenotipo naïve como diferenciadas con NGF (factor de crecimiento nervioso). Mediante conteos celulares se vio que ibogaína y noribogaína inducen un aumento en el número de células en PC12 naïve. Estos resultados evidencian propiedades novedosas para ibogaína y noribogaína que es de interés seguir estudiando.

## **Palabras clave**

Ibogaína, Noribogaína, PC12, sobrevivencia celular.

## Introducción

### Acción de la ibogaína en el sistema nervioso:

La ibogaína es el principal de los alcaloides presentes en la raíz de la planta *Tabernanthe iboga*. (1) Esta planta ha sido usada durante siglos por los pueblos de Gabón Mitsogho y Babongo en sus rituales de iniciación a la disciplina espiritual Bwiti debido a su capacidad de inducir estados alterados de conciencia. (2,3,4) La planta fue llevada a Francia a mediados del s.19 y su compuesto psicoactivo primario, el alcaloide indólico 10-metoxi-ibogamina mejor conocido como ibogaína (figura 1), fue aislado en 1901. (1) La ibogaína ha sido ampliamente estudiada en occidente debido a su capacidad reportada de reducir las conductas de búsqueda y autoadministración de diferentes sustancias de abuso en modelos animales de adicción y eliminar la necesidad de consumo y los síntomas de abstinencia por períodos prolongados en humanos. (5)

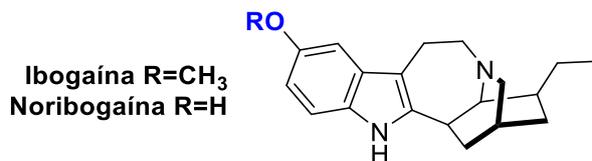


Figura 1: Estructura de ibogaína y noribogaína.

De acuerdo con estudios de biodistribución en ratas, la ibogaína alcanza el cerebro llegando a una concentración máxima de entre 10 y 20  $\mu$ M pasada 1 hora de la administración aguda de una dosis oral de 50 mg/Kg o una dosis de 40 mg/Kg intraperitoneal. Su principal metabolito es el producto de O-

desmetilación, la noribogaína (figura 1), de mayor vida media y al igual que la ibogaína es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. (6,7)

La farmacología de ibogaína y su metabolito ha sido abordada con el fin de determinar el o los mecanismos que median la acción mencionada para dicho compuesto sobre el consumo problemático de sustancias. Ambos compuestos presentan afinidad en el rango micromolar por múltiples receptores y sistemas de neurotransmisores, tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico. A pesar de que las actividades *in vitro* dentro del rango micromolar son frecuentemente descritas como auxiliares al caracterizar los mecanismos de acción de las drogas *in vivo*, la actividad micromolar puede ser farmacológicamente importante si consideramos que ibogaína y noribogaína alcanzan concentraciones relativamente elevadas en el cerebro. (5)

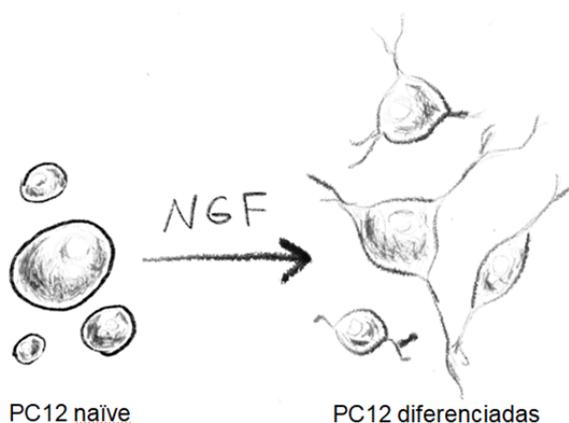
Ha sido reportado que la ibogaína activa los receptores opioides  $\mu$  y  $\kappa$ , así como también los receptores asociados a retículo endoplásmico  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$ . (1,8) Por otro lado, debido a sus similitudes estructurales con los neurotransmisores monoaminérgicos, ibogaína y noribogaína inhiben, con afinidad en el rango micromolar, a los transportadores de serotonina (SERT) y dopamina (DAT). (8) El mecanismo de acción de ibogaína también difiere de otros inhibidores de DAT y SERT, ya que se une y estabiliza una conformación inusual del transportador, y también porque esta inhibición es no competitiva. (1) Cabe mencionar que ibogaína no presenta afinidad por el receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, el cual media los efectos neuroplásticos de psicodélicos clásicos como el LSD. (9)

Por otra parte, ibogaína tiene la capacidad de modificar la expresión de ciertos factores neurotróficos en el cerebro, lo cual podría mediar procesos de plasticidad neuronal (10,11) y permitiría explicar los efectos a largo plazo descritos para ibogaína. Esta actividad de promover la expresión de factores neurotróficos es muy interesante por su potencial para el tratamiento de diversas patologías que afectan al sistema nervioso como enfermedades degenerativas. La estimulación de procesos de plasticidad podría reforzar y favorecer la formación de nuevas conexiones neuronales, promoviendo el correcto funcionamiento neuronal. (12,13,14) Dado que la ibogaína y su metabolito son moléculas que no han sido extensamente estudiadas, es altamente probable que, además de los mecanismos de acción y actividades ya descritas, presenten otras particularidades que todavía no conocemos.

### Línea celular PC12 como modelo neuronal:

Los experimentos en este trabajo se realizaron en células PC12, una línea celular con propiedades neuronales. Las líneas celulares clonales que expresan propiedades neuronales son modelos útiles para estudiar el sistema nervioso a nivel molecular y de células únicas. Estas líneas han sido establecidas a partir de neuroblastomas humanos y murinos y también de tumores de sistema nervioso central de ratas. (15)

En particular la línea celular PC12 fue clonada en 1976 de un feocromocitoma transplantable de rata. (15) Son células capaces de sintetizar, almacenar y liberar dopamina y otras catecolaminas. Estas células proliferativas constituyen un sistema homogéneo, son fáciles de crecer y transfectar lo cual las hace apropiadas para estudios de monitoreo de fármacos, manipulación de genes y explorar vías de señalización. (16) Además, tienen la



PC12 naïve

PC12 diferenciadas

**Figura 2:** Células PC12 en su fenotipo naïve y diferenciadas con NGF.

particularidad de responder al factor de crecimiento nervioso (NGF), sufriendo cambios en su fenotipo que incluyen el dejar de proliferar y adquirir algunas características de las neuronas como lo son la formación de neuritas y conexiones sinápticas (figura 2). La cantidad de catecolaminas no varía pese al tratamiento con NGF, ni tampoco el nivel de enzimas necesarias para su síntesis. Lo que si se ha reportado es un aumento en la excitabilidad en las células PC12 diferenciadas. (17) Dado su fenotipo tipo neuronal, las células PC12 son ampliamente utilizadas como modelo para investigar acerca de la fisiología de las neuronas y para evaluar los efectos de variados compuestos con actividades a nivel de este tipo celular.

### Antecedentes particulares:

Desde hace varios años que en el Departamento de Neuroquímica del IIBCE se desarrollan líneas de investigación en las que se evalúan efectos neuroprotectores de distintos compuestos frente a efectos dañinos de ciertas toxinas en una variedad de modelos *in vitro* e *in vivo*. (18,19,20,21,22,23,24)

En el año 2019 el grupo de investigación se interesó en la ibogaína y sus derivados como posibles agentes neuroprotectores ya que, como se mencionó anteriormente, se demostró que entre sus mecanismos de acción se incluía un aumento en los niveles de expresión de diversos factores neurotróficos. (10,11)

Es así que en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Ignacio Carrera del Dpto. de Química Orgánica de la Facultad de Química, UdelaR, se comenzaron estudios para investigar el posible efecto neuroprotector de la ibogaína y noribogaína en células PC12 frente al daño provocado por diferentes toxinas (rotenona, peróxido de hidrógeno y 6-hidroxi-dopamina).

Como parte de estos estudios se realizaron ensayos preliminares para evaluar el efecto de ibogaína y noribogaína sobre la sobrevivencia celular, para descartar posibles efectos tóxicos de los compuestos en estas células. Contrariamente a lo esperado, los resultados sugirieron un mayor número de células en los cultivos tratados con ibogaína y noribogaína, en comparación con la condición control. Dados estos resultados surgió el interés en profundizar el estudio del posible efecto de la ibogaína y la noribogaína sobre la cantidad de células sanas (viabilidad) de cultivos de células PC12. De confirmarse que estos

compuestos aumentan la viabilidad, estaríamos revelando una propiedad de los mismos hasta ahora no descrita.

**Hipótesis:** Ibogaína y noribogaína ejercen un efecto en la supervivencia y/o la proliferación de las células PC12.

**Objetivo general:** Estudiar el efecto de ibogaína y noribogaína sobre la viabilidad de las células PC12.

### Objetivos específicos:

1- Determinar la viabilidad de células PC12 naïve frente a la exposición a ibogaína y su metabolito noribogaína.

2- Determinar la viabilidad de células PC12 diferenciadas con NGF frente a la exposición a ibogaína y su metabolito noribogaína.

### Estrategia experimental

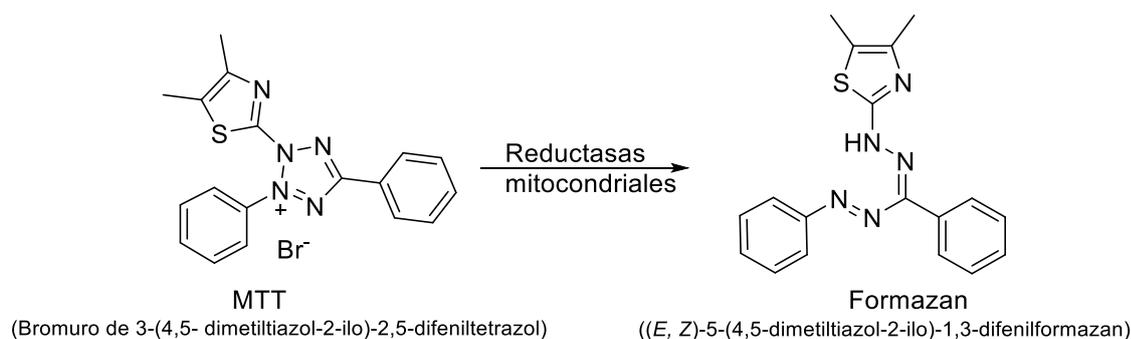
#### Modelo experimental:

En este trabajo se utilizaron células PC12 con ambos fenotipos y se denomina PC12 naïve a las células PC12 en su forma basal, sin diferenciar por NGF, y PC12 diferenciadas a las que recibieron el estímulo de NGF adquiriendo características neuronales.

#### Estudio de los efectos de ibogaína y noribogaína sobre la viabilidad celular:

Se estudiaron los efectos de ibogaína y noribogaína sobre la viabilidad de las células PC12 naïve y diferenciadas por NGF. Para ello se comenzó evaluando las concentraciones utilizadas en los experimentos preliminares que motivaron este estudio: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ . En una segunda etapa y de acuerdo a los resultados obtenidos, también se evaluaron las concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  y 0,001  $\mu\text{M}$ .

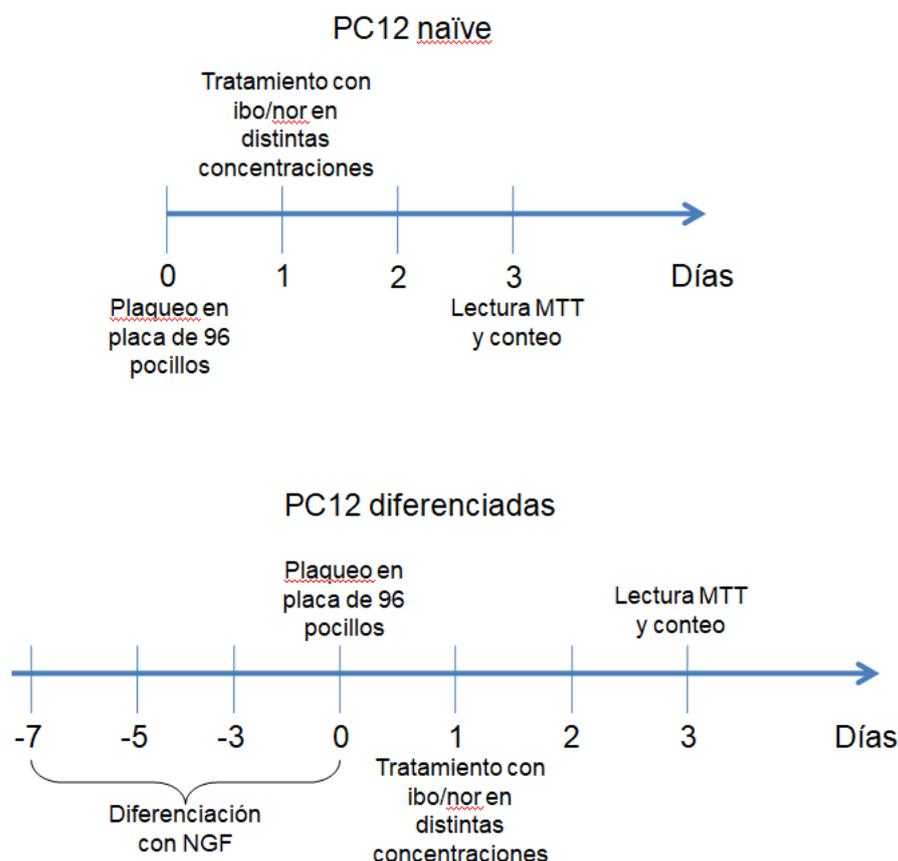
La viabilidad celular se determinó luego de 48hs de tratamiento con los compuestos utilizando el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo evidencia principalmente la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, la cual reduce el MTT a un compuesto coloreado (formazán) (figura 3), permitiendo relacionar de manera lineal la actividad de dicha enzima con el desarrollo de color mediante medidas de absorbancia a 540 nm. Dado que solo las células metabólicamente activas pueden reducir el MTT, la absorbancia a 540 nm es considerada una medida indirecta de viabilidad celular.



**Figura 3:** Reacción de MTT.

Para los tratamientos que sugirieron mayor aumento de viabilidad por dicho ensayo bioquímico, se realizó un conteo directo de las células en cámara de Neubauer para determinar con otra metodología experimental si los resultados obtenidos se debían a un aumento de número de células.

El diseño experimental empleado se muestra en la figura 4:



**Figura 4:** Esquema del diseño experimental para células PC12 naïve y diferenciadas.

## Materiales y métodos

### Compuestos:

La ibogaína y la noribogaína fueron sintetizadas en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química UdelaR. (25) Las mismas fueron almacenadas a una concentración de 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) a -20°C.

### Cultivo de células PC12:

- **PC12 naïve:** Las células PC12 fueron mantenidas en medio PC12, (85% RPMI, 10% suero de caballo, 5% suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina) en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie cubiertas con colágeno como sustrato (ver más adelante) y en ambiente de incubadora (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>). Cada 2 o 3 días, 2/3 del medio de cultivo se reemplazó por medio fresco y cada 7 días se repicaron a una nueva botella para mantener la línea celular. Para ello las células fueron despegadas del sustrato mecánicamente con pipeta Pasteur, contadas en cámara de Neubauer y 1x10<sup>6</sup> células fueron traspasadas a otra botella conteniendo medio PC12 termostatzado.

- PC12 diferenciadas: Para diferenciar las células PC12 se sembraron  $2 \times 10^6$  células en su estado naïve en medio RPMI (sin suero) con 100 ng/mL de NGF en botellas de cultivo. La misma cantidad de NGF se adicionó cada 2-3 días durante 7 días.
- Plaqueo: Para realizar los experimentos se sembraron las células en placas multiwells de 96 pocillos cubiertas con colágeno. Para las PC12 naïve se sembraron 18000 células por pocillo, en medio PC12 con un volumen final por pocillo de 80  $\mu$ L. Para las PC12 diferenciadas se sembraron 25000 células por pocillo en medio RPMI y NGF 100 ng/mL con un volumen final por pocillo de 80  $\mu$ L.
- Preparación de colágeno como sustrato: el fondo de las botellas o placas fue cubierto con colágeno 50  $\mu$ g/mL en ácido acético 0.02% disuelto en H<sub>2</sub>O e incubado entre 2 y 48 hs a 37°C. Luego de un lavado con H<sub>2</sub>O, las placas quedaron listas para su uso o almacenamiento (por hasta 1 mes).

Tratamientos: las células fueron tratadas con ibogaína y noribogaína con las siguientes concentraciones finales; 0  $\mu$ M (vehículo=DMSO 0,24%), 0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M; 25  $\mu$ M. Se utilizaron 4 pocillos por concentración en cada experimento. En cada experimento se dejaron 4 pocillos sin tratamiento como condición control.

Evaluación de la viabilidad celular:

Ensayo de MTT: Luego de 48 hs de tratadas las células con ibogaína y noribogaína, las células se incubaron por 45 min a 37°C con MTT (Sigma, USA; 0,5 mg/ml). Luego se descartó el medio y los cristales de formazán formados intracelularmente fueron disueltos con 100  $\mu$ L/pocillo de DMSO. La absorbancia se midió a una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector multimodo (Varioskan Flash, Thermo Scientific). (26)

Conteo de núcleos: Luego de 48 hs de tratadas las células con ibogaína y noribogaína se realizó conteo de las mismas. Para ello, se descartó el medio de cultivo sobrenadante y las células se resuspendieron en 40  $\mu$ L/pocillo de solución de conteo de núcleos (0,5% bromuro de etilhexadecildimetil amonio; 0,0165% NaCl; 0,28% ácido acético, 10% PBS; 0,5% tritón; 0,2% MgCl<sub>2</sub>; disuelto en H<sub>2</sub>O). Los núcleos con aspecto viable se contaron en cámara de Neubauer. (27)

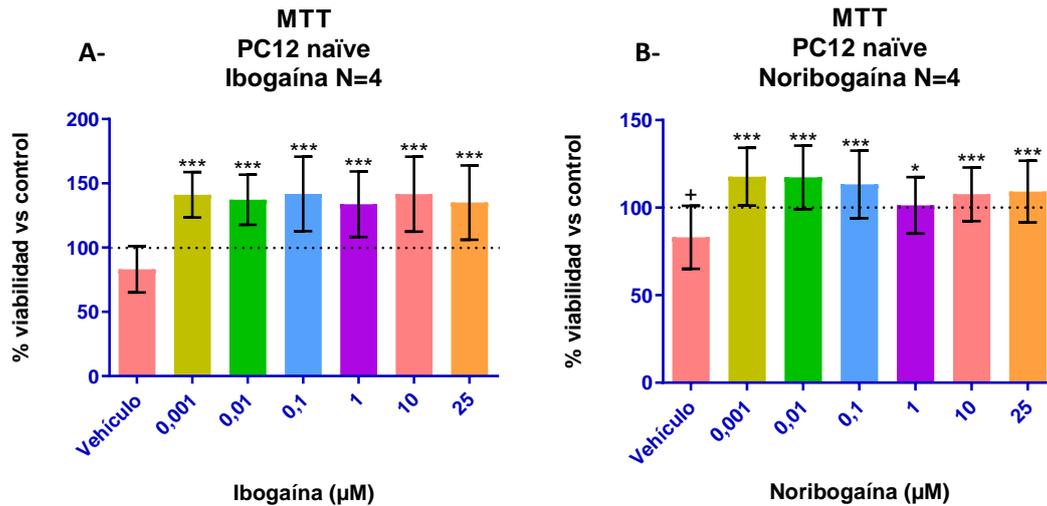
Estadística: El tratamiento estadístico de los datos se hizo con el programa GraphPad Prism. Se realizó el test de one-way ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Dunnet. Se consideró diferencia significativa cuando el *p* fue menor a 0,05. Los datos fueron expresados como media  $\pm$  SD (desviación estándar) respecto al control.

## Resultados

### Efecto de ibogaína y noribogaína sobre la sobrevivencia celular

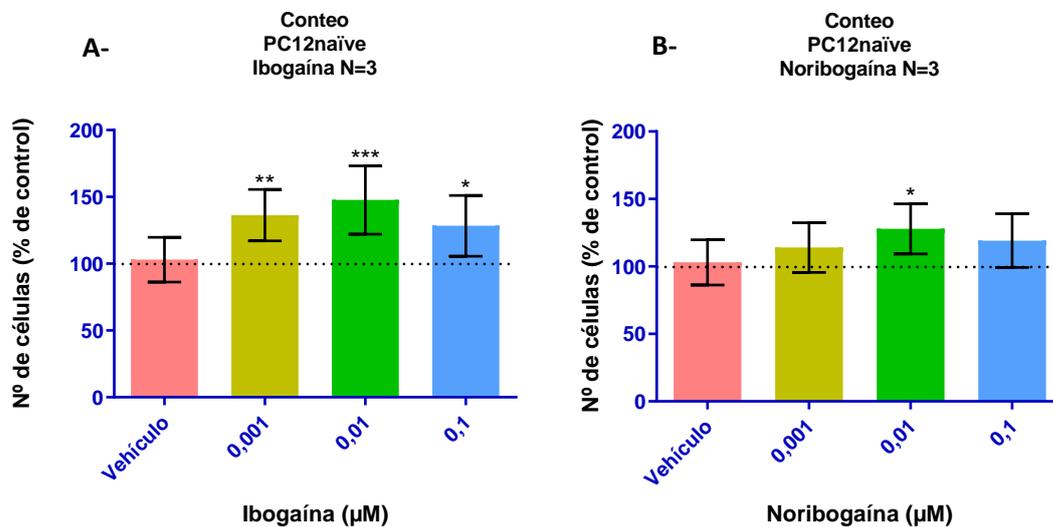
- PC12 naïve:

La lectura de MTT mostró un incremento significativo de la señal para las PC12 naïve tratadas con ibogaína o con noribogaína con respecto al tratamiento con vehículo en todas las concentraciones ensayadas (figura 5). En una primera etapa se ensayaron las concentraciones 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 25  $\mu$ M, y como todas dieron aumento se ensayaron también las concentraciones menores (0,001  $\mu$ M y 0,01  $\mu$ M). Las células tratadas con vehículo mostraron una disminución significativa de la señal de MTT con respecto al control en los tratamientos de noribogaína.



**Figura 5:** viabilidad celular por ensayo de MTT de PC12 naïve tratadas con ibogaína (A) y noribogaína (B). La significancia estadística se determinó mediante one-way ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Dunnet. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  versus vehículo y + $p \leq 0,05$  versus control. N=4.

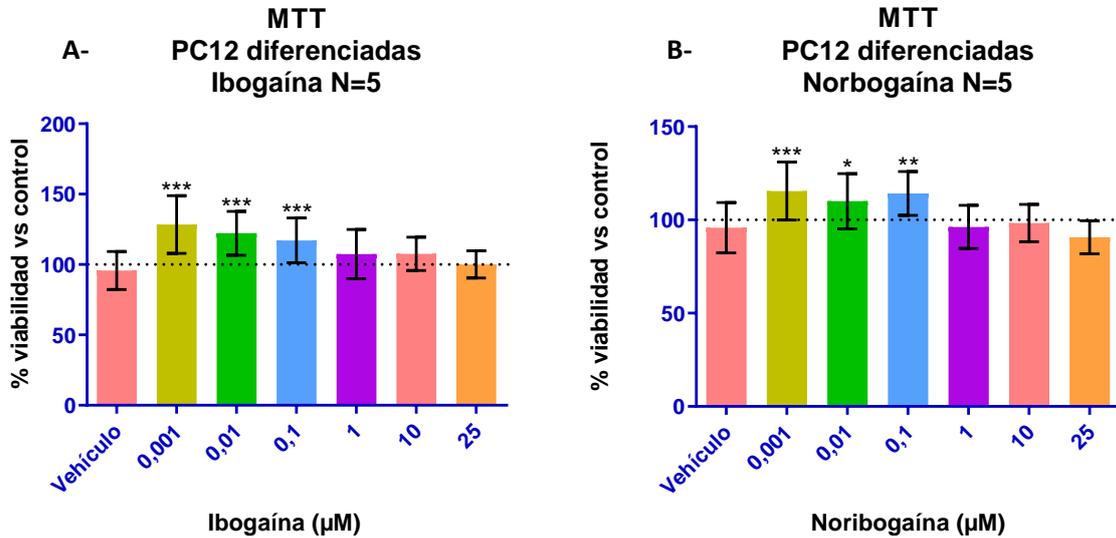
Un aumento de la señal de MTT podría deberse a una mayor cantidad de células o a un aumento del metabolismo mitocondrial. Para evaluarlo se realizó un conteo del número de células luego de los tratamientos con ibogaína y noribogaína a las concentraciones de 0,001 µM, 0,01 µM y 0,1 µM. El conteo en PC12 naïve mostró un aumento significativo en el número de células para los tratamientos con ibogaína a todas las concentraciones evaluadas. En cultivos tratados con noribogaína se vio una tendencia a presentar mayor número de células en todas las concentraciones, alcanzando la significancia estadística en la concentración de 0,01 µM. (figura 6)



**Figura 6:** viabilidad celular por conteo directo de PC12 naïve tratadas con ibogaína (A) y tratadas con noribogaína (B). La significancia estadística se determinó mediante one-way ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Dunnet. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  versus vehículo. N=3.

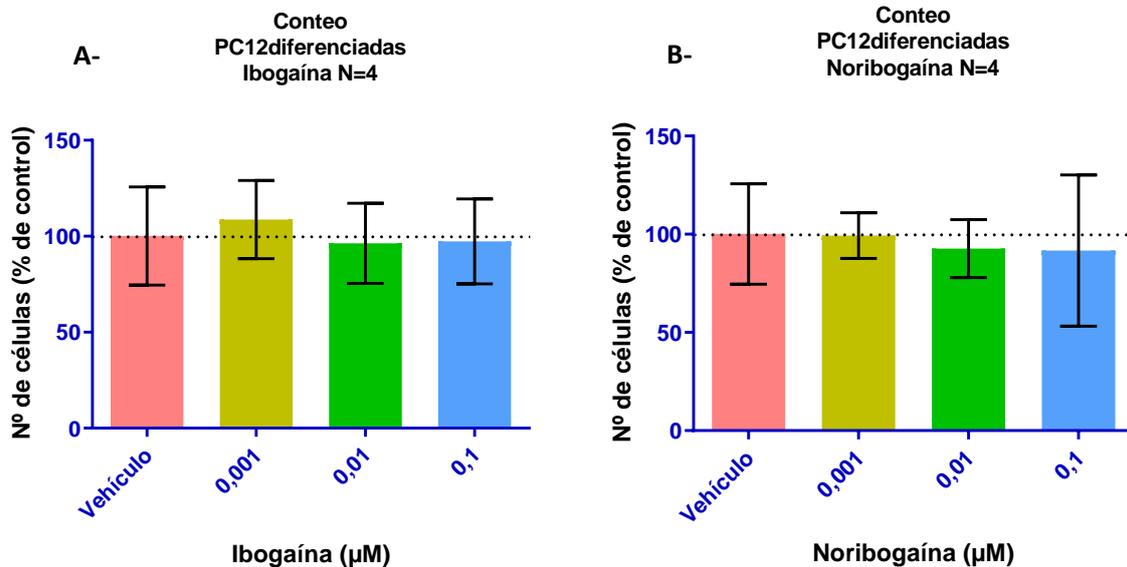
- PC12 diferenciadas:

En PC12 diferenciadas el MTT mostró aumento de señal con respecto a los vehículos en las células tratadas con las concentraciones menores de ibogaína y noribogaína (0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$  y 0,1  $\mu\text{M}$ ). (figura 7)



**Figura 7:** viabilidad celular por ensayo de MTT de PC12 diferenciadas tratadas con ibogaína (A) y noribogaína (B). La significancia estadística se determinó mediante one-way ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Dunnet. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  versus vehículo. N=5

Por su parte, el conteo de células viables en PC12 diferenciadas no mostró aumento significativo del número de células tratadas con los compuestos con respecto a los vehículos en las condiciones evaluadas (figura 8).



**Figura 8:** viabilidad celular por conteo directo de PC12 diferenciadas tratadas con ibogaína (A) y tratadas con noribogaína (B). La significancia estadística se determinó mediante one-way ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Dunnet. N=4.

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la ibogaína y la noribogaína provocan un aumento en la lectura de MTT en células PC12. En el caso del fenotipo naïve se encontró que este incremento se debe al menos en parte a un aumento en el número de células.

En PC12 naïve, los resultados mostraron que en el ensayo de MTT se vio un aumento significativo de la señal con respecto al vehículo para las células tratadas con ibogaína y también con noribogaína en todas las concentraciones que se utilizaron.

El clivaje de MTT tiene varias propiedades deseables para analizar la supervivencia celular y la proliferación. (28) El reactivo MTT atraviesa la membrana celular y la membrana interna mitocondrial de las células viables, y es reducido a formazán mayoritariamente por las reductasas mitocondriales de células metabólicamente activas. (28) Se asume que los valores de densidad óptica medidos a 570 nm y tomando como referencia los 630 nm son una representación de la concentración de formazán y por lo tanto se toman como indicador del número de células vivas. Sin embargo, varios estudios han revelado limitaciones en el ensayo de MTT como indicador del número de células y varios factores que necesitan ser considerados en el diseño, desarrollo, análisis e interpretación de los resultados del ensayo. (29) Por ejemplo, es posible para dos poblaciones celulares, una con un número pequeño de células y actividad metabólica alta en el nivel de células únicas, y la otra con un mayor número de células pero con actividad metabólica más baja al nivel de célula única, se obtengan los mismos valores de densidad óptica. (29) Es por esto que en este trabajo se realizó conteo directo de núcleos como complemento del ensayo de MTT.

En las PC12 naïve, el conteo mostró un aumento estadísticamente significativo del número de células para los tratamientos con ibogaína en las concentraciones ensayadas, confirmando que efectivamente el tratamiento con los compuestos resulta en una mayor cantidad de células viables (figura 5.A). Por otro lado, si bien para noribogaína el aumento observado en la cantidad de células fue significativo únicamente a 0,01  $\mu\text{M}$ , los resultados muestran una tendencia análoga a los conteos de células tratadas con ibogaína (figura 5.B). De todos modos, estos resultados no descartan la posibilidad de que también exista una mayor actividad enzimática.

En el caso de las PC12 diferenciadas, también se vio un patrón similar para ambos compuestos. Para las células tratadas con ibogaína, el ensayo de MTT mostró aumento significativo en las menores concentraciones estudiadas (0,001  $\mu\text{M}$ ; 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ), y dicho aumento fue decreciendo gradualmente hacia las concentraciones mayores. En los tratamientos con noribogaína también se vio aumento significativo en el ensayo de MTT para las tres concentraciones más bajas. Si bien el comportamiento dosis-respuesta para noribogaína no se observó tan gradual como con ibogaína, en este caso también fue la menor concentración de compuesto (0,001  $\mu\text{M}$ ) la que mostró el mayor aumento en el MTT. Por razones de tiempo en este trabajo no se analizaron concentraciones menores a ésta, pero estos resultados indican que sería de interés hacerlo.

Por otro lado, el conteo no mostró aumento significativo en el número de células PC12 diferenciadas para ninguno de los dos compuestos. Este resultado está de acuerdo con que un porcentaje elevado de las células están diferenciadas a tipo neuronal por lo que ya no tienen capacidad para proliferar. Si bien podría haberse visto aumento de número de células de las células PC12 que no hubiesen llegado a diferenciarse con NGF y mantuvieran su capacidad para replicarse, los resultados obtenidos no apoyan esto último.

Los resultados obtenidos para las PC12 diferenciadas que evidencian un aumento de la señal de MTT que no es acompañado por un incremento en el número de células en los ensayos de conteos celulares, sugieren que la ibogaína y la noribogaína podrían producir un aumento en la actividad de las enzimas que metabolizan el MTT. La succinato deshidrogenasa es la enzima responsable en mayor medida de la metabolización del MTT a

formazán. (30) Por lo tanto, este resultado podría indicar un aumento de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial por ibogaína y su metabolito noribogaína. Dada la importancia que tiene el metabolismo de la mitocondria para la sobrevivencia y funcionamiento celular, este aspecto resulta relevante de estudiar. (31,32)

## Conclusión

Ibogaína y noribogaína inducen un aumento de la señal de MTT en PC12 naïve y diferenciadas. Para PC12 naïve, esto se debe, al menos en parte, a un aumento de número de células. Los resultados obtenidos revelan efectos celulares novedosos de ibogaína y noribogaína que ameritan su estudio con mayor profundidad.

## Perspectivas

Los resultados del presente trabajo contribuyen a ampliar el conocimiento acerca de los efectos que ibogaína y su metabolito tienen sobre células de tipo neuronal y abren una serie de perspectivas, algunas de las cuales se resumen a continuación:

Dado que se vio un efecto de ibogaína y noribogaína en el número de células, en cultivos de PC12 naïve, sería interesante evaluar la proliferación celular de los cultivos utilizando técnicas como citometría de flujo. (33)

Teniendo en cuenta que nuestros resultados sugieren que ibogaína y noribogaína podrían tener un efecto sobre las reductasas mitocondriales, sería relevante evaluar si estos compuestos afectan la respiración mitocondrial en PC12 naïve y diferenciadas. Para esto podría analizarse el consumo de oxígeno de células tratadas con ibogaína y noribogaína en presencia de inhibidores específicos de los distintos complejos de la cadena respiratoria, incluyendo rotenona que es un inhibidor específico de la succinato deshidrogenasa. (34,35) Por otra parte también resultaría relevante evaluar si ibogaína y noribogaína generan algún efecto en la morfología de las mitocondrias, ya que se ha reportado que cambios en ésta pueden tener efectos positivos en la proliferación celular. (36)

## Bibliografía

1. Wasko M, Witt-Enderby P, Surrat C, (2018) DARK Classics in Chemical Neuroscience: Ibogaine. *ASC Chem. Neurosci.* 9, 2475-2483.
2. Fernandez J W, (1982) *Bwiti: An Ethnography of the Religious Imagination in Africa.* Princeton University Press, pp 470-493.
3. Fernandez J W, Fernandez R L, (2001) "Returning to the path": the use of iboga[ine] in an equatorial African ritual context and the binding of time, space, and social relationships. *Alkaloids Chem. Biol.* pp 235-247.
4. Alper K, Lotsof H, Kaplan C, (2008) The ibogaine medical subculture. *J. Ethnopharmacol.* 115, 9-24.
5. Alper K, (2001) Ibogaine, a review. *The Alkaloids*, pp. 1–38.
6. Baumann M H, Pablo J, Ali S, Rothman R, Mash D, (2001) Comparative Neuropharmacology of Ibogaine and its O-desmethyl Metabolite, Noribogaine. *Alkaloid chems. biol.*, Academic Press, pp. 79-113.
7. Mash D C, Staley J K, Baumann M H, Rothman R B, Hearn W L, (1995) Identification of a primary metabolite of ibogaine that targets serotonin transporters and elevates serotonin. *Life Sci.* 57, 1-6.
8. Lavaud C, Massiot G, (2017) The Iboga alkaloids. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol 105, pp 89-136.

9. Ly C, Greb A, Cameron L, Wong J, Barragan E, Wilson P, Burbach K, Soltanzadeh Zarandi S, Sood A, Paddy M, Duim W, Dennis M, McAllister K, Ori-McKenney K, Gray J, Olson D (2018) Psychedelics Promote Structural and Functional Neural Plasticity. *Cell Rep* 23(11): 3170-3182.
10. Marton S, González B, Rodríguez-Bottero S, Miquel E, Martínez-Palma L, Pazos M, Prieto J P, Rodríguez P, Sames D, Seoane G, et al. (2019) Ibogaine Administration Modifies GDNF and BDNF Expression in Brain Regions Involved in Mesocorticolimbic and Nigral Dopaminergic Circuits. *Front. Pharmacol.* 10, 193.
11. He D Y, MCGough N N H, Ravindranathan A, Jeanblanc J, Logrip M L, Phamluong K, Janak P H, Ron D, (2005) Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Mediates the Desirable Actions of the Anti-Addiction Drug Ibogaine against Alcohol Consumption. *J. Neurosci.* 25, 619-628.
12. Russo S, Mazei, Robison M, Ables J, Nestler E, (2009) Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharm (Suppl 1)*: 73-82.
13. Reichardt L (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci* 361(1473): 1545-64.
14. Cheng A, Hou Y, Mattson M (2010) Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro* 2(5): e00045.
15. Greene L, Tischler A, (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci.* pp 2424-2428.
16. Grau C, Greene L, (2012) Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to Parkinson's disease. *Methods in molecular biology Clifton NJ* 846, 201–11.
17. Greene L, Rein G. (1977) Release of [3H] norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. *Brain Res* 1977;138:521–8.
18. Costa G, Abin-Carriquiry JA, Dajas F, (2001) Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Res.* 888(2):336-342.
19. Arredondo MF, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Lafon L, Dajas F, (2004) Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J Ethnopharmacol.* 91(1):13-20.
20. Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanavicius J, Arruti C, Casanova G, Dajas F, (2008) Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res.* 13(2):105-14.
21. Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antúnez K, Jones DP, Go YM, Liang YL, Dajas F, (2010) After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med.* 49(5):738-47.
22. Echeverry C, Arredondo F, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Midiwo J, Dajas F, (2015) Antioxidant activity, cellular bioavailability, and iron and calcium management of neuroprotective and nonneuroprotective flavones. *Neurotox Res.* 27(1):31-42.
23. Mouhape C, Costa G, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Dajas F, Prunell G, (2019) Nicotine-Induced Neuroprotection in Rotenone In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease: Evidences for the Involvement of the Labile Iron Pool Level as the Underlying Mechanism. *Neurotox Res.* 35(1):71-82.
24. Echeverry C, Prunell G, Narbondo C, de Medina VS, Nadal X, Reyes-Parada M, Scorza C, (2021) A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT1A Receptors. *Neurotox Res.* 39(2):335-348.

25. González B, Fagúndez C, Peixoto de Abreu Lima A, Suescun L, Sellanes D, Seoane G, Carrera I (2021) Efficient Access to the Iboga Skeleton: Optimiced Procedure to Obtain Voacangine from *Voacanga Africana* Root Bark. ACS Omega 16755-16762.
26. Denizot F, Lang R, (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 89(2):271-7.
27. Soto AM, Sonnenschein C, (1985) The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). J Steroid Biochem. 23(1):87-94.
28. Mosmann T, (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 65(1983):55-63.
29. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I, (2021) The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. International Journal of Molecular sciences. 22, 12827.
30. Slater T, Sawyer B, Sträuli U, (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochimica et Biophysica acta. 383-393.
31. Rosenkranz S, Shaposhnykov A, Träger S, Broder Engler J, Witte M, Roth V, Vieira V, Paauw N, Bauer S (2021) Enhancing mitochondrial activity in neurons protects against neurodegeneration in a mouse model of multiple sclerosis. eLife.61798.
32. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Souza J, Bolatto C, Rodriguez-Bottero S, Logan A, Smith R, Murphy M, Barbeito L, Radi R, Cassina P, (2014) Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Free Radical Biology and Medicine 70, 204-2013.
33. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z, (2004) Analysis of cell cycle by flow cytometry. Methods of Mol Biol. 281:301-11.
34. Wu M Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead D, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, and Ferrick DA, (2007) Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. Am J Physiol Cell Physiol 292:C125–C136.
35. Gerencser AA, Neilson A, Choi SW, Edman U, Yadava N, Oh RJ, Ferrick DA, Nicholls DG and Brand MD, (2009) Quantitative Microplate-Based Respirometry with Correction for Oxygen Diffusion. Anal Chem. 81(16): 6868–6878.
36. Yao C, Wang R, Wang Y, Kung C, Weber J, Patti G, (2019) Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. eLife 41351.