



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 131 468**

② Número de solicitud: 9701212

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 31/40

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **29.05.97**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.99**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.07.99

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**
Plaza de Riego. Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑦ Inventor/es: **Rodríguez Sánchez, Carmen;**
Mayo Barrallo, Juan Carlos;
Sainz Menéndez, Rosa;
Antolín González, Isaac y
Uría Marbán, Higinio

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Uso de la melatonina en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.**

⑤ Resumen:

Uso de la melatonina en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

La invención se refiere al uso de la melatonina en la preparación de composiciones útiles para prevenir y para evitar el progreso de los síntomas en las enfermedades neurodegenerativas. También se refiere al uso de esta hormona en combinación con otros antioxidantes o con otros inhibidores de la proliferación celular para el tratamiento y prevención de dichas alteraciones. El uso de esta hormona tiene las ventajas sobre otros medicamentos utilizados en dichos tratamientos de que es un agente antioxidante e inhibidor de la proliferación celular endógeno que no posee efectos secundarios, atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, y ejerce sus efectos en todos los compartimentos celulares.

ES 2 131 468 A1

DESCRIPCION

Uso de la melatonina en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

La invención se refiere al uso de la melatonina en la preparación de composiciones útiles para evitar el progreso de los síntomas en las enfermedades neurodegenerativas en mamíferos. También se refiere a las preparaciones que incluyan la melatonina en combinación con otros antioxidantes, así como las que incluyan la melatonina en combinación con otros inhibidores de la proliferación celular. Las composiciones a las que se refiere son de aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en cuyo origen estén implicados los radicales libres. Entre estas están, aunque no exclusivamente, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica. Las composiciones objeto de la invención protegen contra el daño celular causado por los radicales libres.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de alteraciones que se caracterizan por una degeneración progresiva de un grupo particular de neuronas. El origen de estas enfermedades no está claro, existiendo cada vez más datos sobre la implicación en él de los radicales libres.

El estrés oxidativo es la consecuencia de una falta de equilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos que la célula tiene para defenderse de ellos. Puede ocurrir cuando la producción de radicales libres aumenta, o cuando los agentes depuradores de estos radicales o las enzimas implicadas en su transformación disminuyen, o por ambas cosas (Simonian et al. 1996, *Annu Rev Mannacol Toxicol*, 36:83-106). Los radicales libres producen alteraciones de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, habiendo sido implicados en el origen de varias enfermedades neurodegenerativas, estando especialmente demostrados como causantes de la enfermedad de Parkinson (Gotz et al., 1990, *J Neural Transm*, 1990, 29:241-249), de la enfermedad de Alzheimer (Behl et al., 1994, *Cell*, 77:817-827) y de la esclerosis lateral amiotrófica (Deng et al., 1993, *Science*, 261:1047-1051). Este aumento de radicales libres puede ser debido tanto a una alteración celular en origen, como a su producción por parte de otras sustancias, endógenas o exógenas (β -amiloide, neurotoxinas, etc.). También han sido implicados como causa del envejecimiento (Socci et al., 1995, *Brain Res*, 693:88-94) y de otras enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Huntington, neuropatía diabética, parálisis nuclear progresiva, etc. (Jenner, 1996, *Pathol Biol*, 44(1):57-64).

La muerte celular producida por los radicales libres puede ser tanto muerte por apoptosis (muerte celular programada) como por necrosis. En la muerte celular por apoptosis las células que mueren en un momento dado no son muchas, estando esparcidas aleatoriamente por todo el tejido; los restos de células muertas son rápidamente fagocitados por células vecinas, y el tejido que las rodea es un tejido normal. Esto trae como consecuencia que los síntomas clínicos tardan años en aparecer, cuando el número de neuronas muertas es funcionalmente importante. En la

muerte celular por necrosis, el número de células que muere es abundante; son células agrupadas en una zona del tejido, y el tejido que las rodea es inflamatorio, por lo que los síntomas clínicos aparecen rápidamente. Las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades de larga evolución y con lienzos insidiosos, siendo por tanto muy probable que el tipo de muerte celular que ocurre sea del tipo de apoptosis (Heintz, 1993, *TIBS*, 18:157-159; Walkinshaw et al., 1994, *Neurosci*, 63:975-987). Dicha muerte celular ha sido relacionada con el control del ciclo celular. La muerte celular programada sería una respuesta fisiológica ante señales aberrantes (en este caso dadas por los radicales libres) en células totalmente diferenciadas y sin capacidad proliferativa (neuronas). Las mismas señales que en células con capacidad proliferativa inducen la proliferación (cáncer), en las que no la tienen inducen, mediante la activación de las mismas proteínas del ciclo celular, la muerte celular programada (Heintz, 1993; Freeman et al., 1994, *Neuron*, 12:343-355), habiéndose demostrado que los inhibidores del ciclo celular, como la N-acetilcisteína, pueden inhibir la apoptosis en células neuronales (Ferrari et al., 1995, *J Neurosci*, 15(4):2857-2866).

La melatonina es una hormona sintetizada fundamentalmente en la glándula pineal, aunque su síntesis también se ha demostrado en otros tejidos. Durante años se pensó que su única función estaba en relación con el control de los ritmos circadianos y con el control estacional de la reproducción. Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que es un antioxidante importante, tanto de forma directa, por su capacidad de depurar radicales libres (Reiter, 1997, *Advances Mannacol*, 38:103-117) como indirectamente, elevando el mRNA para las enzimas antioxidantes (Antolín et al., 1996, *FASEB J*, 10:882-890). Además, también se demostró que es capaz de prevenir la muerte celular programada (apoptosis) en otros tejidos, estando los mecanismos implicados en esta prevención en relación con su capacidad antioxidante (Sainz et al., 1995, *J Pineal Res*, 19:178-188). Finalmente, la melatonina es un inhibidor de la proliferación celular, habiéndose demostrado esto especialmente en líneas celulares de cáncer de mama (Hill et al., 1988, *Cancer Res*, 48:6121-6126).

Esta hormona disminuye con la edad, siendo hasta el momento el único agente antioxidante endógeno que se ha demostrado que lo hace, justificando el hecho de que el sistema nervioso sea dañado por los radicales libres precisamente a partir de la edad adulta. La melatonina, además de ser el antioxidante endógeno más potente de los conocidos hasta el momento, tiene la particularidad de que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y su doble naturaleza liposoluble e hidrosoluble le permite entrar en todos los compartimentos de la célula, pudiendo ejercer su efecto en cualquiera de ellos que lo necesite. Se ha demostrado que tiene efecto protector tanto sobre los lípidos, como sobre las proteínas y sobre el DNA. A todo esto hay que sumar el hecho de la falta de efectos secundarios que presenta, tanto tras administración aguda como crónica y a dosis más altas de las razonables para su uso en

clínica. (Reiter, 1995, *FASEB J*, 9:526-533). Esta hormona ha sido administrada obteniendo los niveles deseados en plasma, tanto oral como parenteralmente sin ninguna contraindicación, aunque habitualmente, por la mayor facilidad que esto implica, se hace por vía oral. Aunque se puede administrar en varias tomas, se suele hacer en una sola dosis a última hora del día, ya que de esta forma se mimetiza el ritmo fisiológico de la melatonina con aumento de los niveles en plasma durante la noche.

El tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas está lejos de ser efectivo. Hasta ahora se utiliza fundamentalmente el tratamiento sustitutivo (L-dopa) con alta incidencia de efectos secundarios después de no mucho tiempo de su inicio. Se han ensayado antioxidantes sintéticos (deprenil -inhibidor de la MAO-B-, desferroxamina -agente quelante-, esteroides sintéticos, factores neurotróficos, etc.), sin resultados que hayan supuesto su aplicación en clínica, no habiendo estudios sobre los naturales, bien producidos por las propias neuronas o que entren fácilmente en el cerebro. Se están realizando actualmente ensayos clínicos con otros antioxidantes (vitamina C y vitamina E). Sin embargo, dada la naturaleza química de éstos, sólo pueden ejercer su función a nivel de un compartimento celular, bien la membrana celular en el caso de los liposolubles (vitamina E), el medio acuoso que provee el citoplasma en el caso de los hidrosolubles (vitamina C), etc.

La facilidad de la melatonina para atravesar la barrera hematoencefálica, su capacidad de ejercer sus efectos en todos los compartimentos celulares y su alta capacidad antioxidante e inhibidora de la proliferación celular, junto con la inexistencia de efectos secundarios tras su administración, son ventajas sobre el resto de tratamientos que se han ensayado hasta ahora en estas enfermedades y que de hecho no han demostrado ser efectivos.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere al uso de la melatonina en la preparación de composiciones útiles para prevenir y para evitar el progreso de los síntomas en las enfermedades neurodegenerativas. También se refiere al uso de esta hormona en combinación con otros antioxidantes o con otros inhibidores de la proliferación celular para el tratamiento y prevención de dichas alteraciones. El uso de esta hormona tiene las ventajas sobre otros medicamentos utilizados en dichos tratamientos de que es un agente antioxidante e inhibidor de la proliferación celular endógeno que no posee efectos secundarios, atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, y ejerce sus efectos en todos los compartimentos celulares.

Se ha utilizado para demostrar su efectividad un modelo experimental in vitro de la enfermedad de Parkinson. Dicho modelo consiste en la inducción de muerte celular programada mediante dosis bajas de 6-hidroxidopamina (productora de radicales libres) en células dopaminérgicas (línea celular PC12). Se ha probado mediante diversos métodos de estudio de la apoptosis que la melatonina previene la muerte celular causada por la hidroxidopamina en estas células. Estudiando los métodos por los que esta hormona ejerce dicho efecto, se prueba que eleva el mRNA para

varias enzimas antioxidantes y que inhibe la proliferación celular de las células objeto del estudio.

Descripción detallada de la invención

La invención consiste en la aplicación de la neurohormona melatonina, sola o en combinación con otros agentes antioxidantes o inhibidores de la proliferación celular, para evitar la progresión de los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas en cuyo origen esté implicado el estrés oxidativo, así como del envejecimiento.

La implicación de los radicales libres en el origen de las enfermedades neurodegenerativas se ha sugerido desde hace tiempo, habiéndose desarrollado algunos modelos experimentales tanto in vivo como in vitro. Usualmente se utilizan diversas neurotoxinas que producen síntomas similares a los mostrados por la enfermedad idiopática en humanos. El modelo experimental in vivo más habitualmente utilizado es el de la enfermedad de Parkinson. En este modelo se utiliza la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o el 1-metil-4-feniltetrahidropiridina (MPTP) en dosis agudas para inducir dicha enfermedad. Para los modelos in vitro de la enfermedad de Parkinson, se han utilizado células dopaminérgicas (PC 12) tratadas también con estas sustancias. En los modelos experimentales in vitro se descubrió que estas sustancias pueden inducir muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis, dependiendo de la dosis que se utilice. Dosis bajas, tanto de 6-OHDA como de MPTP inducen muerte celular por apoptosis, mientras que dosis altas inducen muerte celular por necrosis. Dado que la enfermedad de Parkinson en particular y las enfermedades neurodegenerativas en general son enfermedades de evolución lenta y prolongada, y que sus síntomas aparecen tardíamente (en la enfermedad de Parkinson, cuando la pérdida neuronal en la sustancia negra es de un 80%), se ha propuesto que el mecanismo de muerte neuronal en estas alteraciones es por apoptosis. Por lo tanto, en los modelos in vitro para el estudio de la enfermedad de Parkinson, se utilizan dosis bajas de neurotoxina con la finalidad de producir apoptosis. En los modelos in vivo, se produce la enfermedad de una forma aguda no mencionando la bibliografía el tipo de muerte producida, aunque dada la rapidez de aparición de los síntomas es fácil pensar que sea una necrosis, por lo que no se puede asegurar que estos modelos in vivo sean los más adecuados para el estudio de dichas enfermedades. Por otro lado, en dichos modelos, la apoptosis es más difícil de determinar, ya que no es fácil localizar en un momento puntual las posibles células apoptóticas, por su escasez en un momento dado y por la falta de inflamación del tejido circundante. Es por esto que se ha utilizado un modelo in vitro, donde es posible controlar el tipo de muerte celular inducida.

Como modelo experimental se ha utilizado la línea celular PC12 en la que se ha inducido muerte celular mediante la adición al medio de cultivo de 6-OHDA.

La línea celular PC12 deriva de células de feocromocitoma de rata, que son secretoras de dopamina y norepinefrina. Cuando se añade al medio de cultivo factor de crecimiento neural (NGF), estas células cesan de multiplicarse y se proveen

de neuritas, adquiriendo las características morfológicas y funcionales de neuronas; neuronas que, por otra parte, no pierden su capacidad para la síntesis de dopamina, por lo que se pueden considerar un modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Parkinson, ya que en ésta las células afectadas son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.

La 6-OHDA destruye las neuronas que contienen catecolaminas (y por tanto dopamina). El mecanismo utilizado por esta neurotoxina para inducir muerte celular es a través de la producción de radicales libres. La inyección de esta sustancia en la sustancia negra induce degeneración del sistema dopaminérgico nigro-estriatal, siendo utilizada para inducir Parkinson experimental in vivo. Su adición al medio de cultivo en dosis bajas induce la muerte celular programada de las células PC12 tanto diferenciadas (neuronales) como sin diferenciar (naive). Si se añade en dosis altas produce necrosis celular de ambos tipos neuronales.

Se utilizaron células PC12 tanto naive como neuronales. Las células PC12 naive se cultivaron en placas revestidas con 0.1 mg/ml de colágeno de rata en medio RPMI 1640 suplementado con suero de caballo al 10 %, suero fetal bovino al 5 %, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 0.25 μ g/ml de anfotericina. Las células PC12 neuronales se obtuvieron mediante tratamiento de las células PC 12 naive en medio RPMI 1640 suplementado con suero de caballo al 1 %, con NGF a una concentración de 100 μ g/ml durante 14 días. Para inducir la muerte celular, a los cultivos de ambos tipos celulares se les añadieron varias dosis de 6-OHDA (25, 50, 100 y 250 μ M). Por cada una de estas dosis se hizo un grupo con preincubación durante 3 horas con melatonina 10^{-7} (dosis farmacológica, equivalente a la administración in vivo en humanos de 1-10 mg) y 10^{-9} M (dosis fisiológica, equivalente a la administración in vivo en humanos de 0.1-1 mg) y otro sin ella. En cada grupo experimental se utilizaron 3 placas de cultivo. Los resultados expuestos fueron similares en tres experimentos independientes.

Descripción de las realizaciones específicas y figuras de la invención

Determinación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular (que no distingue entre células muertas por necrosis o por apoptosis) se utilizaron la exclusión del Azul de Tripán (método convencional) y el ensayo de la reducción de MTT.

El ensayo de MTT se basa en la transformación de la sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro] en un producto azulado (formazan) por parte del enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. La conversión sólo tiene lugar cuando las células están vivas y la cantidad de formazan producida es proporcional al número de células presentes.

Tras los distintos tratamientos, se retiró el medio a las placas y se añadió MTT a una concentración de 1 mg/ml. La incubación con MTT se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C. El formazán, una vez producido, se disolvió en un tampón de lisis (20 % SDS, 50 % N-N'dimetilformamida, pH 4.7) y el color se estimó por densitometría a 570

nm de longitud de onda.

Marcaje de las células apoptóticas

Se realizó mediante la técnica de TUNEL. Esta técnica se basa en la incorporación a los extremos del DNA de deoxiuridina trifosfato mediada por una transferasa terminal y amplificada mediante la avidina-biotina (ABC, Vectostain). Indica el número de extremos 3'OH presentes en el núcleo, y el marcaje obtenido es proporcional al nivel de fragmentación del DNA. Se utilizaron secciones de 3 μ m de células incluidas en metacrilato (HistoresinTM, Reicher-Jung, Germany) según protocolo standard. Dichas secciones se desproteínezaron por incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente con 5 μ g/ml de proteinasa K. Se lavaron con agua mili Q y se inactivó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 2 % durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo los portas con agua mili Q y se preincubaron las secciones con el tampón para la enzima (30 mM de Trizma base, pH 7.2; 140 mM de cacodilato sódico y 1 mM de cloruro de cobalto) durante 5 minutos. A continuación se añadieron 0.3 unidades de TdT y 0.1 unidades de biotin-dUTP cubriendo las secciones. La incubación se realizó en una atmósfera húmeda a 37°C durante 1 hora. Luego se sumergieron los portas en tampón TB (300 mM de cloruro de sodio y 30 mM de citrato de sodio) durante 15 minutos a temperatura ambiente para parar la reacción. Una vez detenida ésta, las secciones se cubrieron con se-roalbúmina bovina durante 10 minutos a temperatura ambiente y se sumergieron en PBS. Se cubrieron con avidina-biotina unida a peroxidasa, diluida en PBS durante 45 minutos a 37°C. Finalmente se cubrieron con diaminobenzidina disuelta en H₂O₂ al 0.01 % en PBS.

Estudios morfométricos

En las células naive se realizaron en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina después de incluirlas en resina Spurr por métodos convencionales. Se tiñeron varias secciones semifinas de 1 μ m separadas al menos por 20 μ m. En cada grupo se contó un área de al menos 2 mm². Se contaron como células apoptóticas aquellas mostrando condensación de la cromatina en el núcleo y basofilia intensa.

En las células neuronales, dichos estudios se realizaron mediante tinción con naranja de acridina. Las células sueltas en el sobrenadante se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos. Se resuspendieron en un volumen pequeño de RPMI 1640 y se fijaron en un eppendorf con un volumen igual de paraformaldehído al 4 %. Se añadió un volumen igual de solución de naranja de acridina (10 μ g/ml de naranja de acridina en salino en tampón fosfato) y las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia después de su montaje en un porta. Se contaron como células apoptóticas las que mostraban intensa fluorescencia en el núcleo, valorándose al menos 1000 células por grupo.

Morfología de las células neuronales

Observación de células en placas de Petri mediante el uso del microscopio invertido.

Fragmentación celular

Los estudios de la fragmentación celular (ca-

racterística de muerte celular programada o apoptosis) se realizaron mediante el análisis del DNA, una vez extraído de las células por métodos convencionales, por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Cuantificación de la fragmentación celular

Se realizó mediante la técnica de Burton. Las células se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos a 4°C. El pellet se incubó en 400 µl del buffer de lisis (0.2% de tritón X-100, Tris 10 mM y EDTA 1mM) a pH 8 durante 20 minutos en hielo y luego se centrifugó otros 20 minutos a 13.000 xg a 4°C. El sobrenadante contiene el DNA de bajo peso molecular. El pellet resultante (conteniendo el DNA de alto peso molecular) se resuspendió en 400 µl del mismo buffer de lisis. Ambos DNA, el de bajo p.m. (en el sobrenadante) y el de alto p.m. (en el pellet resuspendido), se precipitaron con 12.5% TCA durante 18 horas. Ambos fueron después centrifugados a 13.000 xg durante 5 minutos a 4°C y extraídos de los precipitados con 30 µl de ácido perclórico 1 M y 30 µl de NaOH 5 mM a 70°C durante 20 minutos. Luego se cuantificaron en un lector de ELISA a 600 nm de longitud de onda. El porcentaje de fragmentación se calculó con la siguiente fórmula: $[(\text{OD } 600 \text{ del sobrenadante}) / (\text{OD } 600 \text{ del pellet} + \text{OD } 600 \text{ del sobrenadante})] \times 100$.

Análisis Northern

Los estudios de mRNA para enzimas antioxidantes se realizaron mediante análisis Northern hibridando el RNA total de las células con el cDNA para dichas enzimas. El RNA se extrajo por métodos convencionales. Después de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, las muestras fueron transferidas a membranas de nylon (Amersham. Life Sciences). La hibridación se realizó a 42°C durante toda la noche en solución standard conteniendo 50% de formamida. Se utilizaron para ésta, las siguientes sondas: un fragmento EcoRI de 1.4 kb que contiene el cDNA de la MnSOD del clon pSP65 de rata; un fragmento EcoRI de 0.6 kb con el cDNA de la CuZn-SOD del clon pUC13 de rata; un fragmento Sall de 0.8 kb con el cDNA de la GSH-pX del clon LK440 de rata; un fragmento Hind III/EcoRI de 1.6 kb con el cDNA de la catalasa del clon pTZCTL de rata; y un fragmento BamHI de 2.1 kb con la β-actina humana del clon pHFBA-1. El filtro se expuso a continuación a una placa de autoradiografía durante toda la noche y las señales se cuantificaron por densitometría.

Análisis estadísticos

En cada experimento se utilizaron tres placas por grupo. Los resultados expuestos son la media de tres experimentos independientes. Los datos se presentan como medias ± SEM. La significación estadística se estudió mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por un test de Student-Newinan-Kewls.

Resultados

La melatonina aumenta la supervivencia de las células PC12 tratadas con 6-OHDA.

Para estudiar el efecto de la melatonina en la viabilidad de células PC 12 tratadas con 6-OHDA se trataron dichas células con 6-OHDA 25, 50, 100 y 250 µM, con o sin preincubación durante 3 horas con melatonina 10⁻⁷M y 10⁻⁹. El porcentaje de

células viables en los grupos tratados con ambas dosis de melatonina no disminuyó cuando la dosis de 6-OHDA fue baja (25 y 50 µM) y disminuyó menos que en los grupos sin melatonina cuando la dosis de 6-OHDA fue alta (100 µM). Ninguna de las dosis de melatonina probadas pudo prevenir la pérdida de viabilidad celular cuando la dosis de 6-OHDA fue masiva (250 µM) (Figura 1).

La melatonina previene el aumento en el número de células apoptóticas en células PC 12 naive y neuronales tratadas con 6-OHDA.

El tipo de muerte celular implicado en las enfermedades neurodegenerativas es la apoptosis, que en el modelo experimental descrito se induce cuando se emplean dosis bajas de 6-OHDA (25 y 50 µM), aunque a la dosis de 100 µM a pesar de que la mayoría de las células mueren por necrosis, también hay un número considerable de células apoptóticas. Se analizó el efecto que dosis farmacológica y dosis fisiológica de melatonina tienen sobre el aumento del número de estas células que se produce tras la adición al medio de cultivo de las dosis de 6-OHDA previamente indicadas.

El marcaje realizado con la técnica de TUNEL mostró que con la de 50 µM de 6-OHDA se observan células apoptóticas que no aparecieron cuando los grupos eran además tratados con melatonina (Figura 2).

Los estudios morfológicos mediante tinción con azul de toluidina a las dosis bajas de 6-OHDA con o sin melatonina mostraron los mismos resultados. En ellos se realizaron los estudios morfométricos con los resultados que a continuación se detallan:

La cantidad de células naive apoptóticas fue siempre más baja en las células tratadas con melatonina: un 40% más baja con ambas dosis de melatonina en los grupos tratados con 6-OHDA 25 µM; un 53% más baja con ambas dosis de melatonina en los grupos tratados con 6-OHDA 50 µM; un 28% más baja con melatonina 10⁻⁹M y 6-OHDA 100 µM; y un 13% más baja en los grupos tratados con melatonina 10⁻⁷M y 6-OHDA 100 µM (Figura 3A).

En los estudios morfológicos con azul de toluidina en células tratadas con o sin melatonina y dosis altas de 6-OHDA (100 µM) se observó que a pesar de que aparecen células apoptóticas, la mayor parte de las células muestran una morfología típica de necrosis. La melatonina no sólo previene la muerte celular por apoptosis, sino que las células necróticas también son más escasas, observándose abundantes células normales.

En las células neuronales PC12 los estudios morfométricos se realizaron mediante tinción en las placas de las células con naranja de acridina observando los resultados bajo un microscopio de fluorescencia. La melatonina también previno la muerte celular inducida con todas las concentraciones utilizadas de 6-OHDA. El grupo tratado con melatonina más 6-OHDA 25 µM tuvo un 65% menos de células apoptóticas que el grupo tratado solo con la misma concentración de neurotoxina. Cuando la concentración de 6-OHDA fue 50 µM, el número de células apoptóticas cayó en un 32% en el grupo tratado además con melatonina. Finalmente, las células tratadas con melatonina más 6-OHDA 100 µM mostró un 50% menos de célu-

las apoptóticas que el grupo tratado sólo con la neurotoxina (Figura 3B).

En los estudios morfológicos de estas células neuronales tratadas con 6-OHDA 50 y 100 μM en las placas de cultivo se observó que con la dosis más baja las células comienzan a perder las neuritas, y la melatonina previene totalmente esta pérdida. Con la dosis alta las células vivas son escasas, observándose abundantes restos celulares. La melatonina previene en gran parte, aunque no totalmente esta muerte, encontrándose células incluso con neuritas (Figura 4).

La melatonina previene el aumento de fragmentación de DNA inducido por 6-OHDA en células PC12 naive y neuronales.

Dado que la característica bioquímica más típica de la apoptosis es la fragmentación del DNA en fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases, se estudió el efecto que tiene la melatonina a dosis farmacológica y fisiológica en la cantidad de dicha fragmentación.

La electroforesis en gel de agarosa del DNA de las células de los diferentes grupos utilizados (células tratadas con 6-OHDA 25, 50 y 100 μM con o sin preincubación de tres horas con ambas dosis, farmacológica y fisiológica de melatonina), mostró que la melatonina previene dicha fragmentación. Esto se observó con especial claridad en el grupo tratado con 6-OHDA 50 μM más melatonina, frente al grupo tratado sólo con la neurotoxina a dicha dosis.

La cuantificación de dicha fragmentación mediante la técnica de Burton permite afirmar que la melatonina previene la fragmentación del DNA inducida con 6-OHDA en células PC12: Esta neurohormona previene totalmente (100%) la fragmentación del DNA cuando la concentración de 6-OHDA es de 25 μM ; la previene en un 74% cuando la concentración de 6-OHDA utilizada es de 50 μM ; y en un 58% cuando la concentración de 6-OHDA es de 100 μM (Figura 5).

La melatonina previene el descenso de mRNA para enzimas antioxidantes que ocurre después del tratamiento con 6-OHDA.

El daño inducido por 6-OHDA es a través de la producción de radicales libres, habiendo sido estos radicales implicados no solo en la génesis de la enfermedad de Parkinson sino también en la de otras enfermedades neurodegenerativas. La melatonina es un antioxidante potente, tanto directamente por su capacidad para depurar radicales libres, como indirectamente elevando el mRNA para enzimas antioxidantes.

Se estudió el efecto de la melatonina a dosis farmacológica sobre el mRNA para la glutathion peroxidasa (GSH-Px), la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), la cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD) y la catalasa en células tratadas con 6-OHDA 50 μM . No se detectó señal para la catalasa. La 6-OHDA disminuye el mRNA para la GSH-Px (90%), la Mn-SOD (40%) y la Cu-Zn-SOD (50%). La melatonina previene estas disminuciones en un 50% para la GSH-Px, en un 100% para la Mn-SOD, y en un 100% para la Cu-Zn-SOD (Figuras 6 y 7).

La melatonina inhibe la proliferación celular en las células PC 12.

Se ha demostrado que inhibidores de la prolife-

ración celular pueden prevenir la apoptosis inducida mediante otros agentes en las células PC12. Dado que la melatonina inhibe dicha proliferación en otros sistemas, se estudió si también lo hace en estas células, pudiendo contribuir este efecto junto con su capacidad antioxidante a prevenir la muerte celular.

Los estudios de viabilidad celular en células PC12 naive (y por tanto con capacidad proliferativa) tratadas con melatonina demuestran que la melatonina inhibe su proliferación (Figura 8A). Se demuestra mediante estudios morfológicos que el menor número de células en los grupos tratados con melatonina no es debido a que esta hormona produzca su muerte, ya que no se detectan ni células apoptóticas ni necróticas, presentando todas las células un aspecto normal. Los estudios morfométricos muestran incluso un menor número de células apoptóticas en los grupos tratados con melatonina (menor número de células totales) que en los grupos control (Figuras 3A y 3B). Por otro lado, la melatonina no disminuyó la viabilidad celular en las células neuronales (sin capacidad proliferativa) (Figura 8B), lo que confirma que el descenso en la viabilidad de las células naive no fué debido a inducción de muerte celular, sino a inhibición de la proliferación celular. La cuantificación de DNA total en las células naive dió resultados paralelos a los del número total de células viables, lo que confirma la disminución de éstas (Figura 9).

Descripción de las figuras

Figura 1.- Porcentaje de viabilidad de las células PC12 después del tratamiento con las concentraciones indicadas de 6-OHDA sola (círculos) o con melatonina (10^{-7} M, triángulos y 10^{-9} M, cuadrados).

A) Ensayo de reducción del MTT.

B) exclusión del azul de tripán.

a y b, $p < 0.05$ frente a los grupos tratados con las mismas dosis de 6-OHDA sin melatonina.

Las gráficas son ligeramente diferentes porque el MTT mide alteraciones en el metabolismo celular en estadios más tempranos que el ensayo de exclusión del azul de tripán.

Figura 2.- Secciones de células PC12 tratadas con 6-OHDA 50 μM con (inferior) o sin (superior) melatonina 10^{-7} M incluidas en resina Spurr teñidas mediante la técnica del TUNEL. Cabezas de flecha: células apoptóticas. El tratamiento con 6-OHDA induce apoptosis, mientras que en el grupo tratado con melatonina no se observan células apoptóticas.

Figura 3.- Porcentajes de células PC12 apoptóticas A) naive y B) neuronales después del tratamiento con las dosis indicadas de 6-OHDA sola (diamantes) o con melatonina (10^{-7} M, cuadrados y 10^{-9} M, triángulos). a y b, $p < 0.05$ frente a los grupos tratados con las mismas dosis de 6-OHDA sin melatonina. Las células de los grupos control muestran menos células apoptóticas cuando son tratadas con melatonina.

Figura 4.- Morfología de las células neuronales PC12 tratadas con 6-OHDA con o sin melatonina. Superior: células sin ningún tratamiento. Media izquierda: células tratadas con 6-OHDA 50 μM .

Media derecha: células tratadas con 6-OHDA 50 μM más melatonina 10^{-7} M.

Inferior izquierda: células tratadas con 6-OHDA 100 μM .

Inferior derecha: células tratadas con 6-OHDA 100 μM más melatonina 10^{-7} M.

Se observa que a la dosis de 50 μM de 6-OHDA, la melatonina evita totalmente la degeneración celular. Cuando la dosis de 6-OHDA es de 100 μM , la melatonina evita sólo en parte esta degeneración; sin embargo, en dicho grupo se observan incluso algunas neuritas.

Figura 5.- Porcentaje de fragmentación del DNA en células PC12 tratadas con las dosis indicadas de 6-OHDA sola (diamantes) o con melatonina 10^{-7} M (cuadrados). a, b y c, $p < 0.05$ frente a los grupos tratados con las mismas dosis de 6-OHDA sin melatonina.

Figura 6.- Autorradiografía del northern del mRNA para varias enzimas antioxidantes, MnSOD, GSH-Px y Cu-Zn-SOD. Los grupos experimentales fueron: células PC12 naive sin ningún tratamiento (CON), células tratadas con melatonina 10^{-7} M (MEL), tratadas con 6-OHDA 50 μM (6-OHDA) y tratadas con 6-OHDA 50 μM y melatonina 10^{-7} M (MEL + 6-OHDA). La señal de la hibridación con actina se utilizó para relativizar el valor del resto de las señales.

Figura 7.- Porcentaje de descenso del mRNA para las enzimas antioxidantes MnSOD, GSH-Px (Gpx) y Cu-Zn-SOD en las células PC12 después del tratamiento con la dosis indicada de 6-OHDA y su recuperación cuando además de ésta se añadió al medio de cultivo la concentración indicada de melatonina. Los valores del mRNA obtenidos midiendo la señal autorradiográfica en el densitómetro para cada enzima fueron normalizados con respecto al valor de la β -actina para evitar el posible error que pudiera derivarse de diferente carga de RNA total en las calles.

Figura 8.- Porcentaje de células PC12 naive (A) y neuronales (B) después de 6 días sin ningún tratamiento (CON) o con adición al medio de melatonina 10^{-7} M (MEL 10^{-7}) y 10^{-9} M (MEL 10^{-9}). a, $p < 0.05$ frente a CON. En las células con capacidad proliferativa (A) la melatonina disminuye el número de células. El hecho de que no lo haga en las células sin dicha capacidad (B), indica que la melatonina no produce muerte celular, sino que inhibe la proliferación celular en las células PC 12.

Figura 9.- Porcentaje de cantidad total de DNA en células PC12 naive después de 6 días sin ningún tratamiento (CON) o tratadas con las concentraciones indicadas de melatonina. a, $p < 0.05$ frente a CON.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Uso de la melatonina sola o en combinación con otros antioxidantes o con otros inhibidores de la proliferación celular, en la preparación de composiciones útiles para el tratamiento en mamíferos del avance progresivo de los síntomas asociados con enfermedades neurodegenerativas y con el envejecimiento, así como para la prevención de dichas enfermedades.

2. Uso de composiciones, de acuerdo con la reivindicación número 1, donde los mamíferos son humanos y las enfermedades neurodegenerativas son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la corea de Huntington, las degeneraciones espinocerebelosas, y otras enfermedades **caracterizadas** por degeneración de neuronas motoras y otras neuronas del sistema nervioso central.

3. Uso de composiciones, de acuerdo con la reivindicación número 1, donde la dosis total diaria de melatonina, administrada en una o más

veces, está en un rango entre 1ng y 100 mg.

4. Uso de composiciones, de acuerdo con la reivindicación número 3, donde la dosis total diaria de melatonina, está en un rango entre 0.1 mg. (dosis fisiológica) y 10 mg (dosis farmacológica).

5. Uso de composiciones, de acuerdo con la reivindicación número 3, donde la dosis total diaria de melatonina se administra en una sola vez.

6. Uso, de acuerdo con la reivindicación número 3, donde la composición conteniendo melatonina es administrada por vía oral, rectal, parenteral o por cualquier otra vía.

7. Uso de composiciones, de acuerdo con la reivindicación número 1, donde los antioxidantes sean, aunque no exclusivamente, factores neurotróficos, esteroides de síntesis, la vitamina C, la vitamina E y la desferroxamina u otros quelantes del hierro o del cobre.

8. Uso de composiciones, de acuerdo con la reivindicación número 1, donde los inhibidores de la proliferación celular sean, aunque no exclusivamente, la N-acetilcisteína.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

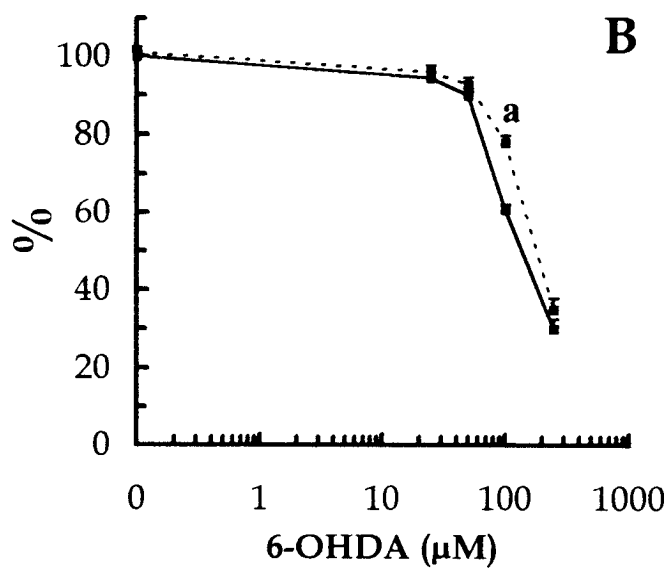
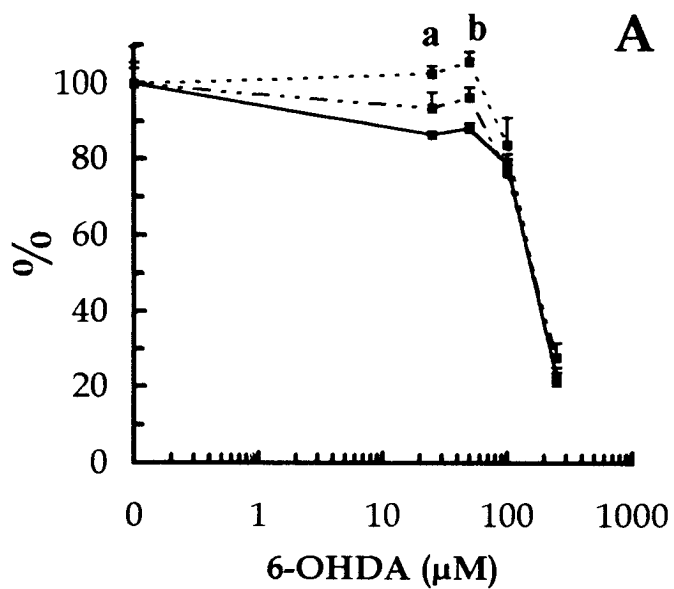


FIGURA 1

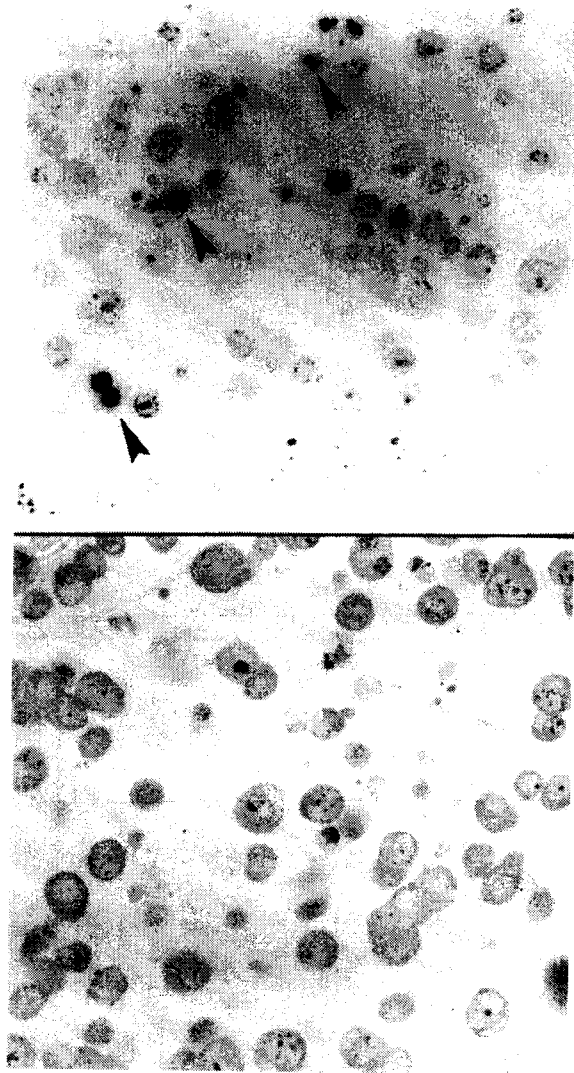


FIGURA 2

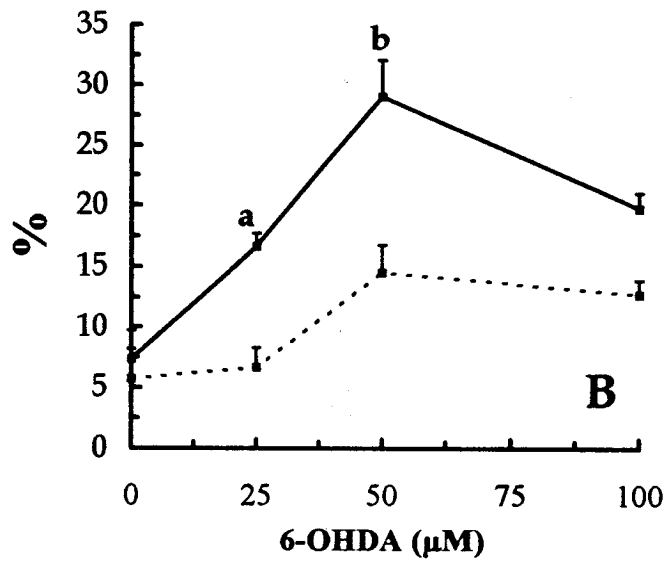
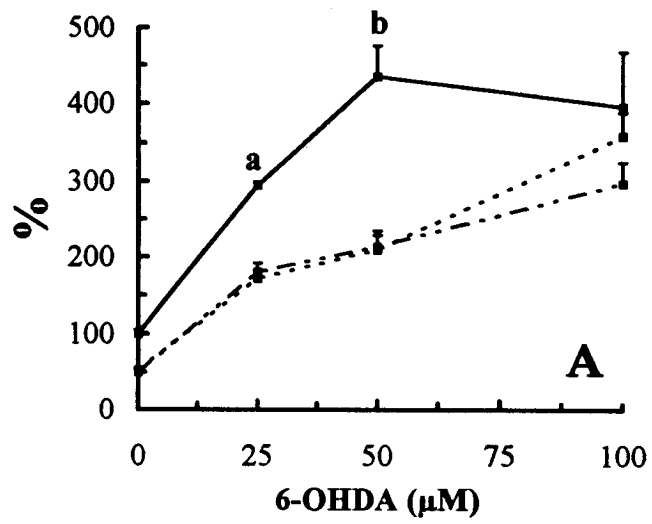


FIGURA 3

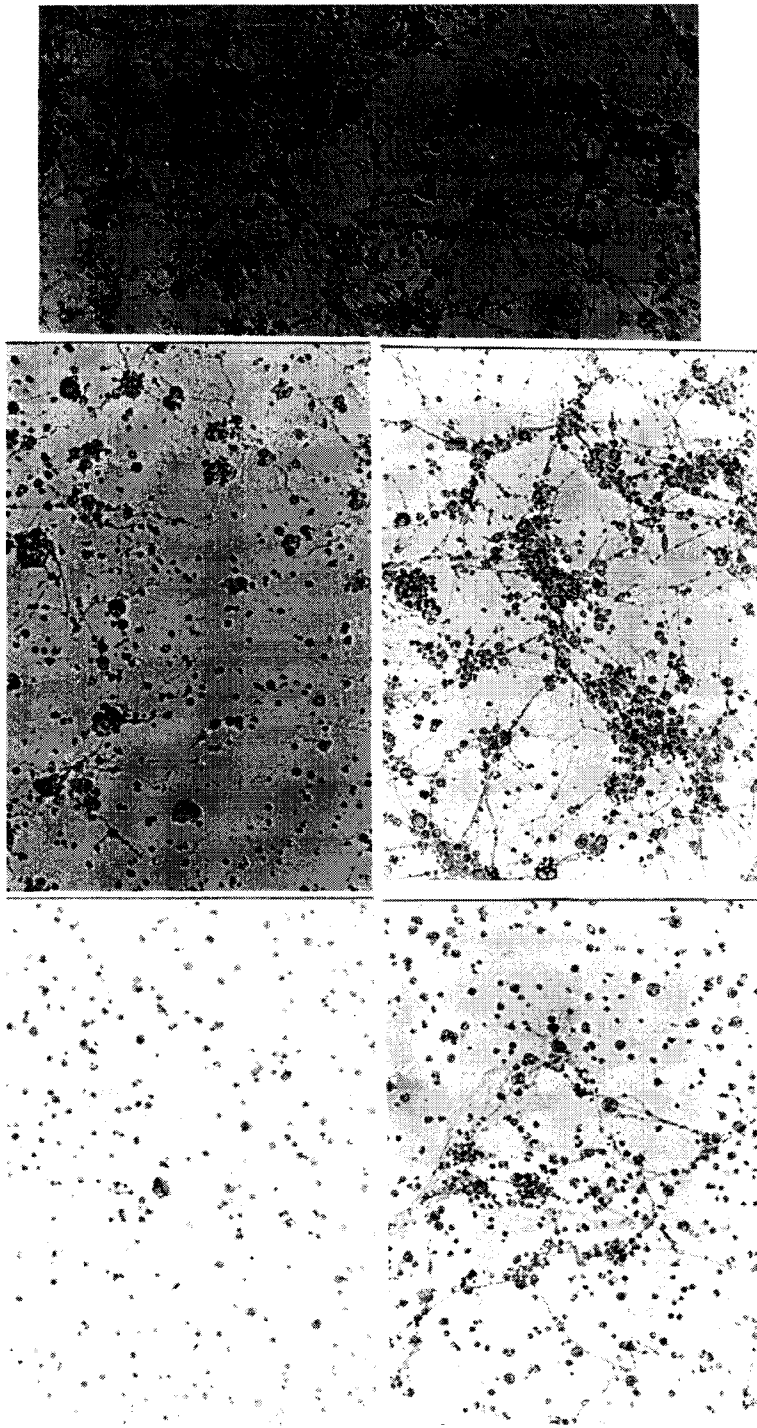


FIGURA 4

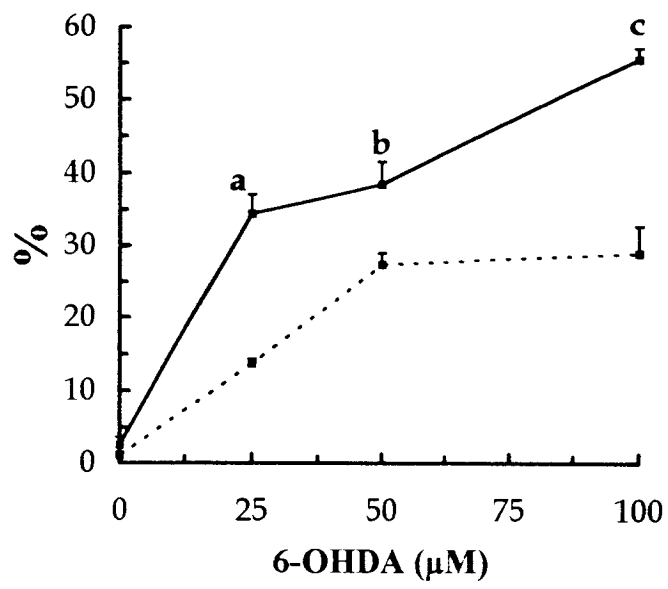


FIGURA 5

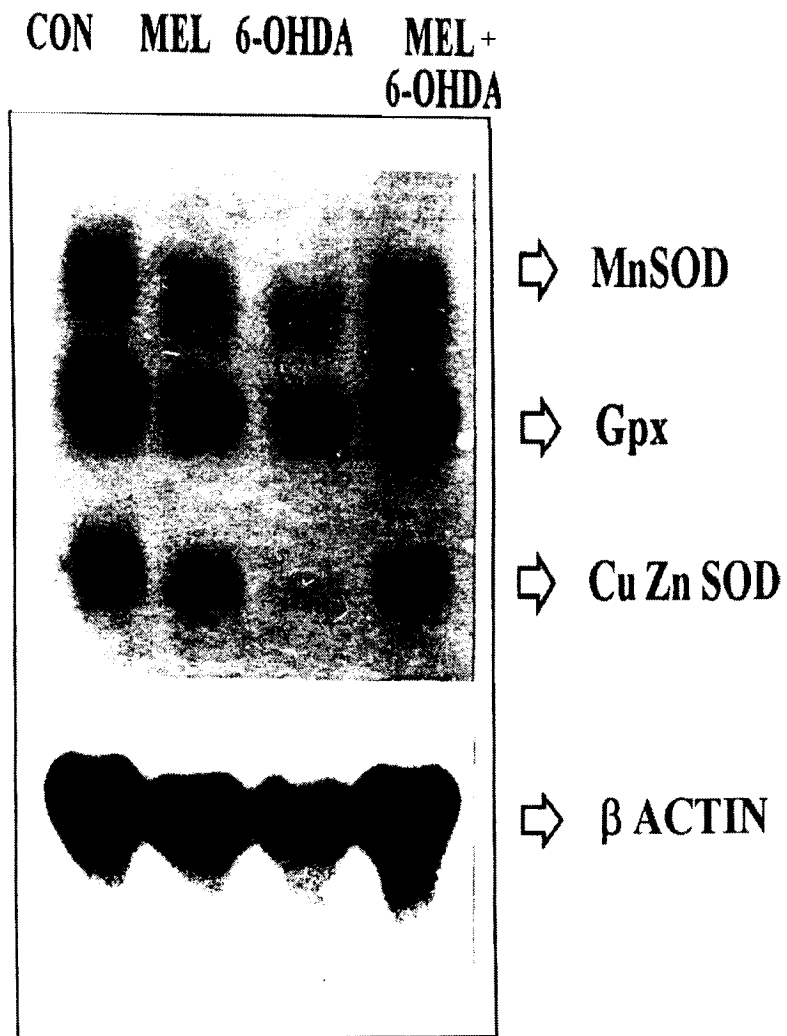


FIGURA 6

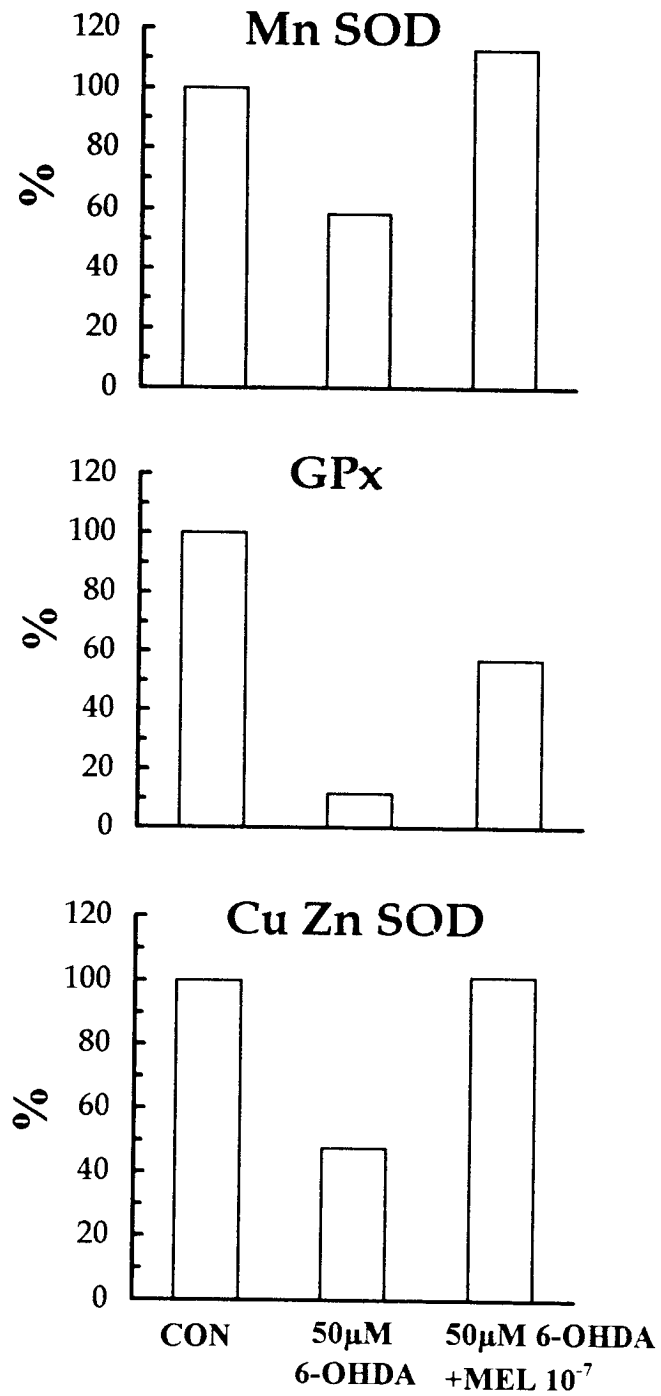


FIGURA 7

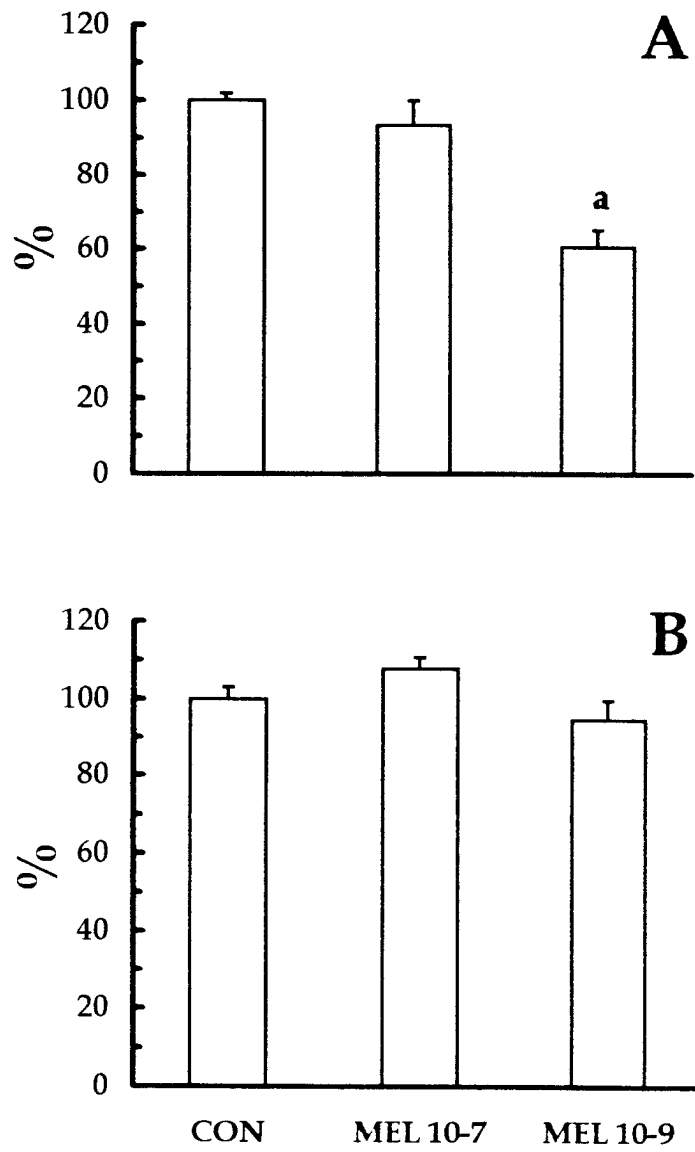


FIGURA 8

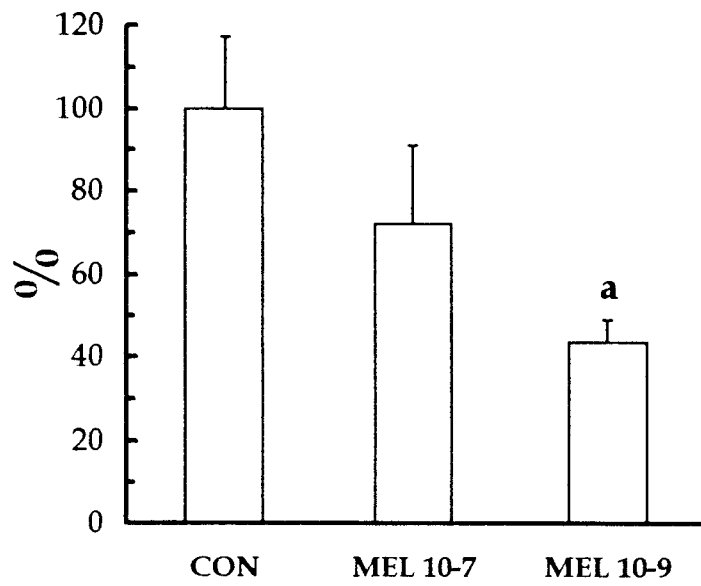


FIGURA 9



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 31/40

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al.: "Melatonin is protective against MPTP-induced striatal hippocampal lesions", Life Sciences, (1997), Vol. 60 (2), páginas 23-29, todo el documento. | 1,3-6 |
| X | ANTON-TAY, F. et al.: "On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications", Life Sciences, (1971), Vol. 10, part I, páginas 841-850, páginas 848-849: "discussion". | 1-3,5,6 |
| X | GIUSTI, P. et al.: "In vitro and in vivo protection against kainate-induced excitotoxicity by melatonin", J. Pineal Res., (1996), Vol. 20, páginas 226-231, página 231, último párrafo. | 1,2 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

08.06.99

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1