

DEMOSTRACIÓN *IN VIVO* DE QUE SEROTONINA PASA LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA. COMPARACIÓN CON OTRAS TRIPTAMINAS

Jorge O. Ciprian-Ollivier, Arturo A. Vitale y Alicia B. Pomilio

Área de Hematología, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires. avitale@ffyb.uba.ar; pomilio@ffyb.uba.ar

Introducción

Ha habido controversias respecto al posible pasaje de serotonina (5-hidroxitriptamina) a través de la barrera hematoencefálica (BHE), si bien en muchos trabajos se insiste en que no la atraviesa, existen evidencias de lo contrario.¹⁻⁵

Dado que por muchos años se consideró a la BHE como una unidad esencialmente histológica, con permeabilidad selectiva determinada principalmente por las uniones estrechas del endotelio periférico, que sólo permiten el pasaje de moléculas liposolubles y de un tamaño menor a los 400 daltons, se usaba este argumento para mostrar que la serotonina sólo cumplía parcialmente con estos requisitos y por lo tanto no podía atravesarla.

Pero actualmente se ha incorporado el concepto de unidad neurovascular⁶, en la cual la interacción entre astrocitos, endotelio y células del sistema inmune regula en forma dinámica la permeabilidad selectiva de la BHE, así como el patrón de expresión génica de distintos transportadores endoteliales, con lo cual ya no es posible basarnos en el criterio histológico/morfológico de la BHE para predecir cuán permeable será a distintos compuestos.

La serotonina es una de las moléculas más antiguas filogenéticamente, que se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados e invertebrados y juega un rol de neurotransmisor/neuromodulador. También funciona como señal de desarrollo en el SNC y modula varias funciones fisiológicas en la periferia

Más aún, considerando que en la clínica hay manifestaciones claras de que la serotonina atraviesa la BHE, este grupo de investigación decidió encarar un estudio *in vivo* sobre este hecho. Para ello se encaró un estudio de radiomarcación con los emisores-gamma: I-131 y con Tc-99m, de serotonina y otros compuestos relacionados, como triptamina y *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) para poder comparar su posible captación y cuantificarla *in vivo*.

Materiales y métodos

Se sintetizó [¹³¹I]2-iodoserotonina y la identificación se realizó mediante ¹H- y ¹³C- RMN y espectros de masa directos de impacto electrónico (IE-EM); la serotonina también se marcó con Tc-99m. La serotonina marcada se inyectó en conejos por la vena marginal de la oreja. Se realizaron estudios de biodistribución dinámica en cámara-*gamma*. Se evaluaron la captación cerebral, el clearance plasmático y la excreción renal.

Los resultados se compararon con otras indolalquilaminas, que estudiáramos previamente,⁷ como triptamina y DMT.

Para ello fue necesario sintetizar DMT a partir del ácido indol-3-acético mediante las etapas sucesivas de esterificación, amidación y reducción de la amida formada en la cadena lateral a la amina *N,N*-dimetilada, DMT, según metodología que desarrolláramos para *N,N*-dimetilalquilaminas.⁸ La pureza de cada paso de síntesis y del producto final se determinó mediante ¹H- y ¹³C-RMN, IE-EM y espectrometría de masa de alta resolución (EMAR).

DMT y triptamina se marcaron con INa radioactivo, determinándose la eficiencia de la marcación y la pureza radioquímica. Se usó CGL y EM.

Todos los experimentos con animales se realizaron con protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, UBA, y de conformidad con los principios internacionalmente aceptados en el cuidado y uso de animales de experimentación.

Los estudios *in vivo* se realizaron con conejos europeos machos endocriados, ca. 2.500 g, en jaulas metabólicas individuales, con pienso estándar y agua *ad libitum*. Fotoperíodo de doce horas. Los conejos fueron cateterizados en la vena marginal de la oreja, evitando así el paso hepático; se inyectó solución salina y cada [¹³¹I]-indolalquilamina con una actividad de 11,1 MBq (= 300 mCi)/kg peso corporal.

Las imágenes fueron adquiridas cada 10 seg hasta 3 min, luego cada 30 seg hasta 60 min y después a los 90, 120, 180, 240, 360 min y 7 días d.i. Las regiones de interés (ROIs) fueron: cerebro, corazón, riñones, hígado y vejiga. Los gráficos de clearance y decaimiento se obtuvieron para los órganos diana.

Se determinó el clearance plasmático con las triptaminas marcadas con [¹³¹I] y [^{99m}Tc], recogiendo muestras de sangre a diferentes tiempos en viales de peso conocido. Se midieron en un contador-*gamma* automático y los resultados se expresaron como cuentas por minuto (cpm)/g de sangre, que después de la corrección por decaimiento se llamó actividad específica. Se hicieron gráficos de *ln*(actividad específica) vs tiempo.

Se estudió la excreción renal en muestras de orina (jaula metabólica). Alícuotas de la orina se cromatografiaron, se visualizaron las manchas y se midieron en el detector-*gamma*. Además se estudiaron los posibles metabolitos por cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-EM).

Se efectuó además la captación de estructuras cerebrales nucleares y *medulla oblongata*, con disección de bulbo, pedúnculo y tubérculo olfatorios, corteza cerebral, cerebelo y *medulla oblongata*. Se midió la radioactividad de cada homogenato y se identificaron los compuestos radioactivos.

El análisis estadístico se efectuó por análisis de varianza (ANOVA) y el test *t* de Student.

Resultados y Discusión

La pureza de 2-iodoserotonina se comprobó mediante CG, siendo superior al 99%. [¹³¹I]serotonina se obtuvo con una eficiencia de marcación cercana al 90%. La pureza radioquímica fue también muy alta, del 98,0%. La [¹³¹I]serotonina mostró el mismo comportamiento que marcada con Tc-99m en relación con la biodistribución en los ROIs, captación cerebral, tiempo de residencia y excreción.

La serotonina marcada cruzó la BHE, entró en el cerebro del conejo y fue completamente excretada en orina 10 minutos después de la inyección. La captación en el cerebro se expresó como porcentaje de dosis inyectada de serotonina marcada. El metabolito principal excretado en orina fue identificado por CG-EM como ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y en menor proporción, 5-hidroxitriptofol (5-HTOL).

La actividad de serotonina en el cerebro se comparó con otras indolalquilaminas estudiadas en nuestros laboratorios. La triptamina como neuromodulador del neurotransmisor serotonina se comportó de una manera similar, fue captada rápidamente en el cerebro y completamente excretada 10 min d.i.

En cambio, DMT marcada entró en el cerebro 10 seg d.i., cruzó BHE y se unió a los receptores; luego se excretó parcialmente por vía renal. Se la detectó en la orina dentro de las 24 hs después de la inyección (d.i.) y permaneció en el

cerebro aún después de cesar la excreción por orina; se detectó hasta 0,1% de la dosis inyectada a los 7 días d.i. en el bulbo olfatorio.

Asimismo, teniendo en cuenta que DMT y triptamina se comportan como agonistas de los receptores serotoninérgicos: 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, los relacionados con aminas traza: TAARs, y los *sigma*-1, la unión a estos últimos permitió explicar el diferente comportamiento en el cerebro de ambas indolalquilaminas. La permanencia en el cerebro se pudo explicar además porque DMT y otras *N,N*-dialquiltriptaminas son sustratos de transportadores. Pudimos determinar que a altas concentraciones, DMT es captada por el transportador de serotonina y además almacenada en vesículas por el transportador vesicular 2 de monominas, siendo liberada ante estímulos apropiados. Más aún, el almacenamiento en vesículas evita la degradación de DMT por monoamino-oxidasa (MAO). Asimismo, la marcación con I-131 demostró ser una herramienta útil para llevar a cabo estudios *in vivo* a tiempos largos.

Conclusión

Nuestros resultados demostraron que la serotonina intravenosa cruza la BHE, detectándose en el cerebro ca. 0,06% de la dosis inyectada mediante un método de medición muy sensible, fiable y no invasivo.

También lo hicieron las otras triptaminas usadas para comparación, como la triptamina que se comportó como serotonina, tal como lo esperábamos. En cambio una parte de DMT marcada con I-131 permaneció en el cerebro durante al menos 7 días d.i. Esta permanencia en el cerebro tiene importantes implicancias clínicas, ya que los pacientes con alteraciones de la percepción presentan indolalquilaminas metiladas en sus fluidos biológicos, como bufotenina, *O*-metilbufotenina y DMT, como hemos podido comprobar anteriormente.^{9,10}

La serotonina es el neurotransmisor de los receptores serotoninérgicos, mientras que DMT y triptamina se comportan como agonistas de los receptores serotoninérgicos: 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, los relacionados con aminas traza: TAARs, y los *sigma*-1. El diferente comportamiento de la *N,N*-dialquiltriptamina DMT se pudo explicar por la unión a estos últimos y porque es sustrato de transportadores: el transportador de serotonina (SERT) y transportador vesicular 2 de monominas (VMAT2) que la almacena en vesículas siendo liberada ante estímulos apropiados. El almacenamiento en vesículas evita la degradación de DMT por monoamino-oxidasa (MAO).

Referencias

1. Winkler T., Sharma H.S., Stålberg E., Olsson Y., Dey P.K. Impairment of blood-brain barrier function by serotonin induces desynchronization of spontaneous cerebral cortical activity: experimental observations in the anaesthetized rat. *Neuroscience* 1995; 68: 1097-1104.
2. Henderson L.A., Yu P.L., Frysinger R.C., Galons J.-P., Bandler R., Harper R.M. Neural responses to intravenous serotonin revealed by functional magnetic resonance imaging. *J. Appl. Physiol.* 2002; 92: 331-342.
3. Nakatani Y., Sato-Suzuki I., Tsujino N., Nakasato A., Seki Y., Fumoto M., Arita H. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27: 2466-2472.
4. Afergan E., Epstein H., Dahan R., Koroukhov N., Rohekar K., Danenber H.D., Golomb G. Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes. *J. Controlled Release* 2008; 132: 84-90.
5. Polo P.A., Reis R.O., Cedraz-Merchez P.L., Cavalcante-Lima H.R., Olivares E.L., Medeiros M.A., Côrtes W.S., Reis L.C. Behavioral and

XXXI Congreso Argentino de Química

25 al 28 de Octubre de 2016 Asociación Química Argentina

Sánchez de Bustamante 1749 – Ciudad de Buenos Aires – Argentina

The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January – December 2016 ISSN: 1852 -1207

Anales de la Asociación Química Argentina AAQAE 095 - 196

neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). *Braz. J. Biol.* 2007; 67: 167-171.

6. Neuwelt E.A., Bauer B., Fahlke C., Fricker G., Iadecola C., Janigro D., Leybaert L., Molnár Z., O'Donnell M.E., Povlishock J.T., Saunders N.R., Sharp F., Stanimirovic D., Watts R.J., Drewes L.R. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 12: 169-182

7. Vitale A.A., Pomilio A.B., Cañellas C.O., Vitale M.G., Putz E.M., Ciprian-Ollivier J. *In vivo* long-term kinetics of *N,N*-dimethyltryptamine and tryptamine in brain by radioiodination planar imaging. *J. Nuclear Med.* 2011; 52: 970-977.

8. Sintas J.A., Vitale A.A. *J. Labelled Compnds. Radiopharm.* 1997; 39: 677-684.

9. Vitale A.A., Ciprian-Ollivier J., Vitale M.G., Romero E., Pomilio A.B. Estudio clínico de marcadores de la hipermetilación indólica en las alteraciones de la percepción. [Clinical studies of markers of the indolic hypermethylation in human perception alterations]. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer.* 2010; 44: 627-642.

10. Ciprian-Ollivier J.O., Vitale A.A. y Pomilio A.B. Génesis neuroquímica molecular de las alucinaciones en la esquizofrenia. Implicancias clínicas. Eae-publishing, OmniScriptum GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Alemania. Noviembre 2015. ISBN: 978-3-659-09956-4.