



FACULTAD DE FARMACIA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO DE *TRANS*-RESVERATROL SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y SOMETIDA A SOBRECARGA  
DE CALCIO.**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**NATALIA SOFÍA CÁRDENAS SANDOVAL**

Director de Tesis: Dra. Rocío Álvarez Villalobos  
Co-director de Tesis: Dr. Raúl Vinet Huerta

2012



FACULTAD DE FARMACIA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO DE *TRANS*-RESVERATROL SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y SOMETIDA A SOBRECARGA  
DE CALCIO.**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**NATALIA SOFÍA CÁRDENAS SANDOVAL**

Director de Tesis: Dra. Rocío Álvarez Villalobos  
Co-director de Tesis: Dr. Raúl Vinet Huerta

2012

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Neurodegeneración .....	<b>1</b>
Factores que conducen a neurodegeneración.....	<b>3</b>
Homeostasis del calcio y enfermedades neurodegenerativas .....	<b>5</b>
Evidencia epidemiológica .....	<b>7</b>
Terapéutica neuroprotectora ¿Dónde nos encontramos? .....	<b>9</b>
Fitoquímicos bioactivos.....	<b>9</b>
Resveratrol .....	<b>10</b>
Efecto neuroprotector de resveratrol .....	<b>12</b>
Canales de calcio dependientes de voltaje.....	<b>13</b>
Resveratrol y canales de calcio dependientes de voltaje.....	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
Objetivo General.....	<b>19</b>
Objetivos Específicos .....	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>MATERIALES</b> .....	<b>20</b>
Reactivos.....	<b>20</b>
Soluciones .....	<b>20</b>
Línea celular.....	<b>21</b>
Herramienta farmacológica y compuesto en estudio .....	<b>21</b>
Equipos .....	<b>22</b>
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
Mantenimiento de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y .....	<b>23</b>
Recuento celular .....	<b>25</b>
Registro fotomicrográfico .....	<b>27</b>
Determinación de viabilidad celular .....	<b>27</b>
Diseño experimental.....	<b>27</b>
Mediciones de calcio citosólico .....	<b>29</b>

Análisis estadístico .....	30
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) constituyen un grupo de patologías de etiopatogenia desconocida cuya incidencia va en aumento debido al envejecimiento demográfico de la población, no existiendo terapias farmacológicas eficaces. Entre las hipótesis establecidas para explicar las EN se encuentra la hipótesis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de acuerdo a la cual aquellos factores que contribuyan a mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  podrían ser neuroprotectores. *Trans*-resveratrol (tRV), polifenol derivado del estilbeno (3,4',5-trihidroxiestilbeno), presente en uvas, arándanos y maní, ha sido propuesto como agente terapéutico en el tratamiento de EN sin haberse establecido su mecanismo de acción último. tRV inhibe los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) en miocitos cardíacos de rata y presenta una tendencia a disminuir la amplitud máxima de la corriente que fluye a través de CCDV en células cromafines bovinas, modelo clásico de neurosecreción. En este trabajo se estudió el efecto de tRV (1 y 10 nM; 1 y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad (VC) de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, sometida a muerte celular por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}^+$  120 mM/24 hrs.). La VC fue determinada con el método de exclusión con azul de tripán. La incubación con  $\text{K}^+$  120 mM durante 24 hrs indujo la muerte del  $56 \pm 4,6\%$  de las células respecto del control, efecto que fue revertido de forma significativa por nifedipino (10  $\mu\text{M}$ , antagonista selectivo de CCDV), aumentando la VC a  $103,3 \pm 11,7\%$  ( $p < 0,001$ ;  $n=7$ ). De la misma manera, tRV (10 nM) incubado de forma conjunta con  $\text{K}^+$  120 mM/24 hrs, promovió un aumento significativo de la VC ( $104,3 \pm 4,3\%$ ;  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ) respecto del valor obtenido para el control. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren la participación de los CCDV en el mecanismo que media la neuroprotección inducida por tRV en células SH-SY5Y.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases (ND) are a group of pathologies of unknown etiology whose incidence is increasing due to population ageing; so far there is no effective drugs for this disease. Among the hypotheses established to explain the ND is that of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), which assumes that factors contributing to maintain  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis could be neuroprotective. *Trans*-resveratrol (tRV), an stilbene polyphenol derivative (3,4',5-trihydroxystilbene), present in grapes, blueberries and peanuts, has been proposed as a therapeutic agent in the treatment of ND. The mechanism of action of tRV as neuroprotector is unknown. tRV inhibits voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCC) in rat cardiac myocytes; tRV also has a tendency to reduce the maximum amplitude of the current flowing through VDCC in bovine chromaffin cells, a classic model of neurosecretion. In this work we studied the effect of tRV (1 and 10 nM; 1 and 100  $\mu\text{M}$ ) on the cell viability (CV) of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, subjected to death by  $\text{Ca}^{2+}$  overload ( $\text{K}^+$  120 mM/24 hrs). CV was determined by the trypan blue exclusion method. Cell incubation with  $\text{K}^+$  (120 mM/24 hrs) induced death of  $56 \pm 4,6\%$  relative to control, an effect that was significantly reversed by nifedipine (10  $\mu\text{M}$ , VDCC selective antagonist), which increased CV to  $103,3 \pm 11,7\%$  ( $p < 0,001$ ,  $n=7$ ). Similarly, tRV (10 nM) incubated with  $\text{K}^+$  120 mM/24 hrs, promoted a significant increase in CV ( $104,3 \pm 4,3\%$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=3$ ) respect to the value obtained for control. Results obtained in this work suggest that VDCC may be involvement in the mechanism of tRV induced neuroprotection in SH-SY5Y cells.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Neurodegeneración**

La neurodegeneración es un fenómeno de destrucción o muerte neuronal que ocurre muy sutilmente en el envejecimiento fisiológico y de forma prematura en el curso de numerosas enfermedades y alteraciones vasculares (isquemia y traumatismos craneoencefálicos) (Corona y Tapia, 2005). El envejecimiento normal del cerebro es un proceso multifactorial y complejo, que está estrechamente relacionado a la edad, de ahí que su desarrollo sea sutil y este asociado a un mayor o menor grado de deterioro cognitivo (Toescu y Vreugdenhil, 2010). Por otro lado, variadas patologías del sistema nervioso central (SNC), como son la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras, tienen un rasgo común que es la pérdida de células nerviosas, muerte que se presenta de una forma más agresiva y que ocurre también por diversos mecanismos, algunos no del todo dilucidados (Swanberg y cols., 2009).

Existen numerosas vías moleculares que caracterizan las distintas formas de muerte celular. Términos como necrosis y apoptosis ya no son absolutos, sino que junto a éstos coexisten conceptos como autofagia, piroptosis, paraptosis, catástrofe mitótica, entre otros, que permiten explicar en algunos modelos los mecanismos por los cuales ocurre la muerte (De Toro, 2006). En este documento se referirá de forma general, mediante los términos de apoptosis y necrosis, al mecanismo de muerte neuronal, a modo de facilitar la comprensión y debido a que la mayoría de los autores lo expresan y clasifican de esta manera.

En un principio se pensaba que cualquier accidente isquémico, anóxico o tóxico provocaba necrosis neuronal, posteriormente se comprobó que tanto los mecanismos

de necrosis como de apoptosis podían coexistir en un grupo de células sometidas a un daño lesivo y que la presencia de uno u otro podría depender de la intensidad del estímulo (Flórez, 1998). Más recientemente se ha visto que no sólo la intensidad de los estímulos lesivos determina el tipo de respuesta que conduce a muerte neuronal, sino que también son factores importantes la duración de este estímulo, si se presenta de forma aguda o crónica y del tipo o especificidad de neuronas que se ven afectadas (Von Bernhardi, 2004). A modo de ejemplo, se observa que en el caso de la EA, independiente del mecanismo propio por el cual se desarrolla la patología, ocurre un desequilibrio celular que favorece la activación de la llamada "cascada apoptótica", consistente en la generación de ciertos factores pro-apoptóticos que son los responsables de la principal vía de muerte característica de esta enfermedad y que comienza manifestándose de forma importante en las neuronas de tipo colinérgicas, particularmente las ubicadas en el núcleo basal de Meynert (Gandía y cols., 2006). En el caso de la EP ocurre algo muy similar, donde principalmente es la apoptosis la que contribuye a la destrucción neuronal, pero ahora manifestándose primordialmente en neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (Vila, 2010, Gandhi y cols., 2012).

La compleja etiología de los desórdenes neurodegenerativos sugiere que la causa de estas enfermedades son una combinación de eventos que perjudican el funcionamiento neuronal normal y que la comprensión del mecanismo fisiopatológico básico del deterioro cognitivo podría potencialmente proporcionar nuevos blancos terapéuticos tanto para el envejecimiento neuronal como para la neurodegeneración (Bossy-Wetzel y cols., 2004; Head y cols., 2010).

## **Factores que conducen a neurodegeneración**

Las posibles causas celulares y moleculares que subyacen al proceso de envejecimiento neuronal y enfermedades neurodegenerativas son diversas (Peinado y cols., 2000; Bossy-Wetzel y cols., 2004).

Dentro de estas causas encontramos; (1) La falta o escasez de factores de crecimiento (Ej., neurotrofinas), lo que en la mayoría de los casos conduce a apoptosis (Peinado y cols., 2000); (2) Excitotoxicidad, término acuñado por Olney en 1969 consistente en que los neurotransmisores excitatorios ( $NT_E$ ) actúan como neurotoxinas cuando se acumulan en el SNC, ya sea por una estimulación de la liberación de estos o por una inhibición de la recaptación de los mismos. El principal  $NT_E$  es el glutamato, el cual interactúa con dos tipos generales de receptores, los primeros corresponden a receptores ionotrópicos [N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato] que tienen la característica de presentar un canal catiónico acoplado a su estructura y los segundos corresponden a receptores metabotrópicos asociados a proteína G. La sobreactivación de estos receptores, principalmente NMDA, provoca la elevación de calcio ( $Ca^{2+}$ ) citosólico, lo que genera en última instancia muerte neuronal por apoptosis (Flórez, 1998; Peinado y cols., 2000; Tanovic y Alfaro, 2006); (3) Deficiencia en el suministro energético, el requerimiento energético de las neuronas está por encima de otras células del organismo, por lo tanto, condiciones de hipoxia y/o hipoglicemia conducen a alteraciones principalmente en las bombas dependientes de adenosín trifosfato (ATP) localizadas en la membrana plasmática, lo que trae consigo deficiencias en la homeostasis iónica y por tanto en el mantenimiento del potencial de membrana (Peinado y cols., 2000). Niveles de glucosa por debajo de 20 mg/dL inducen un estado de coma hipoglicémico caracterizado por un cese o aplanamiento de la actividad cerebral eléctrica (Haces del Blanco y Massieu,

2005); (4) Estrés oxidativo, existe evidencia de que la degeneración neuronal también ocurre como consecuencia del daño acumulativo producido por los radicales libres que se liberan como resultado del elevado metabolismo que tiene lugar en las neuronas (Pérez y Sierra, 2009). Especies reactivas del oxígeno (ROS) como son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo ( $\bullet OH$ ), el agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) y el óxido nítrico (NO), tienen un electrón desapareado que les hace ser altamente reactivas frente a otras moléculas vecinas, provocando un daño primario irreparable al oxidar directamente lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, y de manera secundaria pueden inhibir la recaptación de  $NT_E$  así como estimular su producción (Peinado y cols., 2000). El NO es un radical libre que se genera por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina; cuando NO se combina con  $O_2^-$  se forma peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), especie altamente reactiva asociada a daño mitocondrial (Peinado y cols., 2000; Von Bernhardt, 2005). Estas condiciones de estrés celular pueden superar los mecanismos compensatorios (defensas antioxidantes) y conducir a un incremento anormal del nivel de  $Ca^{2+}$  citoplasmático resultando en disfunción neuronal (Wojda y cols., 2008).

Todas estas causas mencionadas, lejos de ser independientes, están íntimamente relacionadas y poseen una instancia final común que es la alteración de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , afectándose las propiedades básicas, tales como la transmisión, plasticidad y supervivencia neuronal, proceso que se intensifica con el tiempo conduciendo eventualmente a la pérdida neuronal (Wojda y cols., 2008; Toescu y Vreugdenhil, 2010).

## **Homeostasis del calcio y enfermedades neurodegenerativas**

Para comprender la relación entre los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y la degeneración neuronal es esencial tener en consideración la homeostasis de este ión a nivel celular.

En todos los organismos eucariontes la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  determina el estado fisiológico de la célula. En el caso de la neurona, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula múltiples funciones, incluyendo la transmisión sináptica, la plasticidad neuronal y la supervivencia de la célula (Wojda y cols., 2008; Cerella y cols., 2010). La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal está muy bien controlada; la presencia de este ión en el interior de la célula se debe a la entrada desde el exterior y/o a la liberación desde organelos celulares, comportándose como un segundo mensajero. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular puede ocurrir a través de dos vías principales presentes en la membrana plasmática: (1) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a receptores, generalmente receptores ionotrópicos (ej. receptores NMDA activados por glutamato) y (2) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) (Wojda y cols., 2008). Cabe mencionar que los CCDV se encuentran principalmente en células excitables y son activados por despolarización de la membrana celular, constituyendo la principal vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Catterall, 2000). En la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde organelos intracelulares participan principalmente el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias (Wojda y cols., 2008; Gleichmann y Mattson, 2011). Los receptores metabotrópicos, localizados también en la membrana plasmática, se asocian a proteína G dando lugar a movilizaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a partir de la activación de receptores para segundos mensajeros como el inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). En el RE también ocurre movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante activación de receptores de rianodina inducidos por  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) es censada y transmitida por una variada gama de proteínas que ligan  $\text{Ca}^{2+}$ ; estas proteínas

descifran y diferencian entre las variadas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  de acuerdo a su localización, afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  y cinética de unión de este ión. Algunas de estas proteínas son la calmodulina, el sensor neuronal de  $\text{Ca}^{2+}$ , calbindina D28 y parvalbúmina. Estas señales descritas también pueden alcanzar el núcleo y afectar la transcripción de genes. Los mecanismos para restaurar los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  son variados, entre ellos se encuentran bombas  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de ATP localizadas en la membrana plasmática, transportadores presentes en el RE dependientes de ATP, denominados SERCA por su sigla en inglés (Sarco-Endoplasmatic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase), así como mecanismos mitocondriales de difusión facilitada (transportadores de tipo uniporter) que secuestran  $\text{Ca}^{2+}$  durante el periodo de recuperación (Wojda y cols., 2008; Zündorf y Reiser, 2011).

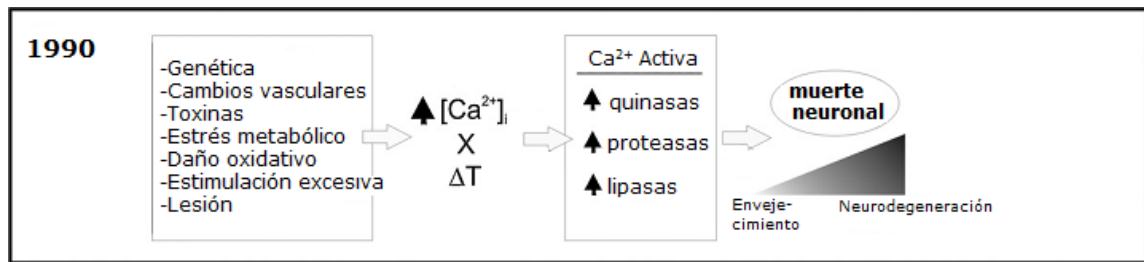
A la luz de lo mencionado y gracias a los mecanismos de restauración de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es posible mantener la homeostasis de este ión. Por el contrario, condiciones persistentes de estrés celular, como las señaladas anteriormente, pueden superar los mecanismos compensatorios y conducir a un incremento anormal del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  resultando en disfunción neuronal. Especialmente sensibles a estas condiciones son las bombas y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la membrana plasmática, afectándose también las bombas presentes en el RE. Además, este aumento excesivo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provoca una disfunción mitocondrial consistente en un desequilibrio del potencial de membrana mitocondrial principalmente a consecuencia de una alteración del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria o MPTP por su sigla en inglés (Mitochondrial Permeability Transition Pore) (Peinado y cols., 2000; Wojda y cols., 2008).

En base a estos antecedentes, la implicancia de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  surge como una de las hipótesis más integradoras que se han establecido para explicar lo que ocurre en el envejecimiento fisiológico neuronal y en patologías neurodegenerativas

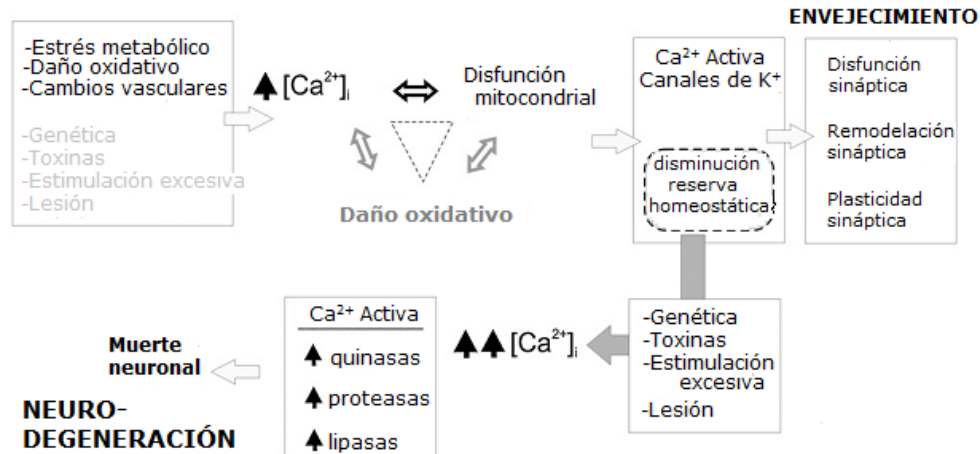
asociadas a la edad. Esta hipótesis data desde principios del año 1990 donde se creía que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , presente en el envejecimiento, generaba inicialmente una pérdida o muerte neuronal que se intensificaba con el tiempo, más recientemente la versión de esta hipótesis se centra en el hecho de que el envejecimiento cerebral no está asociado a una gran pérdida neuronal, sino que más bien a cambios a nivel sináptico, tanto morfológica como funcionalmente, debido a una desregulación de la triada  $Ca^{2+}$ -Función mitocondrial-Producción de radicales libres, lo que implica una disminución de la reserva homeostática haciendo a las neuronas más vulnerables frente al estrés adicional y por ende, a la intensificación del aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , lo que conlleva a la muerte neuronal y posterior neurodegeneración presente en las patologías antes mencionadas (**Figura 1**) (Wojda y cols., 2008; Toescu y Vreugdenhil, 2010; Kawamoto y cols., 2012).

### **Evidencia epidemiológica**

Hoy en día el deterioro cognitivo se está convirtiendo en uno de los mayores problemas de salud en la población de edad avanzada, siendo la edad por si sola un elemento que incrementa el riesgo de accidente cerebrovascular, EA y otras formas de demencia (Head y cols., 2010). Las enfermedades neurodegenerativas han experimentado un importante crecimiento, particularmente en los países de occidente (Valenzuela y cols., 2009), siendo la EA el desorden neurodegenerativo más común a nivel mundial (Bossy-Wetzel y cols., 2004). El riesgo de esta enfermedad aumenta 14 veces entre las edades de 65-85 años y afecta a alrededor del 47% de la población sobre 85 años (Head y cols., 2010).



### Presente



**Figura 1. Esquema que representa los cambios conceptuales que ha sufrido la "hipótesis del Ca<sup>2+</sup>" en relación al envejecimiento cerebral.** El panel superior señala que el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el envejecimiento conduce a una muerte neuronal que se intensifica con el tiempo. El panel inferior representa de forma esquemática la visión actual de esta hipótesis, donde el envejecimiento no está asociado a una pérdida neta de neuronas sino más bien a cambios a nivel sináptico ocurridos por una desregulación de la triada Ca<sup>2+</sup> – función mitocondrial – producción de radicales libres, lo que produciría la disminución de la reserva homeostática y la consecuente generación de un factor de riesgo importante para la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, adaptado de Toescu y Vreugdenhil, 2010.

Según el Reporte Mundial de Alzheimer 2010, Chile se encuentra, junto con Uruguay y Argentina, dentro de los países del continente americano que presentan en mayor porcentaje la EA, siendo afectada el 7% de la población mayor de 60 años, prevalencia similar a la hallada en Estados Unidos (6,9%) y superior a la encontrada en Brasil (5,5%). Chile, por otro lado, se encuentra en una etapa avanzada de transición hacia el envejecimiento demográfico de la población, debido a que los adultos mayores (≥ 60 años) paulatinamente han adquirido mayor importancia porcentual, en tanto que

los menores de 15 años han disminuido su aporte al total de la población, hecho que se debe al descenso en la tasa de natalidad, así como a la disminución de la mortalidad general, y, en especial, al sostenido descenso del riesgo de muerte en la niñez y juventud. Por lo tanto, este escenario ha incidido en la mayor sobrevivencia de toda la población y, en particular, de los adultos mayores (INE, 2009). Hasta el año 1970 los adultos mayores representaban un 8% del total de la población, cifra que aumentó a un 11,4% en el censo del 2002, siendo las proyecciones para el año 2025 mucho mayores, con una tasa de crecimiento exponencial inclinada a este grupo etario, representando el 20% del total de la población (INE, 2005).

### **Terapéutica neuroprotectora ¿Dónde nos encontramos?**

La evidencia indica que no existe ningún tratamiento eficaz actualmente disponible para prevenir la degeneración neuronal en cualquiera de las patologías mencionadas anteriormente (Wojda y cols., 2008). Es así que, evaluando el contexto epidemiológico en el que nos encontramos, se hace fundamental la implementación de nuevas estrategias terapéuticas que tengan la capacidad de retrasar o prevenir la degeneración neuronal que ocurre en el envejecimiento fisiológico así como el desarrollo de patologías asociadas a la vejez, complementando de esta manera al estudio de nuevos blancos terapéuticos.

### **Fitoquímicos bioactivos**

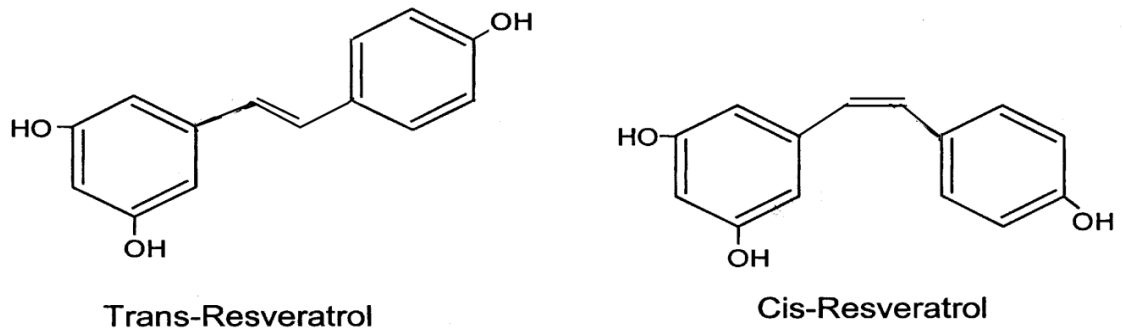
Estas últimas décadas han sido testigo del enorme interés que ha surgido en torno al consumo de fitoquímicos bioactivos provenientes principalmente de plantas. Estos compuestos han probado tener efectos beneficiosos para la salud humana, particularmente en personas mayores que luchan contra enfermedades crónicas. El estudio de los fitoquímicos parece ser una promesa de una mejor calidad de vida y

abre una amplia gama de posibilidades orientadas al desarrollo de alimentos funcionales, suplementos alimentarios y nutraceuticos (Briskin, 2000; Jeffery, 2005).

Es así que estrategias como el uso de antioxidantes han ido tomando fuerza en el tratamiento y de forma muy importante en la prevención de numerosas enfermedades crónico-degenerativas (Robles, 2007). Su uso se basa en la relación establecida entre el aumento del consumo de frutas y vegetales que contienen estos compuestos bioactivos, tales como vitamina C y E, carotenoides y polifenoles, con una menor incidencia de enfermedades degenerativas, logrando un efecto positivo en la salud pública (Zamora, 2007). Dentro de la familia de los polifenoles, se encuentra el resveratrol (RV), compuesto antioxidante que ha tenido una gran atención en los últimos años (Kamat y cols., 2008; Lekli y cols., 2009).

### **Resveratrol**

El RV (3,4',5-trihidroxiestilbeno) con fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$  es una fitoalexina derivada del estilbeno que está presente en las isoformas *cis* y *trans*, siendo el isómero *trans* el biológicamente activo (**Figura 2**) (Zhuang y cols., 2003; Lekli y cols., 2009). Este compuesto es biosintetizado por la enzima estilbeno sintasa, mediante una reacción de condensación de una molécula de p-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA (Lekli y cols., 2009). Se encuentra en más de 70 especies de plantas incluidas *Vitis vinifera* (uvas), *Vaccinium macrocarpon* (arándanos) y *Arachis hypogaea* (maní) (Ungvari y cols., 2011). La mayor concentración de RV está en la piel de las uvas (Pervaiz, 2003; Baur y Sinclair, 2006), siendo la principal fuente de consumo los vinos tintos (Zhuang y cols., 2003).



**Figura 2.** Isoformas estructurales de resveratrol, adaptado de Zhuang y cols., 2003.

El isómero *trans*-resveratrol (tRV) se encuentra disponible comercialmente y es relativamente estable si se mantiene protegido de la luz y de pH alcalinos (Pervaiz, 2001). En cuanto a la farmacocinética, tRV muestra buena absorción cuando se administra por vía oral, sin embargo, la biodisponibilidad de éste se ve afectada por el intenso metabolismo que se presenta a nivel intestinal y hepático, revelándose que la mayoría de los metabolitos encontrados son glucurónidos y sulfatos de RV (Zhuang y cols., 2003; Walle, 2011; Patel y cols., 2011). Cuando es administrado por vía oral se alcanza un pico de concentración a los 30 minutos, presentando un tiempo de vida media de aproximadamente 9 horas (Baur y Sinclair, 2006).

Una gran cantidad de estudios han demostrado que tRV presenta una variedad de propiedades biológicas, dentro de las cuales destacan: propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras, anticancerígenas, efectos antidiabéticos, entre otras (Baur y Sinclair, 2006; Ungvari y cols., 2011). Además, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer importantes efectos protectores a nivel de SNC. Sin embargo, los mecanismos por los cuales tRV ejerce sus efectos beneficiosos todavía no están del todo claros (Baur y Sinclair, 2006).

### **Efecto neuroprotector de resveratrol**

Existen diversas hipótesis que buscan explicar el efecto protector de tRV sobre las neuronas. Estudios en modelos de EP muestran la capacidad de tRV de reducir biomarcadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF), ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), factores de transcripción (NF- $\kappa$ B), prostaglandinas E2 (PGE2) y varias interleuquinas (Wendeburg y cols., 2009; Foti Cuzzola y cols., 2011), incrementar la actividad de Bcl-2 y reducir los niveles de PARP (Poly [ADP-ribose] Polymerase), reduciendo la muerte celular por apoptosis (Lee y cols., 2007). En modelos de EA, estudios muestran mecanismos de reducción de ROS y actividad de caspasa-3, reducción de factores pro-apoptóticos BAX/BCL-X (Foti Cuzzola y cols., 2011); otro estudio muestra, *in vivo* e *in vitro*, que tanto RV como los derivados de RV (derivados de estilbeno) son moléculas que podrían ser utilizadas en la prevención y en el tratamiento de procesos neurodegenerativos como la EA, actuando específicamente sobre la inhibición de la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide (Richard y cols., 2011). Por otro lado, estudios muestran que tRV actúa, ya sea directa o indirectamente, sobre la activación de SIRT1 proporcionando un efecto neuroprotector (Foti Cuzzola y cols., 2011; López-Miranda y cols., 2012). Se han descrito varias funciones importantes para SIRT1, principalmente en desarrollo neuronal y neuroprotección, altos niveles de esta sirtuina en el cerebro embrionario sugieren que podría tener un papel en las neuronas y el cerebro en desarrollo, además de promover la supervivencia y tolerancia al estrés oxidativo en el SNC y desacetilar y controlar diversos factores de transcripción, entre ellos algunos relacionados con la memoria y el aprendizaje. Uno de los mecanismos por el cual estaría actuando tRV sobre la activación de SIRT1 sería por un descenso en la acetilación del coactivador transcripcional PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator) (Ungvari y cols., 2011; López-Miranda y cols., 2012). En

resumen, tRV promueve la biogénesis mitocondrial, es decir, produce una disminución del estrés oxidativo, incrementa la actividad de SIRT1 y del factor de transcripción Nrf2 (coordina la expresión de antioxidantes en la célula), inhibe factores pro-apoptóticos, promueve la activación de factores antiapoptóticos, provocando eventualmente la disminución del desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (Ungvari y cols., 2011). En base a éstas y otras muchas evidencias es que tRV ha sido propuesto como un agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Sun y cols., 2010). Se ha establecido que los polifenoles, más específicamente curcumina, catequinas y tRV, son compuestos fitoquímicos con efectos pleiotrópicos de utilidad en enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Calamini y cols., 2010; Davinelli y cols., 2012).

Existen diversos estudios sobre la acción protectora de tRV a nivel cardiovascular, evidenciando su efecto sobre los CCDV, principal vía de ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, como uno de los mecanismos implicados. Sin embargo, aún no ha sido establecido claramente el efecto de tRV sobre los CCDV ni la participación de éstos en el mecanismo que media los efectos neuroprotectores de este compuesto

### **Canales de calcio dependientes de voltaje**

Los CCDV están presentes en variados tipos celulares, incluyendo células nerviosas, cardíacas, musculares, entre otras, constituyendo la principal vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula en respuesta a una despolarización de la membrana. El  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a la célula vía CCDV actúa como un segundo mensajero iniciando diversos eventos celulares. En cuanto a su estructura, estos canales están compuestos por un complejo de 5 subunidades conformado por un poro central de subunidades  $\alpha 1$ , un dímero glicoproteico de subunidades  $\alpha 2$  y  $\delta$ , una subunidad intracelular  $\beta$  y una glicoproteína

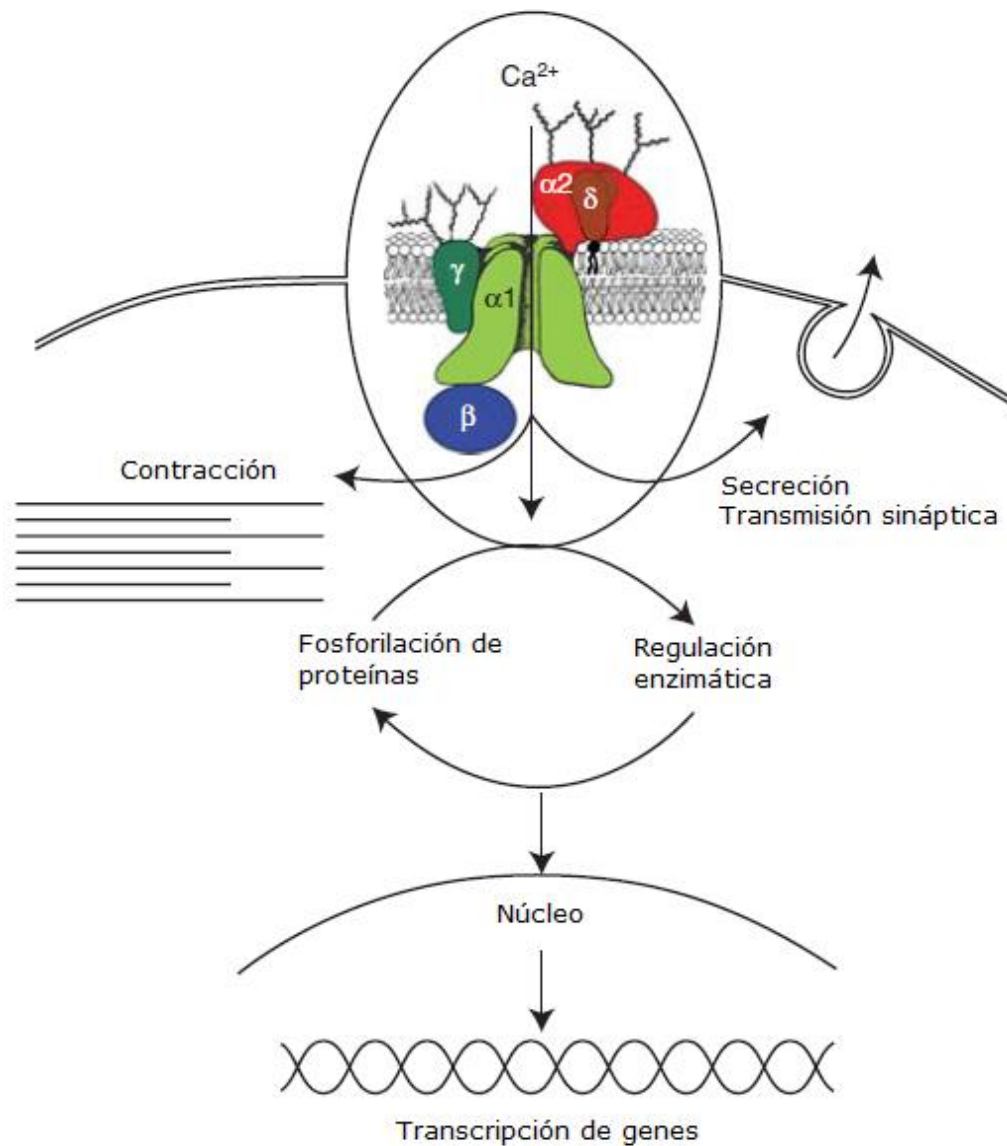
de transmembrana de subunidad y presente solo en algunos subtipos de canales (**Figura 3**) (Catterall, 2011).

Se han encontrado 10 diferentes tipos de CCDV en mamíferos, cada uno de ellos cumpliendo un rol diferente en la transducción de señales celulares. Éstos se dividen en 3 subfamilias como se señala a continuación:  $Ca_v1$ , inician la contracción, secreción, regulación de la expresión de genes, integración de la sinapsis de entrada en las neuronas y la transmisión sináptica en células sensoriales especializadas;  $Ca_v2$ , es principalmente responsable de la iniciación de la transmisión sináptica en sinapsis rápidas;  $Ca_v3$ , es importante en la activación de potenciales de acción repetitivos presentes en miocitos cardiacos y neuronas talámicas. Los CCDV también se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas (tipo de corriente de  $Ca^{2+}$ ) y farmacológicas como se señala en la **Tabla 1** (Catterall, 2011).

**Tabla 1. Clasificación electrofisiológica y farmacológica de canales de calcio dependientes de voltaje.**

<b>Tipo de corriente de <math>Ca^{2+}</math></b>	<b>Subtipo</b>	<b>Bloqueador específico</b>
L	Cav1.1	DHPs
	Cav1.2	DHPs
	Cav1.3	DHPs
	Cav1.4	DHPs
N	Cav2.1	$\omega$ -CTx-GVIA
P/Q	Cav2.2	$\omega$ -agatoxina
R	Cav2.3	SNX-482
T	Cav3.1	Ninguno
	Cav3.2	
	Cav3.3	

Abreviación: DHPs, dihidropiridinas;  $\omega$ -CTx-GVIA,  $\omega$ -conotoxina GVIA; SNX-482, versión sintética de una toxina peptídica proveniente de la tarántula *Hysteroocrates gigas*, adaptada de Catterall, 2011.



**Figura 3. Transducción de señal mediada por canales de calcio dependientes de voltaje.** Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la célula se inician numerosos eventos, incluyendo, contracción, secreción, transmisión sináptica, regulación enzimática, fosforilación/desfosforilación de proteínas y transcripción de genes. En el recuadro se señalan las subunidades estructurales de los CCDV, adaptada de Catterall, 2011.

### **Resveratrol y canales de calcio dependientes de voltaje**

Se ha observado que tRV inhibe la proteína tirosina-kinasa en miocitos de ventrículo de rata, bloqueando la activación de los CCDV tipo-L, así como su recuperación. Resulta interesante observar que tRV tiene acción inhibitoria sobre las corrientes de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ),  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{K}}$ ) y de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ), cuyo efecto podría explicar además, la acción antiarrítmica que presenta este compuesto (Chen y cols., 2007). Otros experimentos electrofisiológicos realizados en rebanadas de hipotálamo de rata, muestran que tRV inhibe la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo paraventricular ejerciendo una acción neuroprotectora frente al pre-tratamiento con L-glutamato, efecto que los autores atribuyen al bloqueo de CCDV tipo-L y a la subsecuente reducción del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang y cols., 2008). Existen otros dos estudios que relacionan a tRV con la inhibición de la síntesis y secreción de catecolaminas, en células cromafines bovinas (CCB) y de ratas, efecto inhibitorio de tRV, que según los autores, también ha sido atribuido, en parte, al bloqueo de CCDV en CCB (Shinohara y cols., 2007). Otro estudio evaluó los efectos de tRV sobre la neurosecreción en CCB, utilizando técnicas amperométricas observaron que este compuesto causa inhibición significativa de la liberación de catecolaminas. Mediante la técnica de *patch-clamp*, configuración de célula entera, observaron que tRV a diferentes concentraciones no afectó las  $I_{\text{Na}}$  y  $I_{\text{Ca}}$ . Los autores proponen que el mecanismo por el cual actuaría tRV sería independiente de las etapas de la exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , atribuyendo el efecto a mecanismos asociados a NO (Fernández y cols., 2010).

En contraposición, estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando la misma técnica (*patch-clamp*) y el mismo modelo celular (CCB), sugieren que tRV bloquea los CCDV, siendo más probables aquellos de tipo-L (Martínez, 2011).

Considerando que: (1) la desregulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  constituye un elemento central para explicar el envejecimiento neuronal y patologías neurodegenerativa, (2) existen escasos estudios en relación al efecto de tRV sobre la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel celular y (3) la existencia de resultados contradictorios del efecto de tRV sobre CCDV en CCB, resulta de especial interés profundizar en el estudio del efecto de este compuesto sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , así como esclarecer su acción sobre CCDV, principal vía de ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona.

Sobre la base de estos antecedentes, se estudiará la acción neuroprotectora de tRV sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometida a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante despolarización continua con  $\text{K}^+$  120 mM, evaluando el efecto de distintas concentraciones de este compuesto sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , así como la participación de los CCDV en dicho efecto.

## **HIPÓTESIS**

Debido a que tRV ha demostrado inhibir las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  por bloqueo de CCDV tipo-L, se espera que este compuesto estabilice los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediante la inhibición de estos canales en células de neuroblastoma humano SH-SH5Y sometidas a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por despolarización continua con  $\text{K}^+$  120 mM, ejerciendo de esta manera un efecto neuroprotector.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General.**

Determinar el efecto neuroprotector de tRV asociado a la estabilización de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y su acción sobre CCDV tipo-L en células de neuroblastoma SH-SY5Y sometidas a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por despolarización continua.

### **Objetivos Específicos.**

1. Caracterizar el efecto de la despolarización continua con  $\text{K}^+$  120 mM (24 horas) sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la viabilidad celular en células SH-SY5Y.
2. Evaluar el efecto de distintas condiciones de tratamiento con tRV (1 nM, 10 nM, 1  $\mu\text{M}$ , y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la viabilidad celular en células SH-SY5Y sometidas a  $\text{K}^+$  120 mM (24 horas).
3. Evaluar el efecto de tRV (1 nM, 10 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tras despolarización aguda con  $\text{K}^+$  70 mM en células SH-SY5Y.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

#### Reactivos

- HEPES ácido, de Fisher Scientific (New Jersey, U.S.A.).
- Ácido plurónico, Azul de tripán, Medio de Cultivo DMEM-alta glucosa, Penicilina-Estreptomicina, Suero Fetal Bovino (SFB), Tableta de PBS (Buffer Fosfato Salino) y Tripsina-EDTA, de GIBCO™ (Grand Island, N.Y., U.S.A.).
- NaOH, de LabGuard® (Edo. de Méx., México).
- CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, Dimetilsulfóxido (DMSO), D-Glucosa, KCl, MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O y NaCl, de MERCK (Darmstadt, Germany).
- Fluo-3 AM, de MOLECULAR PROBES® (Eugene, Oregon, U.S.A.).
- Polilisina y Resveratrol, de SIGMA® (St. Louis, MO, U.S.A.).
- Nifedipino, de RBI (Natick, MA, U.S.A.).

#### Soluciones

- Solución de PBS, en mM: NaCl 150; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 6,5 y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,4. pH=7,42.
- Solución de Locke Normal, en mM: NaCl 135; KCl 5,6; CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O 2,5; HEPES ácido 10; MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O 1,2; D-glucosa 5,5. pH=7,42.
- Solución de K<sup>+</sup> 70 mM, en mM: NaCl 70,6; KCl 70; CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O 2,5; HEPES ácido 10; MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O 1,2; D-glucosa 5,5. pH=7,42.

- Solución de  $K^+$  120 mM, en mM: NaCl 20,6; KCl 120;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  2,5; HEPES ácido 10;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1,2; D-glucosa 5,5. pH=7,42.
- Medio de Cultivo DMEM-alta glucosa (4,5 g/L), suplementado con 3,7 g/L de  $NaHCO_3$ , 10% SFB y 1% de antibióticos (mezcla penicilina-estreptomicina). pH= 7,42.
- Medio de congelamiento, Medio de cultivo DMEM-alta glucosa suplementado con 5% (v/v) DMSO.
- Fluo-3 AM, 50  $\mu g$  disueltos en ácido plurónico 0,094% y diluido con solución de Locke normal. Concentración final 7  $\mu M$ .

#### Línea celular

En el presente trabajo se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la cual fue gentilmente donada por el Dr. Marcelo Kogan del Departamento de Nanobiotecnología de la Universidad de Chile.

#### Herramienta farmacológica y compuesto en estudio

- Nifedipino (Nife), antagonista selectivo de CCDV tipo-L (Flórez, 1998; Catterall, 2011).

Para su utilización, nifedipino fue disuelto en DMSO a una concentración final de 10 mM (solución madre), se mantuvo protegido de la luz, alicuotado y almacenado a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . A partir de esta solución se realizó una dilución 1:1000 para obtener la concentración final requerida (10  $\mu M$ ).

- *Trans-resveratrol*

El compuesto en estudio fue disuelto en etanol (EtOH) a una concentración final de 10 mM (solución madre), se mantuvo protegido de la luz, alicuotado y almacenado a -20 °C. A partir de esta solución se realizaron las diluciones correspondientes de tRV (1 nM, 10 nM, 1 µM y 100 µM) en medio de cultivo o solución de K<sup>+</sup> 120 mM, de acuerdo al diseño experimental desarrollado (ver más adelante).

### Equipos

- Agitador tipo vórtex, Genie™ K-550-GE Bender & Hobein.
- Autoclave, Melag.
- Balanza analítica, Sartorius.
- Baño termorregulado, Cientec.
- Cámara CCD, Leica DFC 360FX.
- Cámara de flujo laminar, BDK.
- Centrifuga, Minifuge 2.
- Controlador de electroválvulas, Max Planck Institute, Dortmund, Alemania.
- Conversor análogo-digital.
- Estufa, Heraeus.
- Incubador CO<sub>2</sub>, ThermoForma 311.
- Microscopio invertido, Arquimed.

- Microscopio de epifluorescencia, Nikon Eclipse E600FN.
- pH-metro, CG805 Schott Gerate.
- Placa de agitación magnética, Heidolph MR2002.

## **MÉTODOS**

### **Mantenimiento de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

#### **Descongelamiento**

El descongelamiento de células debe ser un proceso rápido, por lo que, fue necesario tener todo el material preparado antes del procedimiento. En primer lugar se tuvo la cámara de flujo laminar encendida por un mínimo de 15 minutos (min), los medios y soluciones que entrarían en contacto con las células debieron estar temperados a 37°C.

Los tubos criogénicos utilizados en este estudio se encontraban almacenados a -80°C, con fecha de congelamiento de enero del 2012 y pasaje 15. Para lograr un descongelamiento rápido los viales fueron inmediatamente sumergidos en agua tibia (50°C) tras salir del congelador. Una vez descongelados, se transfirió el contenido a un frasco de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> (T162) conteniendo medio de cultivo fresco suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos. El frasco fue incubado en atmósfera controlada con 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C y humedad. Al día siguiente de la siembra se renovó el medio de cultivo para eliminar el DMSO contenido en el medio de congelamiento. Una vez alcanzado el 80% de confluencia se procedió a realizar el traspaso de células.

### **Cambio de medio, traspaso y siembra**

Generalmente el recambio por medio fresco se realizó día por medio, al observarse un viraje de color (de rojo a anaranjado) indicativo del consumo de nutrientes y acúmulo de productos de desechos debido al metabolismo celular. Las células SH-SY5Y crecen en su mayoría adheridas a la superficie y un porcentaje menor en suspensión (flotantes), por lo tanto, para el cambio de medio, se transfirió la cantidad de medio contenida en el frasco de cultivo a un tubo estéril y se adicionó inmediatamente medio nuevo (para cubrir las células adherentes), este tubo se llevó a centrifugación por 10 min a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido correspondiente a células flotantes para adicionarlo nuevamente al frasco de cultivo.

Para el mantenimiento de la línea celular se debe realizar un traspaso de un porcentaje de éstas a otro frasco de cultivo, tras haber alcanzado el 80% de confluencia celular. Una vez alcanzado este nivel de proliferación, se retiró el medio con las células flotantes y se conservó en un tubo estéril, se adicionó 1-2 mL de tripsina 0,25%-EDTA 0,53 mM al frasco de cultivo para soltar las células adherentes y se llevó a 37°C durante 3 min. Para que este proceso de tripsinización sea efectivo se debe eliminar el suero del medio que actúa como un inhibidor de la tripsina, por lo tanto, previo a la adición de este agente se lavó una vez el frasco con PBS. Pasados los 3 min se verificó bajo microscopio el efecto de la enzima y se procedió a golpear el frasco con la mano para ayudar a soltar las células que todavía se encontraban adheridas. Inmediatamente se agregó medio de cultivo fresco para inhibir la acción de la tripsina. El contenido del frasco fue traspasado a un tubo de 15 mL el cual fue centrifugado a 1500 rpm por 10 min. El pellet fue resuspendido en medio fresco y se realizó el recuento celular. De acuerdo a este se tomó la cantidad apropiada de células para

sembrar en un nuevo frasco de cultivo consiguiendo mantener la línea celular y generándose un nuevo pase.

Los frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25) fueron sembrados a una densidad de 100.000 células. Tanto para los experimentos de viabilidad celular (VC) como para la medición de Ca<sup>2+</sup> citosólico las células fueron sembradas a una densidad de 5x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> (Hanada y cols., 1993), en placas de cultivo plásticas de 35 mm (Nunc) y en cubreobjetos de 6 mm previamente tratados con polilisina para facilitar la adhesión celular, respectivamente.

### **Recuento celular**

El número total de células se determinó mediante un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Esta es una placa de cristal que posee generalmente dos cámaras de conteo (una superior y otra inferior respecto al eje longitudinal del hemocitómetro), éstas en su centro tienen dibujada, en depresión, una cuadrícula de 9 cuadrados de 1 mm, cada uno subdividido en otros más pequeños. Sobre el hemocitómetro, en la parte central, se coloca un cubreobjetos para delimitar el espacio (0,1 mm de profundidad). El líquido se transfiere mediante micropipeta y entrará a la cámara por capilaridad. Para el recuento se consideraron 4 esquinas de la cámara.

En un eppendorf se realizó una dilución de 100 µL de células en suspensión en 100 µL de azul de tripán (factor de dilución = 2) para el posterior rellenado de ambas cámaras del hemocitómetro y conteo mediante observación en microscopio.

Considerar que cada esquina del hemocitómetro representa un volumen total de 0,1 mm<sup>3</sup> (0,0001 mL), por lo tanto:

$$\text{Células/mL} = \text{promedio del recuento por esquina (4)} \times 2 \text{ (factor de dilución)} \times 10^4$$

$$\text{Total de células} = \text{células/mL} \times \text{volumen total de medio}$$

### Congelamiento

El medio de congelamiento utilizado fue medio de cultivo completo suplementado con 5% (v/v) de DMSO, como agente criopreservante. El DMSO es considerado uno de los agentes crioprotectores penetrantes (ACP) menos tóxicos; toxicidad que en la mayoría de los casos depende de la concentración utilizada, de la temperatura a la cual está expuesta la muestra a criopreservar y el período de exposición (Joo y Dupré, 2002; Szurek y Eroglu, 2011). Es por esto que las etapas iniciales de congelamiento de las células así como el descongelamiento de las mismas deben ser realizadas de forma eficiente y rápida, permaneciendo éstas el menor tiempo posible en contacto con DMSO (a temperatura ambiente). Generalmente, la densidad de células a congelar es 10<sup>6</sup>/mL, cifra que está bastante estandarizada. Luego de preparar esta suspensión las células fueron congeladas a -20°C por 24 horas (hrs) y luego se llevaron a -80°C de forma indefinida. Cabe señalar que la conservación final más adecuada es nitrógeno líquido (-196°C) (Ávila-Portillo, 2006), sin embargo, también pueden ser conservadas a -80°C durante al menos 1 año (comunicación oral Dra. Ana Riveros, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile).

### **Registro fotomicrográfico**

Para el registro fotomicrográfico de la línea celular se utilizó una cámara CCD acoplada al microscopio de epifluorescencia. Las fotomicrografías fueron captadas con objetivos de 10X y 40X, utilizándose para la adquisición de éstas el software Leica Application Suite (Leica Microsystems, Switzerland).

### **Determinación de viabilidad celular**

#### **Diseño experimental**

##### Tratamiento crónico con tRV

Las células previamente sembradas en placas de cultivo recibieron el tratamiento que se indica en la tabla 2, realizándose el experimento inmediatamente terminado el segundo día. Este diseño se repitió para cada una de las concentraciones de tRV a evaluar (1nM, 10 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M).

Para determinar el porcentaje equivalente a células viables se utilizó el método de exclusión con azul de tripán. Este colorante es uno de los más ampliamente recomendados, cuyo principio se basa en que las células vivas (viables) poseen membranas celulares intactas que impiden la entrada del colorante y por ende son excluidas de la tinción, no así las células muertas (no viables) que son teñidas debido al paso de este colorante al citoplasma mostrando un distintivo color azul bajo el microscopio (Sigma, product information; Strober, 2001).

El procedimiento para llevar a cabo la determinación consistió en tomar una cantidad (gotas) de medio de cultivo con células en suspensión y vaciar a un eppendorf, para luego tomar 100  $\mu$ L de éste y adicionarlos a 100  $\mu$ L de azul de tripán, se resuspendió la mezcla, se dejó reposar alrededor de 2 min y se añadió una cantidad a cada lado del

hemocitómetro y se llevó a un microscopio para el recuento e identificación de células, tanto viables como no viables. Debido a que estas células posteriormente se descartan no es necesario mantener un ambiente estéril.

Para el cálculo de la VC (%) se utilizó la siguiente fórmula:

$$VC (\%) = \left( \frac{\text{total de células viables (no teñidas)}}{\text{total de células (teñidas y no teñidas)}} \right) \times 100$$

**Tabla 2. Tratamiento crónico de células SH-SY5Y con tRV**

GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMIENTO	
	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (24 hrs)
Control 1 (c1)	MC	MC
Control 2 (c2)	MC	K <sup>+</sup> 120 mM
Control Locke-2 día (cL2)	MC	Locke normal
Control positivo (cNife)	MC	*Nife + K <sup>+</sup> 120 mM
Pre-tratamiento (PreT)	tRV	K <sup>+</sup> 120 mM
Tratamiento continuo (TcT)	tRV	tRV + K <sup>+</sup> 120 mM
Tratamiento conjunto (TcJ)	MC	*tRV + K <sup>+</sup> 120 mM
Control 3 (c3)	K <sup>+</sup> 120 mM	MC
Control Locke-1 día (cL1)	Locke normal	MC
Post-tratamiento (PostT)	K <sup>+</sup> 120 mM	tRV

\*Incubación previa de células por 30 minutos con Nife y tRV respectivamente.

MC: medio de cultivo

### **Mediciones de calcio citosólico**

Para determinar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se utilizó el indicador fluorescente Fluo-3 AM (Minta y cols, 1989; Kao, 1994) el cual tiene una longitud de onda de excitación/emisión de 506/526 nm. Las células sembradas en cubreobjetos de 6 mm tras 3 días de cultivo fueron lavadas con solución de Locke normal 2 o 3 veces y cargadas con Fluo-3 AM durante 30 min a 37°C, período en el cual este indicador, permeable a la membrana plasmática, es hidrolizado intracelularmente obteniéndose moléculas quelantes específicas para  $\text{Ca}^{2+}$  (Minta y cols, 1989). Pasado este tiempo, las células fueron nuevamente lavadas con solución de Locke normal y colocadas dentro de una microcámara metálica de perfusión que se ajusta a la base de un microscopio de epifluorescencia. El estímulo fue aplicado mediante un sistema de válvulas con solenoide miniatura excluyente, operado manualmente y acopladas a una pipeta de perfusión de múltiples vías con una punta de salida común, la cual se posicionó a menos de 100  $\mu\text{m}$  del grupo celular previamente fijado en el plano visible del microscopio. La velocidad de este sistema de perfusión es consecuencia de la presión por gravedad ejercida sobre el líquido así como de las características de la pipeta empleada, alcanzando un reemplazo completo en el entorno de la célula en menos de un segundo (s). La medición de la variación del nivel basal de  $\text{Ca}^{2+}$ , correspondiente a la señal emitida por este grupo celular, fue captada mediante un objetivo de inmersión para fluorescencia (Objetivo Nikon 40X; 0,80 w Fluo). En cuanto a la excitación de Fluo-3 AM, se utilizó una luz de mercurio de 100 W filtrada a una longitud de onda de 530 nm y captada por un fotomultiplicador (Hamamatsu, Japón), que mediante una tarjeta análogo-digital (A/D) incorporada a un computador entrega como resultado cambios de voltaje que son proporcionales a la fluorescencia emitida. Los datos obtenidos fueron almacenados en el disco duro mediante el programa Axotape (Axon

Instruments) y analizados posteriormente mediante el programa OriginPro 6.1 (OriginLab Corporation).

Los resultados se expresan como amplitud de la respuesta, ocupando para ello la siguiente ecuación (Takahashi y cols., 1999):

$$\Delta F/F = (F-F_b)/F_b$$

Donde:

$F$  = Intensidad de la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$

$F_b$  = Intensidad de la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  antes del estímulo

#### Tratamiento agudo con tRV

La aplicación aguda de tRV se realizó mediante este sistema de electroválvulas señalado. Como estímulo control, previo al pulso de tRV, se evaluó el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en respuesta a un pulso despolarizante con solución de  $\text{K}^+$  70 mM.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como el promedio (M)  $\pm$  Error Estándar (SE), con "n" indicando el número de placas o cubreobjetos sembrados con células, de al menos 3 pases diferentes, registrados bajo las mismas condiciones. El análisis entre dos grupos (experimentos no pareados) fue realizado mediante la prueba  $t$  de Student's considerando como criterio indicador de diferencia estadística significativa un valor de  $p$  menor al 95% ( $p < 0,05$ ). Para la comparación de más de dos grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y las medias se compararon por prueba Tukey usando el programa Origin 7.0 (OriginLab Corporation).

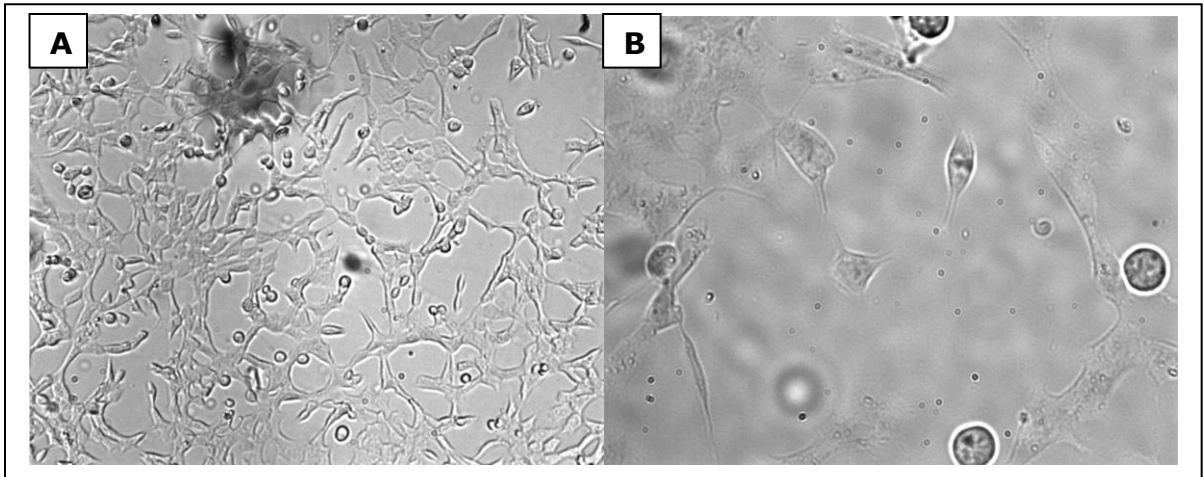
## RESULTADOS

### 1. Tasa de crecimiento celular y registro fotomicrográfico.

A lo largo del trabajo experimental, la línea celular de neuroblastoma fue mantenida en frascos de cultivo para su crecimiento continuo, y se trabajó con pasajes del 15 al 20.

Se calculó la tasa de crecimiento celular para poder determinar la densidad de células a sembrar en frascos de cultivo, con el objetivo de llegar a un 80% de confluencia en 7 días de cultivo, idealmente. Tras reiterados ensayos se logró determinar que después de una siembra de 100.000 células/T25, se lograba un recuento celular promedio de 12.500.000 células en 5 días de cultivo, equivalente a un 80% de confluencia.

De forma paralela, se realizó un registro fotomicrográfico de células SH-SY5Y mantenidas en medio de cultivo completo, para lo cual éstas fueron sembradas en cubreobjetos de 6 mm y tras 24 hrs de incubación, se procedió a captar la fotomicrografía, con objetivos de 10X y 40X, mediante una cámara CCD acoplada al microscopio de epifluorescencia. Como se observa en la **Figura 4**, las células exhiben la morfología normal típica descrita para células SH-SY5Y no diferenciadas, presentando cuerpo celular alargado y redes neuríticas discretas.



**Fig. 4. Registro fotomicrográfico de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en cultivo.** Las células (pasaje 16, 24 hrs de cultivo) fueron mantenidas en medio DMEM-alta glucosa, suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  (3,7 g/L), SFB (10%) y antibióticos (1% penicilina/estreptomicina) e incubadas a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  y humedad. **A)** 10X; **B)** 40X.

## **2. Efecto de la despolarización continua con $\text{K}^+$ 120 mM (24 hrs) sobre la viabilidad celular en células SH-SY5Y.**

Para caracterizar el efecto de la estimulación continua con  $\text{K}^+$  120 mM sobre la VC, las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de cultivo plásticas. Un grupo celular fue incubado con  $\text{K}^+$  120 mM el primer día de tratamiento (cK1) y otro grupo el segundo día de tratamiento (cK2). Para la determinación del porcentaje de VC se utilizó el método de exclusión con azul de tripán y para el recuento de éstas un hemocitómetro. El efecto de  $\text{K}^+$  120 mM fue estudiado en un mínimo de tres grupos celulares de a lo menos tres pasajes diferentes.

La incubación con  $\text{K}^+$  120 mM (24 hrs) indujo, tanto en cK1 como en cK2, una disminución significativa de la VC respecto a sus controles cL1 y cL2, respectivamente. Esta disminución fue mayor para el grupo celular tratado el primer día, obteniéndose en este caso una reducción de VC de un  $80,9 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,001$ ); para el grupo tratado el segundo día la VC se redujo en un  $56 \pm 4,6\%$  ( $p < 0,001$ ) ( $n=7$ ) (**Figura 5A y 5B**).

Para evidenciar la participación de los CCDV tipo-L en la muerte inducida por  $K^+$  120 mM (24 hrs), se utilizó nifedipino (antagonista selectivo de canales de  $Ca^{2+}$  tipo-L) aplicado a un tercer grupo celular, correspondiente al control positivo (cNife).

Las células recibieron el tratamiento cK2 en presencia de nifedipino (10  $\mu$ M), durante 24 hrs. Dicha incubación con nifedipino indujo un incremento significativo de la VC ( $103,3 \pm 11,7\%$ ,  $p < 0,001$ ) respecto a lo observado en la incubación solo con  $K^+$  120 mM ( $n=7$ ) (**Figura 5C**).

### **3. Efecto de distintas condiciones de tratamiento con tRV sobre la viabilidad de células SH-SY5Y sometidas a muerte celular por $K^+$ 120 mM (24 hrs).**

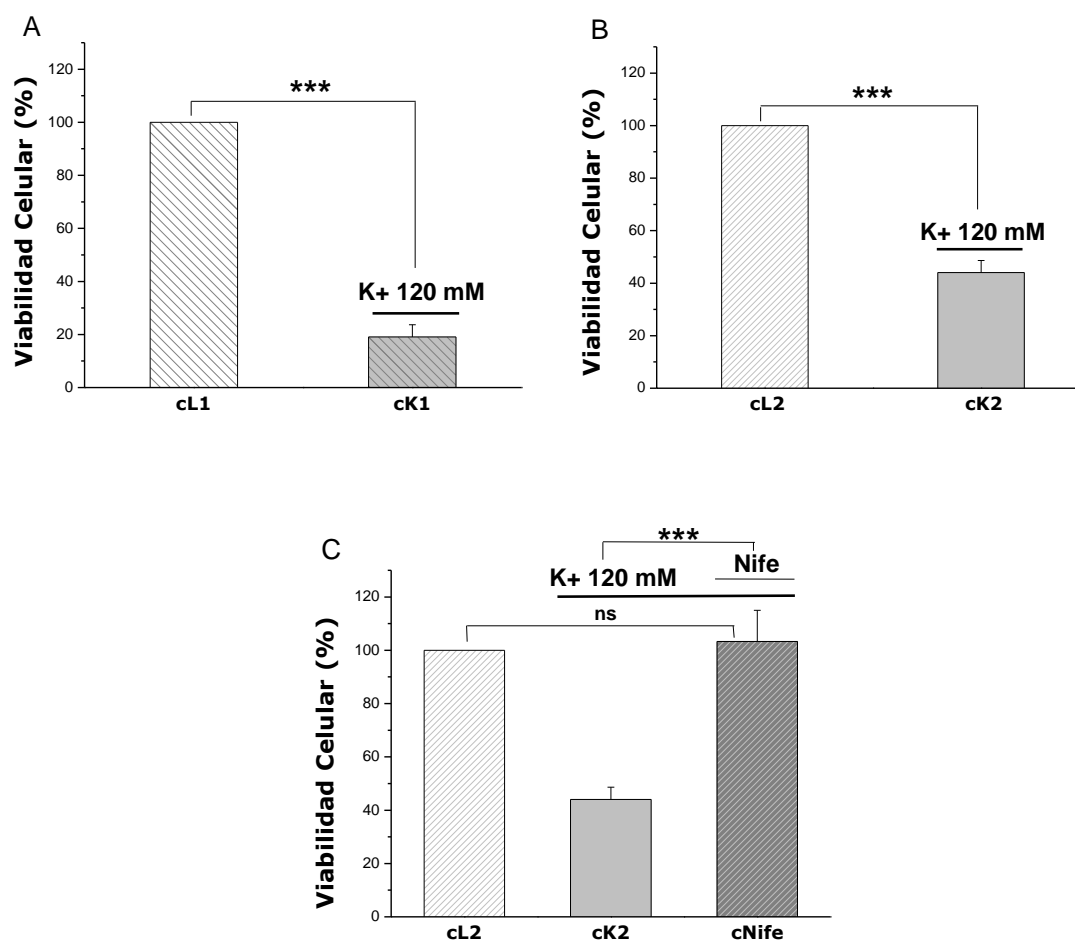
Para evaluar el efecto de tRV sobre la VC en células SH-SY5Y, se trabajó según lo descrito previamente en metodología. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de cultivo plásticas de 35 mm, para posteriormente ensayar, en experimentos individuales, los diferentes tratamientos con tRV (PreT, TcT, TcJ y PostT). Completado el segundo día de tratamiento, se procedió a determinar el porcentaje de VC utilizando el método de exclusión con azul de tripán y conteo de células mediante un hemocitómetro. Se estudiaron en total 4 concentraciones diferentes de tRV (1 nM, 10 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), en un mínimo de tres grupos celulares de pasajes 16, 17 y 18. Los resultados obtenidos se resumen en la **Figura 6**.

Como se puede observar en la Figura 6, tRV (10 nM) fue capaz de aumentar la VC de forma significativa en comparación al control de muerte (cK2), tanto en el TcT ( $79,3 \pm 4,3\%$ ;  $p < 0,001$ ) (**Fig. 6B**) como en el TcJ ( $104,3 \pm 4,3\%$ ;  $p < 0,001$ ) (**Fig. 6C**). Por otra parte, la VC obtenida en el TcJ (10 nM) fue similar a la inducida por nifedipino (10  $\mu$ M), no observándose diferencias significativas (n.s.) (**Fig. 6C**). Cabe señalar que para este tratamiento (TcJ) se realizó una incubación previa de 30 min con tRV en

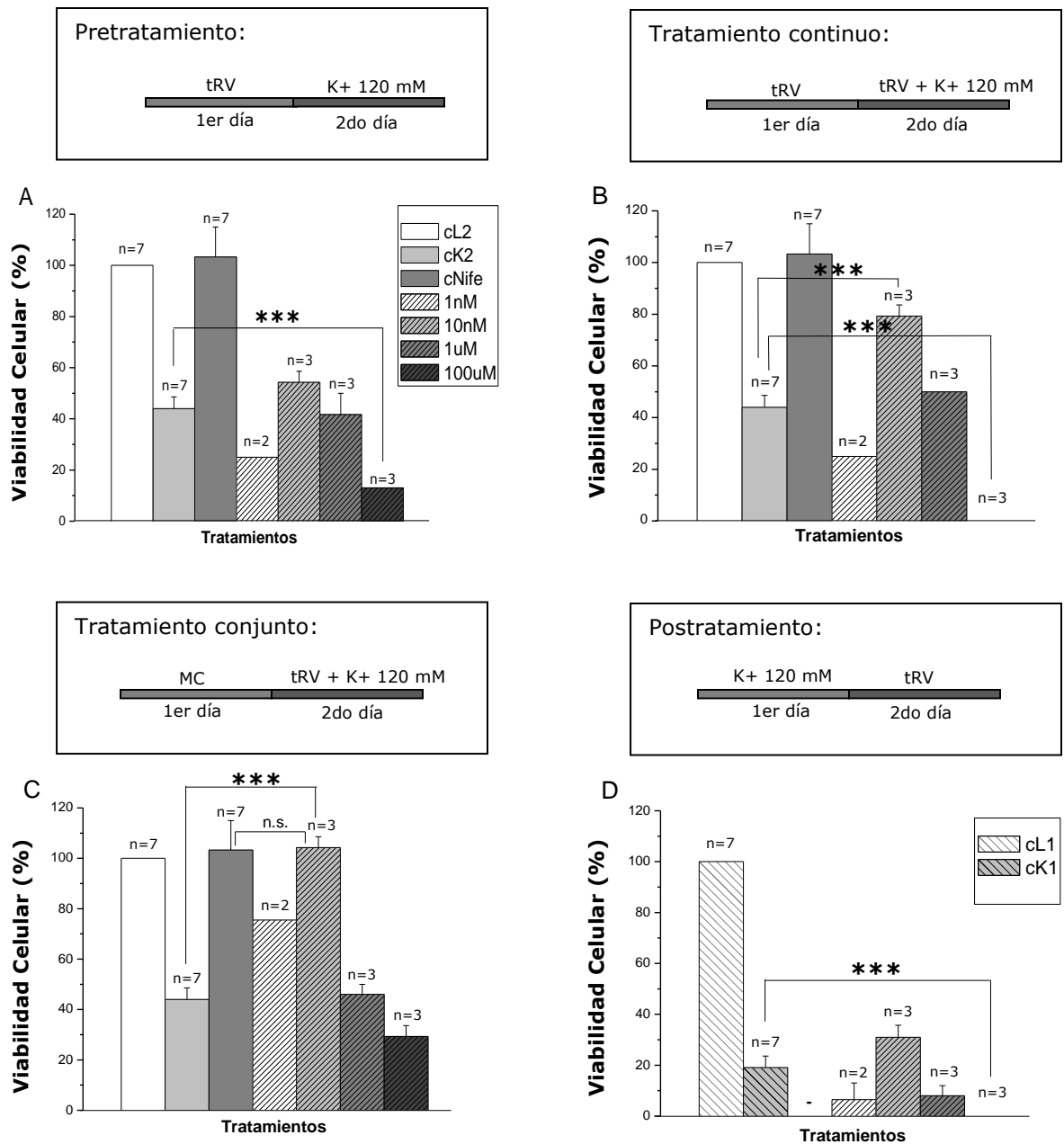
medio de cultivo completo, procedimiento que también fue realizado durante el tratamiento de las células con nifedipino (cNife). La incubación con tRV a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  no mostró diferencias significativas con respecto al control de muerte en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, la muerte celular aumentó de manera significativa al incubar las células con tRV (100  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{K}^+$  120 mM, en condiciones de PreT, TcT y PostT ( $p < 0,001$ ), obteniéndose una VC nula para la mayoría de los tratamientos (**Fig. 6A, 6B y 6D**).

Los experimentos a la menor concentración de tRV ensayada (1 nM) fueron realizados en virtud de los primeros resultados que mostraron un efecto máximo de tRV (10 nM) sobre la VC en condiciones de TcT y TcJ, razón por la cual presentan un número menor de experimentos ( $n=2$ ) (**Fig. 6 paneles A, B, C y D**). Para ello, se ensayaron los mismos tratamientos señalados inicialmente pero a una concentración de tRV de 1 nM. En TcJ se observó una tendencia de tRV (1 nM) a aumentar la VC con respecto a cK2 (VC=75,5%), pero dado el bajo número de experimentos realizados se deben seguir haciendo más estudios. Cabe señalar que el valor de VC obtenido por tRV (1 nM) es de menor magnitud que lo obtenido por tRV (10 nM).

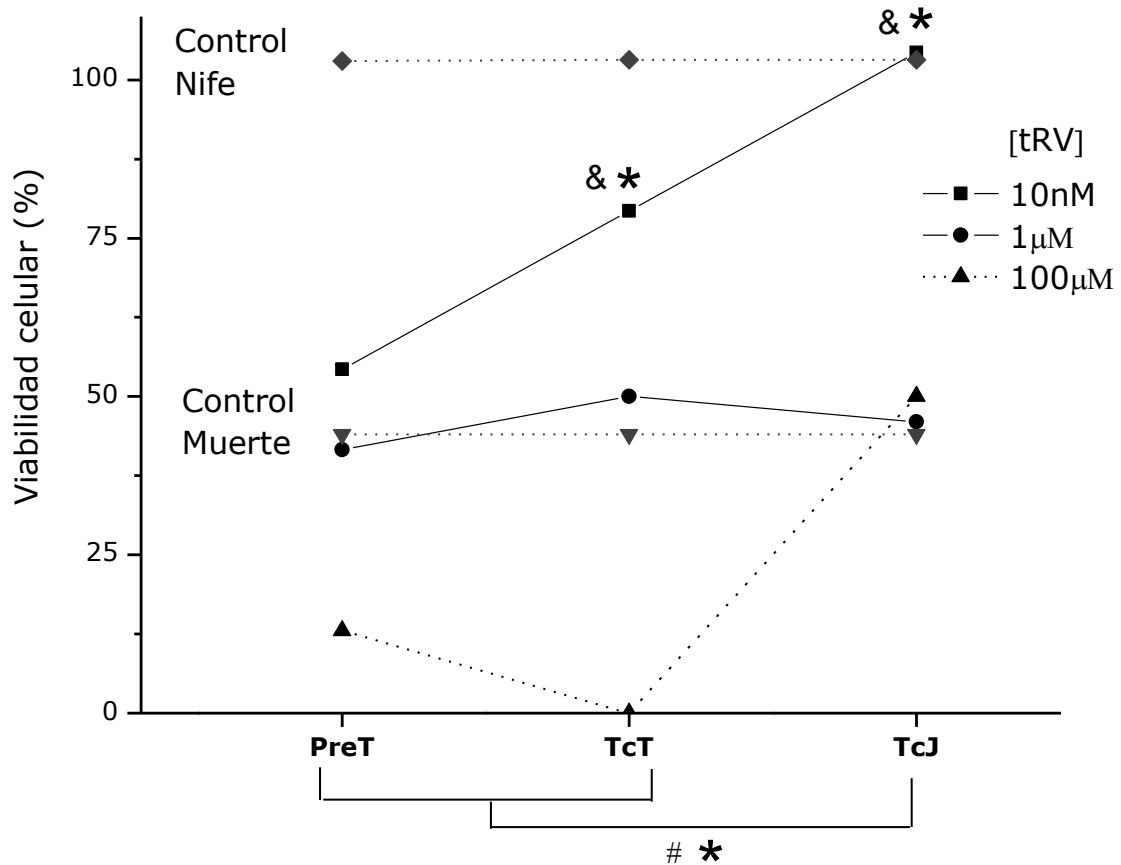
La comparación entre grupos (PreT, TcT, TcJ) a las concentraciones de 10 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  no presentó diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba de Tukey). Considerando que a 100  $\mu\text{M}$  de tRV se observó valores mayores de muerte celular respecto del control, se realizó una nueva comparación entre grupos a las concentraciones de 10 nM y 1  $\mu\text{M}$  para evaluar el efecto del tipo de tratamiento con tRV sobre la VC. Resultados señalan que el TcJ presenta diferencias significativas respecto de los demás tratamientos a iguales concentraciones y respecto del control ( $p < 0,05$ ; ANOVA de una vía, prueba de Tukey) (**Fig. 7**).



**Fig. 5. Efecto de la incubación con  $K^+$  120 mM/24 hrs sobre la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** 5A y 5B: muestran el efecto de  $K^+$  120 mM (24 hrs) sobre la VC en células SH-SY5Y, se observa una VC menor para cK1 (5A) en comparación a cK2 (5B). 5C: muestra el efecto de  $K^+$  120 mM (24 hrs) incubado en presencia de nifedipino, observándose un aumento de VC.  $n=7$ , células SH-SY5Y de pasajes 15 al 20. Los valores corresponden al  $M \pm SE$ . ns: diferencia no significativa; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Fig. 6. Efecto de tRV sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y bajo diferentes condiciones de tratamiento.** 6A, 6B, 6C y 6D: muestran el efecto de tRV (1 nM, 10 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) sobre la VC en células SH-SY5Y de pasaje 16 al 18, incubadas de acuerdo al tratamiento que se indica en el recuadro inserto sobre cada gráfico. La nomenclatura de las barras se señala en el recuadro inserto en el panel A, siendo igual para todos los tratamientos, excepto panel D que posee sus propios controles. Los valores corresponden al  $M \pm SE$ . MC: medio de cultivo; n.s.: diferencia no significativa; \*\*\* $p < 0,001$  (*t* de Student's, datos no pareados).



**Fig. 7. Comparación de los distintos tratamientos con tRV sobre la viabilidad de células SH-SY5Y sometidas a muerte por  $K^+$  120 mM.** La gráfica resume el efecto del pretratamiento (PreT), tratamiento continuo (TcT) y tratamiento conjunto (TcJ) con tRV. Las líneas relacionan el efecto a una misma concentración entre tratamientos. Como referencia se incluye el nivel de viabilidad celular del control de muerte inducida por  $K^+$  120 mM ( $\blacktriangledown$ ) y control positivo con nifedipino ( $\blacklozenge$ ). Los tratamientos fueron comparados a las concentraciones de 10 nM y 1  $\mu$ M. \*: Diferencia significativa respecto del control de muerte, &: diferencia significativa respecto de las demás concentraciones, #: diferencia significativa respecto de los demás grupos. ( $p < 0.05$ ; ANOVA de una vía, prueba de Tukey).

#### 4. Efecto de la aplicación aguda de $K^+$ 70 mM sobre el nivel de $Ca^{2+}$ citosólico.

Para caracterizar el efecto de  $K^+$  70 mM sobre la señal citosólica de  $Ca^{2+}$  las células SH-SY5Y fueron sembradas en cubreobjetos de 6 mm y mantenidas en condiciones de cultivo. Al tercer día, las células fueron lavadas con solución de Locke normal y

cargadas con la sonda fluorescente Fluo-3 AM por 30 min a 37°C, tras lo cual se realizó un nuevo lavado de las células con Locke. Una vez posicionado el cubreobjetos en la microcámara de registro, las células, en condiciones de 50%-70% de confluencia, fueron continuamente perfundidas con solución de Locke normal para estabilizar la señal basal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. La estimulación aguda con  $\text{K}^+$  70 mM se realizó durante 40 s. Tras el estímulo las células fueron nuevamente perfundidas con solución de Locke.

Se realizaron un total de 38 experimentos con células de pasaje 16 al 20, en 3 de éstos,  $\text{K}^+$  70 mM indujo un incremento de la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , correspondiente a células en pasaje 17 (**Figura 8A y 8B**). El peak de la respuesta observada se produjo a los 20 s de aplicado el estímulo agudo, para luego descender a valores basales tras el cese de éste y posterior lavado. La amplitud máxima de la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzada fue 3 veces mayor en un grupo de células respecto al otro. Además, la respuesta de mayor amplitud fue, en comparación a la otra, una respuesta más rápida. En el resto de los experimentos (n=35) no se observó respuesta (**Figura 8C**).

Adicionalmente, se determinó el efecto agudo de  $\text{K}^+$  120 mM sobre la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  siguiendo el mismo protocolo utilizado con  $\text{K}^+$  70 mM, es decir, las células fueron perfundidas con solución de Locke normal para estabilizar la señal basal y posteriormente estimuladas de forma aguda por 40 s con  $\text{K}^+$  120 mM, para luego ser lavadas con solución de Locke normal. Posterior al estímulo, no se observó un incremento de la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (datos no mostrados).

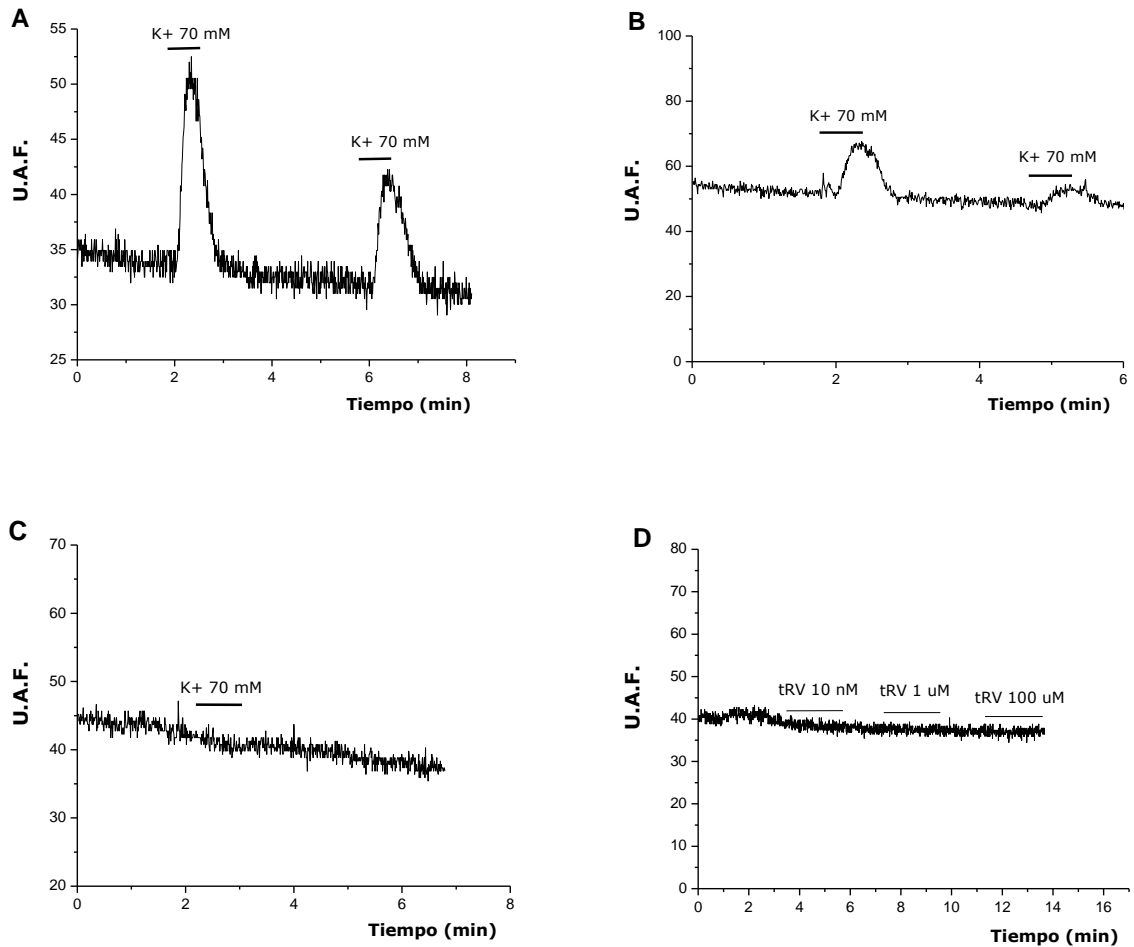
Dada la ausencia de respuesta frente a estimulación aguda con  $\text{K}^+$  70 mM y 120 mM, en aproximadamente el 92% de los experimentos, se procedió a ensayar con otros agonistas capaces de inducir una respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  endógena sobre la línea celular

SH-SH5Y. En este modelo se ha descrito la presencia de receptores colinérgicos (Vetter y Lewis, 2010), por lo cual se estimuló con acetilcolina (ACh) (10  $\mu\text{M}$ ) y nicotina (Nic) (100  $\mu\text{M}$ ), utilizando una  $\text{CE}_{80}$  para evaluar el efecto sobre la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . En tres experimentos realizados no se observó respuesta (datos no mostrados).

### **5. Efecto de la aplicación aguda de tRV sobre el nivel de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en células SH-SY5Y.**

Los experimentos para caracterizar el efecto de la estimulación aguda de tRV sobre el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células SH-SY5Y fueron realizados siguiendo el protocolo ya descrito en metodología. Las células tras ser cargadas con la sonda fluorescente Fluo-3 AM durante 30 min a 37°C, fueron perfundidas con solución de Locke normal para estabilizar la señal basal y posteriormente estimuladas de forma aguda por 3 min con tRV (10 nM, 1 $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ), alternando entre cada concentración lavados de 2 min con solución de Locke normal.

Como se observa en la **Figura 8D**, para las diferentes concentraciones estudiadas se obtuvo una ausencia total de respuesta (n=4).



**Fig. 8. Efecto de la estimulación aguda con  $K^+$  70 mM y tRV sobre la señal citosólica de  $Ca^{2+}$  en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** La figura muestra un registro original de la señal citosólica de  $Ca^{2+}$  en grupos de células de pasaje 16 al 20, al 3<sup>er</sup> día de cultivo. Las células fueron cargadas con la sonda fluorescente Fluo-3 AM durante 30 min a 37°C. Tras cada estímulo, las células fueron lavadas con solución de Locke. 8A y 8B: Incremento de la señal citosólica de  $Ca^{2+}$  en respuesta a un estímulo agudo de 40 s con  $K^+$  70 mM (n=3); 8C: Ausencia de respuesta frente a 40 s de estímulo con  $K^+$  70 mM (n=35); 8D: Ausencia de respuesta frente a 180 s de estímulo con tRV (10 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) (n=4). U.A.F.: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el efecto de tRV sobre células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometidas a muerte inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados demuestran que 1) la despolarización continua con  $\text{K}^+$  120 mM (24 hrs) genera una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, provocando la muerte de las células SH-SY5Y; 2) la incubación con tRV (10 nM) aumenta significativamente la viabilidad de las células SH-SY5Y sometidas a muerte inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y 3) el aumento de la viabilidad inducido por tRV no presenta diferencias significativas respecto de lo producido por nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ).

La elevación anormal de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como ya se ha explicado, constituye uno de los fenómenos más constantes y determinantes de la lesión neuronal, existiendo diversos mecanismos que desencadenan la desregulación de la homeostasis de este ión. A nivel experimental, una de las formas más efectivas para desencadenar un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es estimular las células con  $\text{K}^+$ , provocando una despolarización de la membrana y la consiguiente entrada de este ión a la célula (Kawamoto y cols., 2012). El ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  luego de la despolarización de la membrana, ocurre a través de CCDV, los cuales constituyen la principal vía de entrada de este ión a la célula (Wojda y cols., 2008; Catterall, 2011).

Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la célula, ésta tiende a mantener la homeostasis no permitiendo la desregulación de la concentración de este ión. Sin embargo, cuando la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  se hace ineficaz debido a mecanismos persistentes que inducen su entrada, se genera un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que es capaz de desencadenar cascadas de señales químicas que activan genes apoptóticos. Concretamente el incremento de los niveles de este ión activa determinadas enzimas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes como son las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y hasta la propia NOS, todas implicadas en la

ejecución del programa de muerte celular. Además, este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  por ingreso a través de CCDV, genera a su vez nuevos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, debido principalmente a estimulación de receptores de rianodina en RE y alteración del potencial de membrana mitocondrial, generando por consiguiente, la autoalimentación de un proceso que acaba provocando muerte celular mediante apoptosis o necrosis (Peinado y cols., 2000; Gleichmann y Mattson, 2011).

Se utilizó  $\text{K}^+$  120 mM para conseguir la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, obteniéndose resultados que demuestran una disminución de la VC, tanto para cK1 como para cK2 (controles de muerte celular). Resultados muy similares se observan en el trabajo de Haack y cols. (2011), donde tras la estimulación de células SH-SY5Y con KCl (10 mM) obtienen un peak de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (respecto a valores basales determinados con anterioridad), condición que condujo a una disminución de la VC.

Los controles de muerte celular cK1 y cK2, referidos a células incubadas por 24 hrs con  $\text{K}^+$  120 mM el primer día y segundo día, respectivamente, disminuyeron su VC significativamente con respecto a sus controles (Fig. 5A y 5B), siendo observada una disminución mayor en cK1. La razón más importante de esta diferencia es que la solución de  $\text{K}^+$  120 mM, al igual que la de  $\text{K}^+$  70 mM, fue preparada modificando la solución de Locke normal, debido a que no fue posible su preparación en medio de cultivo, ya que, la adición de KCl modifica la proporción de otras sales, provocando la alteración de la osmolaridad.

Cuando se habla de medios de cultivo, las variables más importantes, en cuanto a la VC, son la osmolaridad y el pH. La osmolaridad óptima para mantener células en cultivo se encuentra en el rango de 260-320 mOsm/L, alrededor de la osmolaridad del plasma sanguíneo (300 mOsm/L) (Gil-Loyzaga, 2011). El crecimiento o proliferación de

células depende en gran parte del medio de cultivo utilizado, existiendo diversos tipos que se diferencian, a grandes rasgos, en la composición de nutrientes y suplementos que se adicionan, siendo una de las diferencias la cantidad de SFB que poseen; se ha reportado que para aumentar la eficiencia del crecimiento celular es adecuado utilizar concentraciones de SFB de hasta 50% (Estrada y Venegas, 2007).

Por lo tanto, a pesar de que la solución de  $K^+$  120 mM no reunió los requerimientos nutricionales necesarios para lograr el crecimiento de las células en cK1 (a diferencia de cK2, donde las células estuvieron por 24 hrs en medio de cultivo completo para posteriormente recibir el tratamiento con  $K^+$  120 mM), ello no invalida los resultados obtenidos, debido a que la VC fue calculada respecto al control correspondiente a la incubación de células en solución de Locke normal tanto para el primer día (cL1) como para el segundo día (cL2). Locke es utilizado para incubaciones cortas permitiendo la supervivencia celular al proveer glucosa como fuente de energía (Gil-Loyzaga, 2011).

La participación de CCDV en la muerte celular inducida por  $K^+$  queda demostrada en el aumento de la VC tras incubar las células SH-SY5Y con  $K^+$  120 mM en presencia de nifedipino por 24 hrs, un antagonista selectivo de CCDV tipo-L. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Haack y cols. (2011), donde al incubar células SH-SY5Y con moduladores de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo-L (amlodipino, nimodipino, flunarizina, nifedipino, nicardipino) observaron que la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuía de manera significativa (3 veces) respecto de la concentración basal determinada inicialmente, demostrando que estos compuestos tienen un efecto inhibitorio sobre los CCDV tipo-L.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que tRV (10 nM) protege a las células SH-SY5Y de la muerte inducida por  $Ca^{2+}$ , siendo el tratamiento conjunto (TcJ) el que mostró la mayor protección, reflejado en el aumento significativo de VC en

comparación al control de muerte, además de presentar una VC similar a la inducida por nifedipino (Fig. 6C), sugiriendo la participación de los CCDV tipo-L en el mecanismo neuroprotector de este compuesto.

El efecto protector mostrado por tRV al aumentar la VC en células SH-SY5Y puede ser explicado, al menos en parte, por un efecto bloqueador de CCDV. La acción inhibitoria de tRV sobre CCDV ha sido estudiada en modelos cardiovasculares; por ejemplo, Zhang y cols., (2006) muestran en miocitos ventriculares de rata que luego de la administración de tRV (40  $\mu$ M) se produce una disminución de las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo-L con respecto a la corriente control, efecto que posterior al lavado vuelve a estados basales. Otro estudio señala el efecto vasodilatador de tRV (40  $\mu$ M) sobre anillos de aorta abdominal de rata sometidos previamente a una condición de vasoconstricción con KCl, mecanismo atribuido a la inhibición de CCDV tipo-L (Shen y cols., 2012).

Por el contrario, el efecto de tRV sobre CCDV tipo-L no está muy bien estudiado en modelos neuronales, y los resultados que se encuentran disponibles son contradictorios. Estudios en CCB (un modelo de neurosecreción) mediante la técnica de *patch-clamp*, muestran que la estimulación con tRV (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) sobre este modelo celular no genera modificaciones sobre la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  (Fernández y cols., 2010); en cambio, estudios realizados en nuestro laboratorio señalan que tRV (10  $\mu$ M) disminuye estas corrientes (Martínez, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que tRV (10 nM) posee un efecto neuroprotector, pero la metodología experimental utilizada no nos permite postular a CCDV tipo-L como mecanismo de acción de este compuesto. Diversa bibliografía apunta a los posibles mecanismos neuroprotectores de tRV, postulándolo

como una molécula de efectos pleiotrópicos que sería de gran utilidad en patologías neurodegenerativas (Davinelli y cols., 2012). Probablemente tenga una acción sobre CCDV tipo-L, debido a todas las evidencias expuestas, pero se necesitan más estudios para corroborarlo.

Como se indicó en resultados, el tratamiento previo de células SH-SY5Y con tRV por 24 hrs no generó un efecto neuroprotector considerable con respecto al control de muerte celular. Haciendo una similitud con los efectos preventivos que se le atribuyen a este compuesto, se puede indicar, que al menos en ensayos *in-vitro* tRV no fue capaz de proteger el modelo neuronal contra el estímulo de muerte aplicado. Probablemente, en 24 hrs de incubación, tRV pudo ser metabolizado por la célula o degradado, no estando disponible para ejercer su efecto neuroprotector. Por otro lado, se esperaba que el tratamiento posterior al estímulo de muerte no produjera neuroprotección puesto que, a pesar de que existe evidencia de que tRV es capaz de regenerar células madres (Peltz y cols., 2012), no se esperaba el mismo efecto sobre el modelo neuronal estudiado.

La incubación de células SH-SY5Y con tRV 1 nM, de acuerdo a los diferentes tratamientos, mostró una importante tendencia a aumentar la VC en el TcJ con respecto al estímulo de muerte (Fig. 6C), pero de menor magnitud a lo obtenido por tRV 10 nM en el mismo tratamiento. Por consiguiente, esto hace interesante continuar el estudio con concentraciones intermedias de tRV para establecer cuál es el efecto máximo de este compuesto y así poder determinar si el efecto neuroprotector observado es dependiente de la concentración, lo cual no se visualiza en el rango de concentraciones probadas en esta tesis.

Por otra parte, en todos los tratamientos ensayados, tRV (100  $\mu\text{M}$ ) indujo una muerte celular mayor a la observada por el control de muerte con  $\text{K}^+$  120 mM, incluso nula en algunos tratamientos. La razón para explicar este efecto deletéreo de tRV (100  $\mu\text{M}$ ) sobre las células SH-SY5Y es que este compuesto a concentraciones elevadas ejerce una acción nociva. Resultados similares se han observado en relación a que concentraciones elevadas de tRV producen muerte celular. En el estudio de Peltz y cols., (2012) se observó que en células madres mesenquimatosas humanas tRV (0,1  $\mu\text{M}$ ) promueve la autorenovación celular por una inhibición de mecanismos relacionados a la senescencia celular, que tRV (1  $\mu\text{M}$ ) producía un efecto mínimo sobre la autorenovación y donde tRV (5  $\mu\text{M}$  o superior) causaba la inhibición de la autorenovación y un incremento de la tasa de senescencia. Otro trabajo señala que dosis bajas de tRV (5-20  $\mu\text{M}$ ) producen efectos protectores a nivel cardiovascular, por el contrario, dosis altas de tRV (60  $\mu\text{M}$ ) inhiben el crecimiento celular e induce factores proapoptóticos (Mukherjee y cols., 2010). Asimismo, In y cols., (2006) demuestran que dosis elevadas de tRV (2,5-100  $\mu\text{M}$ ) inducen apoptosis en células endoteliales.

Estos tres trabajos recién mencionados, concluyen que tRV es un agente beneficioso que ejerce sus efectos de una manera dosis dependiente, donde queda demostrado que a bajas concentraciones este compuesto actúa como un agente antiapoptótico, promoviendo la cardioprotección, neuroprotección, entre otros, y que por el contrario, tRV a altas dosis actúa como un agente proapoptótico, que eleva la expresión de proteínas pro-apoptóticas resultando en la generación de un ambiente redox inestable, además de causar inhibición de la síntesis de ARN, ADN y proteínas. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que, al igual que lo señalado por estos autores, a concentraciones elevadas de tRV (100  $\mu\text{M}$ ) se induce la muerte de las células SH-SY5Y,

lo cual impide que tRV ejerza sus efectos neuroprotectores observados a concentraciones más bajas (10 nM).

Cabe destacar que, a dosis altas de tRV, las señales proapoptóticas generadas serían de gran utilidad en la terapia anticancerígena, mecanismos que están siendo objeto de intensos estudios en la actualidad.

De manera indirecta podemos aseverar que la incubación de células SH-SY5Y con  $K^+$  120 mM indujo un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , demostrado gracias a la protección que confirió nifedipino en cuanto a VC (cNife). Es por esto que además se evaluó el efecto agudo de  $K^+$  70 mM sobre la señal citosólica de  $Ca^{2+}$ , de tal manera de observar de forma directa este aumento de concentración y el consiguiente efecto de la estimulación aguda con tRV sobre dicha señal.

Los resultados muestran que el estímulo agudo de  $K^+$  70 mM indujo, en el modelo estudiado, 3 tipos diferentes de señal citosólica de  $Ca^{2+}$  (Fig. 8A, 8B y 8C). Las respuestas obtenidas se pueden clasificar en (1) aumento rápido y de gran amplitud de la señal citosólica de  $Ca^{2+}$ ; (2) aumento lento y de menor amplitud de la señal citosólica de  $Ca^{2+}$  y (3) ausencia total de respuesta. Las respuestas observadas estarían dando cuenta de la presencia de subpoblaciones con distinto grado de expresión o funcionalidad de CCDV dentro de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de manera que frente a un mismo estímulo las células responden de modo diferente. Resultados similares se han observado en este modelo celular frente a otros estímulos; Pérez-Álvarez y cols., (2012) estudiaron el efecto de metadona (0,5  $\mu$ M) sobre la señal citosólica de  $Ca^{2+}$  en células SH-SY5Y, teniendo como antecedente previo el que metadona responde con un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular en la mayoría de estas células, sin embargo, el efecto de metadona que obtuvieron difiere

considerablemente entre grupos de células, observándose 4 tipos diferentes de señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , correspondientes a: ausencia total de señal, incremento temprano y sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , aumento retrasado de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Otro estudio señala que sería el efecto de las diferentes subpoblaciones que presenta esta línea celular (SH-SY5Y) lo que estaría generando la ausencia de daño citotóxico, observado en la incubación de estas células con bilirrubina; una hiperbilirrubinemia presente en neonatos puede provocar encefalopatía conduciendo desde daño neurológico mínimo a una disfunción neurodegenerativa permanente, condición conocida como kernicterus (Giraudi y cols., 2011).

La ausencia de respuesta citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , frente al estímulo agudo con  $\text{K}^+$  70 mM, se produjo en alrededor del 92% de los experimentos, subpoblación mayoritaria que estaría dando cuenta del 44% de células que sobreviven tras la incubación con  $\text{K}^+$  120 mM por 24 hrs. Debido a esta baja tasa de respuesta a  $\text{K}^+$  70 mM, se estimularon estas células con agonistas colinérgicos, ACh y Nic, sin observarse cambios en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos y otros receptores han sido descritos para estas células (Hong-rong y cols., 2010).

El estudio de la despolarización continua con  $\text{K}^+$  120 mM (24 hrs) sobre la señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en células SH-SY5Y no se realizó debido al efecto negativo obtenido por el estímulo agudo con  $\text{K}^+$  70 mM y por lo restringido del tiempo de trabajo experimental. Estos experimentos requieren tiempos largos de estimulación y dada la baja tasa de respuesta se requiere un gran número de repeticiones. De todas formas, se estimuló las células de forma aguda con  $\text{K}^+$  120 mM no observándose respuesta.

Es importante considerar el origen de las células SH-SY5Y. La línea celular SK-N-SH obtenida de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma, dio origen

como tercer subclon sucesivo a la línea celular SH-SY5Y. La línea SK-N-SH contiene células de tres fenotipos diferentes, tanto bioquímica como morfológicamente: (1) células neuroblásticas (tipo-N); (2) células schwannian o adherentes (tipo-S) y (3) células intermedias. A pesar de que la línea celular SH-SY5Y deriva casi por completo de las células tipo-N, posee una baja proporción de los otros dos tipos celulares. Esta línea exhibe marcadores neuronales con actividad enzimática, receptores opiodes y de noradrenalina, canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo-L y tipo-N, además de, como se mencionó anteriormente, receptores colinérgicos, entre otros (Encinas y cols., 2000; Hong-rong y cols., 2010).

El trabajar con células SH-SY5Y no diferenciadas, presenta las siguientes limitantes: como continuamente se están dividiendo, el número de células no diferenciadas incrementa durante el curso del experimento, generando desincronización en el cultivo celular y heterogeneidad, no exhibiendo alguna de éstas marcadores típicos de neuronas maduras, lo cual puede afectar la certeza en los experimentos (Hong-rong y cols., 2010). Estas células no diferenciadas pueden ser inducidas a la diferenciación mediante una variedad de agentes, incluyendo ácido retinoico (AR), ésteres de forbol (TPA= 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF= Brain-Derived Neurotrophic Factor), entre otros, generando células con un fenotipo funcional de neurona madura, es decir, detienen su proliferación convirtiéndose en poblaciones homogéneas y estables, mostrando un extensivo crecimiento neurítico con morfología similar a neuronas del cerebro humano (Encinas y cols., 2000). Una vez diferenciadas, las células adquieren una función bioquímica, estructural, morfológica y electrofisiológica más similar a neuronas humanas (Hong-rong y cols., 2010). Del punto de vista electrofisiológico, Hong-rong y cols., (2010) indican que en células no diferenciadas esta capacidad esta alterada, lo que podría

explicar de alguna manera nuestra hipótesis, en cuanto a que existen subpoblaciones que presentan distinto grado de expresión o funcionalidad de CCDV dentro de la línea celular estudiada.

Por lo tanto, como se mencionó, uno de los factores que podría estar derivando en la presencia de subpoblaciones en la línea SH-SY5Y es la utilización de células no diferenciadas. En el tiempo de trabajo experimental se intentó diferenciarlas con AR (10  $\mu$ M), como medida para controlar la proliferación celular y obtener cultivos más homogéneos, pero nuevamente el tiempo restringido para desarrollar el protocolo experimental impidió su realización; éste consiste en incubar las células 2 días en medio de cultivo completo, para posteriormente dejar incubando por 5 días con AR (Encinas y cols., 2000; Calabrò y cols., 2012). Por otro lado, la utilización de células pertenecientes a pasajes elevados condiciona, de igual forma, la respuesta obtenida frente a un estímulo, debido a que sucesivos trasposos van generando cambios en la expresión de receptores y marcadores neuronales. Diversos estudios recomiendan usar pasajes que van entre el 5-12 (Agholme y cols., 2010; Ferrari-Toninelli y cols., 2010).

Otro de los objetivos de esta tesis fue evidenciar el efecto agudo de tRV (10 nM, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) sobre la señal citosólica de  $Ca^{2+}$ . Los resultados muestran una ausencia de señal, efecto que difiere con los obtenidos por Zhang y cols., (2012) donde tras una aplicación aguda de tRV (10  $\mu$ M) por 30 s sobre neuronas corticales de cultivo primario se observa una elevación significativa de la  $[Ca^{2+}]_i$ , mediada por su liberación desde almacenes intracelulares de  $Ca^{2+}$ . La ausencia de respuesta en nuestro trabajo puede explicarse de la misma forma que para la ausencia de respuesta observada por los otros estímulos mencionados, donde las células no-diferenciadas presentan variaciones bioquímicas, funcionales y además morfológicas, respecto de células diferenciadas o de cultivos primarios.

A pesar de todas las limitantes que presenta esta línea celular, sigue siendo extensamente utilizada como modelo neuronal, debido a que posee muchas de las características funcionales y bioquímicas de las neuronas humanas. Es así como se ha utilizado ampliamente en estudios neurológicos experimentales, incluyendo análisis de diferenciación neuronal, metabolismo y función relacionada a los procesos neurodegenerativos y neuroadaptativos, de neurotoxicidad y neuroprotección (Hong-rong y cols., 2010). Además, esta línea SH-SY5Y provee de un número ilimitado de células de origen humano con similares características de neuronas humanas primarias. Por otro lado, los cultivos de neuronas primarias son extremadamente difíciles de obtener, manejar y cultivar, y la ética dificulta la obtención de una cantidad suficiente y apropiada de neuronas, limitando su aplicación (Agholme y cols., 2010; Hong-rong y cols., 2010).

Debido al contexto epidemiológico en el que nos encontramos y a evidencias que señalan que, tanto en neuronas envejecidas como en cerebros de pacientes con Alzheimer, hay una sobreexpresión de CCDV tipo-L, se hace de fundamental importancia la continuación de esta investigación a corto plazo, en cuanto al efecto de este compuesto en células SH-SY5Y diferenciadas, estudiar más concentraciones de tRV para establecer si su efecto es concentración-dependiente, además de determinar su  $CE_{50}$ . Por otro lado, debido a que con la metodología experimental desarrollada en este trabajo no se puede aseverar que la acción neuroprotectora de tRV sea sobre CCDV tipo-L, sería interesante estudiar el efecto de tRV sobre la amplitud máxima de  $I_{Ca}$  en este modelo neuronal, mediante la técnica de *patch-clamp*, contribuyendo de esta manera al estudio de los CCDV tipo-L en relación al mecanismo por el cual tRV ejerce su efecto neuroprotector.

## CONCLUSIONES

1. El tratamiento de células SH-SY5Y con una solución despolarizante de  $K^+$  120 mM durante 24 hrs, induce entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCDV tipo-L generando muerte celular.
2. tRV (10 nM) es capaz de inducir un efecto neuroprotector en células SH-SY5Y sometidas a sobrecarga de  $Ca^{2+}$ .
3. El efecto neuroprotector de tRV (10 nM) es similar al inducido por nifedipino (10  $\mu$ M).

## BIBLIOGRAFÍA

Agholme L, Lindström T, Kagedal K, Marcusson J y Hallbeck M. 2010. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* 20(4): 1069-1082.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2010. London: Alzheimer's Disease International; 2010.

Ávila-Portillo LM, Madero J, López C, León MF, Acosta L, Gómez C (M.D.), Delgado L, Gómez C (PhD), Lozano JM y Reguero M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 4(57): 291-300.

Baur J y Sinclair D. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 493-506.

Bossy-Wetzler E, Schwarzenbacher R y Lipton S. 2004. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat. Med.* 10: S2-S9.

Briskin D. 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol.* 124: 507-514.

Calabrò E, Condello S, Currò M, Ferlazzo N, Caccamo D, Magazù S y Ientile R. 2012. Modulation of heat shock protein response in SH-SY5Y by mobile phone microwaves. *World J Biol Chem.* 3(2): 34-40.

Calamini B, Ratia K, Malkowski M, Cuendet M, Pezzuto J, Santarsiero B y Mesecar A. 2010. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem J.* 429(2): 273-282.

Catterall W. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>+2</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16: 521-555.

Catterall W. 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: 1-24.

Cerella C, Diederich M y Ghibelli L. 2010. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int J Cell Biol.* 2010: 1-14.

Corona J y Tapia R. 2005. Mecanismos de neurodegeneración. Mensaje Bioq. 29: 17-28.

Chen W, Su M y Hung L. 2007. In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. Eur J Pharmacol. 554: 196-204.

Davinelli S, Sapere N, Zella D, Bracale R, Intrieri M y Scapagnini G. 2012. Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease. Oxid Med Cell Longev. 2012: 1-11.

De Toro G. Muerte celular programada: Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. 8º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Octubre de 2006.

Estrada R y Venegas P. 2007. Comparación de diferentes protocolos para el cultivo de células madres mesenquimales de origen adiposo. Rev Costarric Cienc Med. 28: 21-28.

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C y Comella J. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. J Neurochem. 75: 991-1003.

Fernández J, Yanez M, Orallo F, Cortez L, González J, Hernández J, García A y de Diego A. 2010. Blockade by nanomolar resveratrol of quantal catecholamine release in chromaffin cells. Mol Pharmacol. 78(4): 734-744.

Ferrari-Toninelli G, Bonini S, Uberti D, Buizza L, Bettinsoli P, Poliani P, Facchetti F y Memo M. 2010. Targeting Notch pathway induces growth inhibition and differentiation of neuroblastoma cells. Neuro Oncol. 12(12): 1231-1243.

Flórez J. 1998. Terapéutica neuroprotectora. Medicina. 7(99): 4617-4632.

Foti Cuzzola V, Ciurleo R, Giacoppo S, Marino S y Bramanti P. 2011. Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries. CNS Neurol Disord Drug Targets. 10(7): 1-14.

Gandhi S, Vaarmann A, Yao Z, Duchon M, Wood N y Abramov A. 2012. Dopamine induced neurodegeneration in a PINK1 model of parkinson's disease. PLoS ONE 7(5): e37564. doi:10.1371/journal.pone.0037564.

Gandía L, Álvarez RM, Hernández JM, González JM, Pascual R, Rojo J y Tapia L. 2006. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 42(8): 471-477.

Gil-Loyzaga P. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Visión Libros España, Madrid, 2011. 58-59 pp.

Giraudi P, Bellarosa C, Coda-Zabetta C, Peruzzo P y Tiribelli C. 2011. Funcional induction of the Cystine-glutamate exchanger system  $X_c^-$  activity in SH-SY5Y cells by unconjugated bilirubin. *PLoS ONE* 6(12): e29078. doi:10.1371/journal.pone.0029078.

Gleichmann M y Mattson M. 2011. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal.* 14(7): 1261-1273.

Haack K, Narayan S, Li H, Warnock A, Tan L y Bennett M. 2011. Screening for calcium channel modulators in CLN3 siRNA knock down SH-SY5Y neuroblastoma cells reveals a significant decrease of intracellular calcium levels by selected L-type calcium channel blockers. *Biochim Biophys Acta.* 1810(2): 186-191

Hanada M, Krajewski S y Tanaka S. 1993. Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 53: 4978-4986.

Haces del Blanco M y Messieu L. 2005. Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Arch Neurocién.* 10(2): 83-91.

Head B, Peart J, Panneerselvam M, Yokoyama T, Pearn M, Niesman I, Bonds J, Schilling J, Miyanohara A, Headrick J, Ali S, Roth D, Patel P y Patel H. 2010. Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS ONE* 5(12):e15697. doi:10.1371/journal.pone.0015697.

Hong-rong X, Lin-sen H y Guo-yi L. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J.* 123(8): 1086-1092.

In K, Park J y Park H. 2006. Resveratrol at high doses acts as an apoptotic inducer in endothelial cells. *Cancer Res Treat.* 38(1):48-53.

INE. 2005. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.cl> (página visitada el 10 de diciembre del 2011).

INE. 2009. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.cl> (página visitada el 10 de diciembre del 2011).

Jeffery E. 2005. Relative bioactivity of functional foods and related dietary supplements: component interactions for efficacy of functional foods. *J Nutr.* 135: 1223-1225.

Joo R y Dupré E. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia). *Invest Mar.* 30(2):75-79.

Kamat C, Gadal S, Mhatre M, Williamson K, Pye Q y Hensley K. 2008. Antioxidant in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.* 15(3): 473-493.

Kao J. 1994. Practical aspects of measuring  $[Ca^{+2}]$  with fluorescent indicators. *Methods Cell Biol.* 40: 155-181.

Kawamoto E, Vivar C y Camandola S. 2012. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Neuronal Calcium Signalling.* 3(61): 1-17.

Lee M, Kang S, Poncz M, Song K y Park K. 2007. Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cell from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med.* 39(3): 376-384.

Lekli I, Ray D y Das D. 2009. Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. *Genes Nutr.* 5: 55-60.

López-Miranda V, Soto-Montenegro M, Vera G, Herradón E, Desco M y Abalo R. 2012. Resveratrol: un polifenol neuroprotector de la dieta mediterránea. *Rev Neurol.* 54(6): 349-356.

Martínez AE. Efecto de trans-resveratrol sobre canales de calcio dependientes de voltaje en células cromafines bovinas. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 2011.

Minta A, Kao J y Tsien R. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamina and fluorescein chromophores. *J Biol Chem.* 264: 8171-8178.

- Mukherjee S, Dudley J y Das D. 2010. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 8: 478-500.
- Patel K, Scott E, Brown V, Gescher A, Steward W y Brown K. 2011. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 1215: 161-169.
- Peinado M, del moral M, Esteban F, Martínez E, Siles E, Jiménez A, Hernández R, Blanco S, Rodrigo J y Pedrosa J. 2000. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol.* 31(11): 1054-1065.
- Peltz L, Gómez J, Marquez M, Alencastro F, Atashpanjeh N, Quang T, Bach T y Zhao Y. 2012. Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PLoS ONE* 7(5): e37162. doi:10.1371/journal.pone.0037162.
- Pérez V y Sierra F. 2009. Biología del envejecimiento. *Rev Méd Chile.* 137: 296-302.
- Pérez-Álvarez S, Solesio M, Cuenca-López M, Melero-Fernández de Mera, Villalobos C, Kmita H, Galindo M y Jordán J. 2012. Pharmacological characterization of the mechanisms involved in delayed calcium deregulation in SH-SH5Y cells challenged with methadone. *Int J Cell Biol.* 2012: 1-8.
- Pervaiz S. 2001. Resveratrol from the bottle to the bedside?. *Leuk Lymphoma.* 40: 491-498.
- Pervaiz S. 2003. Resveratrol: from grape vines to mammalian biology. *FASEB J.* 17: 1975-1985.
- Richard T, Pawlus A, Iglésias M, Pedrot E, Waffo P, Mérillon J y Pierre J. 2011. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann N Y Acad Sci.* 1215: 103-108.
- Robles M, Gorinstein S, Martín O, Aztiazarán H, González G y Cruz R. 2007. Frutos tropicales mínimamente procesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia.* 32(4): 227-232.
- Shen M, Zhao L, Wu R, Yue S y Pei J. 2012. The vasorelaxing effect of resveratrol on abdominal aorta from rats and its underlying mechanisms. *Vascul Pharmacol.* 10.1016/j.vph.2012.07.005.

Shinohara Y, Toyohira Y, Ueno S, Liu M, Tsutsui M y Yanagihara N. 2007. Effects of resveratrol, a grapes polyphenol, on catecholamine secretion and synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem Pharmacol.* 74(11): 1608-1618.

Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* A: 1-10.

Sun A, Wang Q, Simonyi A y Sun G. 2010. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 41(2-3): 375-383.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter J y Herman B. 1999. Measurements of intracellular calcium. *Phys. Rev.* 79(4): 1089-1124.

Tanovic A y Alfaro V. 2006. Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. *Rev Neurol.* 42(10): 607-616.

Swanberg M, Harnesk K, Ström M, Diez M, Lidman O y Piehl F. 2009. Fine mapping of gene regions regulating neurodegeneration. *PLoS ONE* 4(6): e5906. 10.1371/journal.pone.0005906.

Szurek E y Eroglu A. 2011. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS ONE* 6(11):e27604. 10.1371/journal.pone.0027604.

Toescu E y Vreugdenhil. 2010. Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium.* 47: 158-164.

Ungvari Z, Sonntag W, Cabo R, Baur J y Csiszar A. 2011. Mitochondrial protection by resveratrol. *Med Sci Sports Exerc.* 39(3): 128-132.

Valenzuela R, Bascuñán K, Valenzuela A y Chamorro R. 2009. Ácidos grasos omega-3, enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas: un nuevo enfoque preventivo y terapéutico. *Rev Chil Nutr.* 36(4): 1120-1128.

Vetter I y Lewis R. 2010. Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochem Pharmacol.* 79: 908-920.

Vila M. 2010. Mecanismos de muerte celular programada en la neurodegeneración dopaminérgica de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol.* 50(1): S1-S3.

Von Bernhardt R. 2004. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 42(4): 281-292.

Von Bernhardt R. 2005. Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 43(2): 123-132.

Walle T. 2011. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011. 1215: 9-15.

Wang R, Xiao L, Ma H, Zhang L, He R y Wu Y. 2008. Resveratrol inhibits electrical activity of paraventricular nucleus neurons in rat hypothalamic slices. *Acta Physiologica Sinica.* 60(2): 279-283.

Wendeburg L, Pinheiro A, Bhatia H, Candelario E y Fiebich B. 2009. Resveratrol inhibits prostaglandin formation in IL-1 $\beta$ -stimulated SK-N-SH neuronal cell. *J Neuro inflammation.* 6: 1-8.

Wojda U, Salinska E y Kuznicki J. 2008. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life.* 60(9): 575-590.

Zamora J. 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr.* 34(1): 17-26.

Zhang L, Yin J, Liu Z, Zhang Y, Wang Q y Zhao J. 2006. Effect of resveratrol on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 27(2): 179-183.

Zhang J, Wu P, Long L, Chen Y, Hu Z, Ni L, Wang F y Chen J. 2012. Resveratrol promotes cellular glucose utilization in primary cultured cortical neurons via calcium-dependent signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 15: 1-9.

Zhuang H, Kim Y, Koehler R y Doré S. 2003. Potencial mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci* 993: 276-286.

Zündorf G y Reiser G. 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *14(7):* 1275-1288.