



FACULTAD DE FARMACIA

LABORATORIO DE ELECTROFISIOLOGÍA MPI-UV

**EFFECTO DE TRANS-RESVERATROL SOBRE CANALES DE CALCIO
DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

ALEJANDRA EVERLING MARTÍNEZ ÁNGEL

Director de Tesis: Dra. Rocío Álvarez Villalobos

Co-director de Tesis: Dr. Raúl Vinet Huerta

2011

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Abreviaturas	iii
Introducción	1
Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)	1
CCDV y enfermedades neurodegenerativas	4
Homeostasis del Ca ²⁺ , estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas	6
Resveratrol	8
Propiedades neuroprotectoras de resveratrol	10
La célula cromafín bovina como modelo experimental	12
Hipótesis	14
Objetivos	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Materiales y métodos	16
Materiales	16
Cultivo celular	16
Soluciones para experimentos de <i>patch-clamp</i>	16
Herramientas farmacológicas	16
Compuesto en estudio	17
Métodos	17
Aislamiento y cultivo primario de células cromafines bovinas	17
Registros electrofisiológicos	18

Medición de I_{Ca} totales en la configuración de célula entera, modo fijación de voltaje	20
Análisis estadístico	21
Resultados	23
Aislamiento de I_{Ca} total y efecto de tRV sobre la amplitud máxima de corriente	23
Aislamiento de I_{Ca} no-L y evaluación del efecto de tRV sobre la amplitud máxima de corriente	27
Efecto de tRV sobre la relación intensidad de corriente <i>versus</i> voltaje (I - V)	28
Discusión	30
Conclusiones	35
Bibliografía	36

RESUMEN

Los canales de calcio dependiente de voltaje (CCDV) constituyen la principal vía de entrada de calcio iónico (Ca^{2+}) a la célula, y su desregulación homeostática ha sido implicada en patologías neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Se ha demostrado que esta desregulación es capaz de inducir la generación de radicales libres dañando el tejido neuronal, el cual es altamente vulnerable al estrés oxidativo dado su elevado consumo de oxígeno y la baja presencia de enzimas de defensa antioxidante. Como posible estrategia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, se ha investigado el uso de antioxidantes presentes en la naturaleza, entre los que se encuentran los polifenoles como *trans*-resveratrol (*tRV*), compuesto que ha demostrado tener propiedades neuroprotectoras atribuidas a una acción inhibitoria sobre los CCDV tipo-L. En el presente trabajo se evaluó el efecto agudo de *tRV* sobre los CCDV en células cromafines bovinas (CCB), utilizando la técnica *patch-clamp*, modo fijación de voltaje, configuración de célula entera. *tRV* (10 μM) mostró una tendencia inhibitoria sobre las corrientes totales que fluyen a través de los CCDV en un $19,7 \pm 7,8 \%$, sin modificar el perfil de la curva corriente *versus* voltaje (*I-V*). La aplicación de *tRV* (10 μM) en presencia de nifedipino (10 μM), antagonista selectivo de CCDV tipo-L, mostró una tendencia inhibitoria de un $5,2 \pm 4,1 \%$, correspondiente a la inhibición corrientes que fluyen a través de CCDV de tipo no-L. Los resultados sugieren que *tRV* muestra una tendencia a bloquear los CCDV en CCB, principalmente de tipo-L, el cual ha sido implicado en el mecanismo que subyace a la neuroprotección atribuida a este compuesto.

ABSTRACT

Voltage-dependent calcium channels (VDCC) are the main route of calcium (Ca^{2+}) entry to the cell. Ca^{2+} homeostatic dysregulation has been implicated in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. Ca^{2+} dysregulation has shown to be related to the generation of free radicals and neural tissue damage. Neural tissue is highly sensitive to oxidative stress because of its high oxygen consumption and the low presence of antioxidant defense enzymes. As a possible therapeutic strategy for treating neurodegenerative diseases, naturally occurring antioxidants, including polyphenols such as trans-resveratrol (*tRV*), has been investigated. *tRV* has shown neuroprotective properties related to an inhibitory effect on L-type VDCC. This study evaluated the acute effect of *tRV* on VDCC in bovine chromaffin cells (BCC), using patch-clamp technique, voltage-clamp mode, in whole cell configuration. *tRV* (10 μM) showed a tendency to inhibit total currents flowing through VDCC by $19.7 \pm 7.8\%$. No changes on the profile of the current-voltage curve (I-V), were observed. Addition of *tRV* (10 μM), in the presence of nifedipine (10 μM), a selective antagonist of L-type VDCC, showed a tendency to inhibit currents flowing through non L-type VDCC by $5.2 \pm 4.1\%$. Results suggest that *tRV* has a tendency to block VDCC in CCB, mainly L-type VDCC, which has been implicated in the mechanism underlying the neuroprotection attributed to this compound.

ABREVIATURAS

ACh	: Acetilcolina
BSA	: Albúmina sérica bovina
BZP	: Benzotiazepinas
CCB	: Células cromafines bovinas
CCDV	: Canales de calcio dependientes de voltaje
DHP	: Dihidropiridinas
DMEM	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: Dimetilsulfóxido
EA	: Enfermedad de Alzheimer
EO	: Estrés oxidativo
EP	: Enfermedad de Parkinson
FAA	: Fenilalquilaminas
HEPES	: Ácido (N-[2-hidroxietyl]-piperacino-N´-[2-etanosulfónico])
HP	: Potencial de fijación
HVA	: CCDV de alto umbral de activación (de “ <i>high-voltage activated</i> ”)
I_{Ca}	: Corriente de calcio
I_{Ba}	: Corriente de bario
I_K	: Corrientes de K^+
I_{Na}	: Corrientes de Na^+
LVA	: CCDV de bajo umbral de activación (de “ <i>low-voltage activated</i> ”)
MPTP	: 1- metil-4-fenil-1,2,3,6, -tetrahidropiridina
RL	: Radicales libres
RNS	: Especie reactivas de nitrógeno
ROS	: Especie reactivas de oxígeno
TEA	: Tetraetilamonio
<i>t</i>RV	: <i>trans</i> -resveratrol
TTX	: Tetrodotoxina

INTRODUCCIÓN

Los canales de calcio dependientes de voltaje

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) se encuentran presentes en la membrana plasmática de células nerviosas, cardíacas, musculares, inmunológicas, endocrinas y células β -pancreáticas, entre otras y constituyen la principal vía de entrada de calcio (Ca^{2+}) a la célula en respuesta a una despolarización de la membrana (Catterall, 2000). El Ca^{2+} que ingresa a la célula a través de los CCDV participa en una variedad de importantes procesos en el organismo entre los que se incluyen, la contracción muscular, neurotransmisión, secreción hormonal, activación de enzimas, liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, expresión génica, diferenciación celular, supervivencia y plasticidad neuronal, además de participar como señal en la fecundación y en la apoptosis o muerte celular programada (Cerella y cols., 2010; Petersen y cols., 2005). Se puede afirmar entonces, que los CCDV constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares (Catterall, 2000; Dolphin, 2006).

Los CCDV son proteínas heterooligomérica compuesta por una subunidad α_1 y pequeñas subunidades accesorias β , γ y $\alpha_2\delta$, las cuales son responsables de otorgar la funcionalidad al canal (Tseng y cols., 2006, Catterall y cols., 2007) (Fig. 1A). La subunidad α_1 es una proteína con una secuencia de aproximadamente 2000 aminoácidos, peso molecular 75kD, codificada por diez genes diferentes denominados A, B, C, D, E, G y S y formadora del poro iónico. Contiene cuatro dominios idénticos (I-IV) y cada uno de estos consta de seis segmentos que atraviesan la membrana (S1-S6). La región S5-S6 controla la selectividad del canal y el segmento S4, funciona como el sensor de voltaje (Arikkath y Campbell, 2003). Esta subunidad conduce las corrientes de calcio (I_{Ca}), regula la permeabilidad del canal y ajusta los umbrales de activación e inactivación, (Tseng y cols., 2006). La subunidad β es un proteína de peso molecular que oscila entre los 52 y 78 kD, es

codificada por cuatro genes no alélicos denominados 1, 2, 3 y 4, por lo que existen cuatro isoformas $\beta 1$ - $\beta 4$ (Vitko y cols., 2008). La subunidad γ , es una proteína integral de membrana de alrededor de 222 aminoácidos y de peso molecular que varía entre 17-25 kDa. Existen ocho isoformas ($\gamma 1 - \gamma 8$), y sus extremos amino y carboxi terminal se encuentran ubicados en el espacio intracelular, su función es modular los cambios de amplitud y cinética de corriente de los CCDV (Kang y Campbell, 2003). La subunidad $\alpha_2\delta$ también es una proteína transmembrana, se compone de dos polipéptidos α_2 y δ , que son los productos de un mismo gen generados por la división posterior a la traducción, la subunidad α_2 es altamente glicosilada mientras que la δ ancla la subunidad α_2 a la membrana celular, uniéndose entre sí de forma covalente por puentes disulfuro (Arikkath y cols., 2003) (Fig. 1B).

Los CCDV se pueden clasificar según sus propiedades electrofisiológicas y/o farmacológicas (Tabla 1). De acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas, los CCDV se dividen en dos clases, (1) Los CCDV de bajo umbral de activación (low voltage activated, LVA) y (2) los CCDV de alto umbral de activación (high voltage activated, HVA) (Catterall y cols., 2005).

Los CCDV de bajo umbral se activan de forma voltaje dependiente a potenciales negativos de -70 a -50 mV, presentan aperturas muy breves, se inactivan en pocas decenas de milisegundo después del comienzo del estímulo despolarizante y se desactivan lentamente; en cambio los CCDV de alto umbral inician su activación a un potencial entre -40 y -10 mV, su inactivación depende en parte de las condiciones iónicas de registro, pero siempre se desarrolla más tardíamente que los CCDV de bajo umbral y presentan desactivación rápida (Latorre y cols., 1996).

La clasificación farmacológica de los CCDV se basa fundamentalmente en el bloqueo selectivo de ciertas sustancias químicas sobre estos (Kochegarov, 2003). Los CCDV de alto umbral de activación que son bloqueados por moléculas orgánicas como dihidropiridinas (DHP), benzotiazepinas (BZP) y fenilalquilaminas (FAA) se denominan CCDV tipo-L. Estos canales han

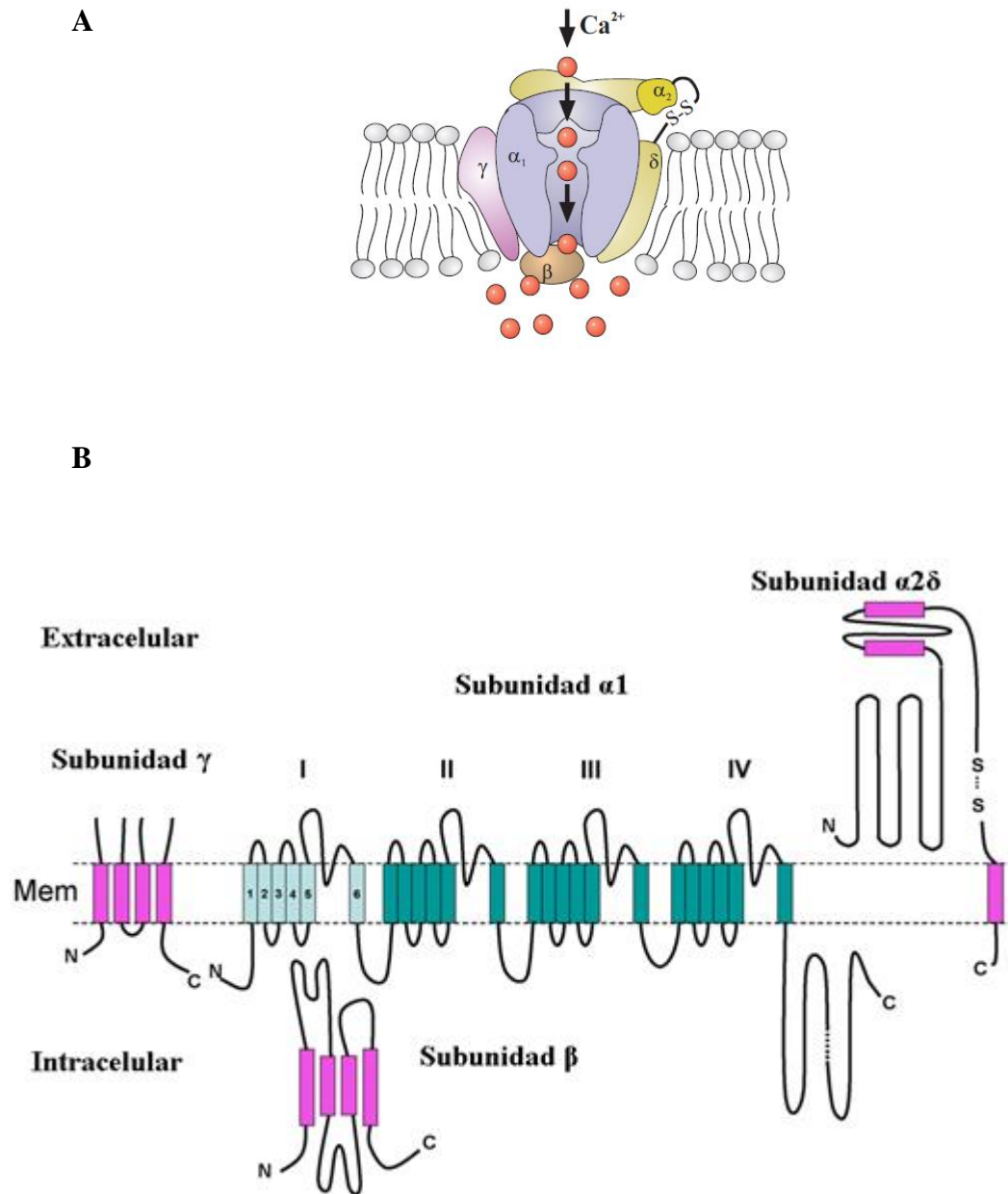


Figura 1. Estructura esquemática de los canales de calcio dependientes de voltaje. **A)** Figura esquemática que representa la disposición espacial de las principales subunidades que conforman los CCDV (α_1 , β , γ , $\alpha_2\delta$) (Lacinová, 2005). **B)** La subunidad α_1 principal proteína transmembranal que contienen el poro, a través del cual los iones de Ca^{2+} pasan al espacio intracelular, está regula por la subunidad intracelular β , subunidad transmembranal γ y subunidad $\alpha_2\delta$ conectadas por un puente disulfuro. (Modificado de Gribkoff, 2006).

sido los más estudiados y se encuentran ampliamente distribuidos en células excitables y no excitables (Triggle, 2006) (Tabla 1). Por su parte los que pueden ser selectivamente bloqueados por toxinas peptídicas como ω -conotoxina GVIA y MVIIA aisladas de caracoles marinos del género *Conus*, se designan CCDV de tipo-N (Doering y Zamponi, 2003), puesto que se describieron por primera vez en neuronas del ganglio dorsal del pollo (Nowycky y cols., 1985), y se encuentran sólo en células neuronales (Elmslie, 2003). Mientras que los que son inhibidos selectivamente por ω -agatoxina IVA (proveniente del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*) son llamados P/Q y fueron identificados por primera vez en las células de Purkinje (Doering y Zamponi, 2005). Los CCDV que no son inhibidos selectivamente por ningún compuesto son denominados residuales, CCDV tipo-R (Catterall y cols., 2005). Los CCDV de bajo umbral de activación o CCDV tipo-T se inactivan por iones inorgánicos tal como el Ni^{2+} y se denominan así por presentar una rápida inactivación (*Transient*) (Yunker y McEnery, 2003).

La nomenclatura actual para los CCDV se basa en utilizar el símbolo químico del ión principal, calcio (Ca) con el principal regulador fisiológico, voltaje (V), y la subfamilia genética de la subunidad $\alpha 1$ (1-3) (Catterall y cols., 2005) (Tabla 1).

CCDV y enfermedades neurodegenerativas

Los CCDV han sido implicados, en patologías del sistema nervioso tales como epilepsia y dolor crónico (Elmslie, 2004), lo cual tiene relación con la importante presencia de estos canales a nivel neuronal, ya que las células nerviosas expresan CCDV de tipo-L (CAV1.2, CAV1.3 y CAV1.4), tipo-T (CAV3.1, CAV3.2, CAV3.3), tipo-R (CAV2.3), tipo-P/Q (CAV2.1) y tipo-N (CAV2.2) (Evans y Zamponi, 2006).

Tabla 1. Función fisiológica y farmacología de canales de calcio dependientes de voltaje

CANAL	TIPO DE SUBUBIDAD α	TIPO DE CORRIENTE	CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES	FARMACOLOGÍA	LOCALIZACIÓN
Cav1.1	α_1S	L	Alto umbral de activación. Inactivación lenta (dependiente de Calcio)	DHP*, FAA*, BZP*	Músculo esquelético: Túbulos transversos.
Cav1.2	α_1C	L	Alto umbral de activación. Inactivación lenta (dependiente de Calcio).	DHP, FAA, BZP	Miocitos cardíacos, Células musc. Lisas, Células endocrinas, Cuerpos neuronales, Dendritas proximales.
Cav1.3	α_1D	L	Alto umbral de activación. Inactivación lenta (dependiente de Calcio).	Baja sensibilidad a DHP	Células endocrinas, Cuerpos neuronales y dendritas, miocitos cardíacos atriales y células marcapaso, células ciliares de la cóclea.
Cav1.4	α_1F	L	Alto umbral de activación. Inactivación lenta (dependiente de Calcio).	Baja sensibilidad a DHP	Retina y células bipolares, médula espinal, glándula adrenal, mastocitos.
Cav2.1	α_1A	P/Q	Alto umbral de activación. Inactivación moderada.	ω - agatoxina IVA ω -agatoxina IVB ω -conotoxina MVIIC	Terminales nerviosos y dendritas; células Neuroendocrina.
Cav2.2	α_1B	N	Alto umbral de activación. Inactivación moderada.	ω -conotoxina GVIA ω -conotoxina MVIIC	Terminales nerviosos y dendritas; células Neuroendocrinas.
Cav2.3	α_1E	R	Alto umbral de activación medio. Inactivación rápida.	SNX482	Cuerpos neuronales y dendritas.
Cav3.1	α_1G	T	Bajo umbral de activación. Inactivación rápida.	Ninguno	Cuerpos neuronales y dendritas, células musc. lisas y cardíacas.
Cav3.2	α_1I	T	Bajo umbral de activación. Inactivación rápida.	Ninguno	Cuerpos neuronales y dendritas, células musc. lisas y cardíacas
Cav3.3	α_1H	T	Bajo umbral de activación Inactivación rápida	Ninguno	Cuerpos neuronales y dendritas

*DHP: dihidropiridinas, FAA: fenilalquilaminas, BZP: benzotiazepinas (Catterall y cols., 2005).

Los CCDV, también han sido implicados en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Kochegarov, 2003). El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA), de etiopatogenia aún desconocida, es considerada multifactorial, ya que están implicados factores genéticos, ambientales, anormalidades en la estructura y/o función de las proteínas (Mattson y Chan, 2003), como también la alta concentración de Ca^{2+} intracelular que se ha observado en los tejidos cerebrales de pacientes con EA. La acumulación excesiva de Ca^{2+} citosólico, se debe a su entrada a través de los CCDV tipo-N y CCDV tipo-P/Q activados por el péptido β -amiloide (βA), componente central de las placas seniles en la EA (Demuro y cols., 2010; Ho y cols., 2001; Ramsden y cols., 2002; Ueda y cols., 1997).

La enfermedad de Parkinson (EP) por su parte, se caracteriza por una degeneración y muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, desconociéndose aún la causa que produce la muerte neuronal. Sin embargo, se tienen pruebas suficientes que demuestran que la neurodegeneración progresiva está relacionada a una serie de mecanismos en los que se encuentran involucradas anomalías mitocondriales, estrés oxidativo, aminoácidos excitadores (Mizuno y cols., 2008) e incremento de Ca^{2+} citoplasmático relacionado con la activación de CCDV tipo-L (Chan y cols., 2009). La desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} constituye por tanto, un elemento central en estas patologías.

Homeostasis del Ca^{2+} , estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas

Una de las hipótesis más integradoras que se han establecido para explicar el envejecimiento neuronal y patologías neurodegenerativas como el Alzheimer es la “hipótesis del calcio” (Ca^{2+}). Esta hipótesis plantea la implicancia de la homeostasis del Ca^{2+} como un factor potencial para explicar algunos de los déficit de la función cognitiva durante el envejecimiento. Es decir que la alteración de los mecanismos celulares que controlan la homeostasis del Ca^{2+}

desempeñarían un importante rol en los procesos de envejecimiento y neurodegeneración (Toescu y Vreugdenhil, 2010).

Diversos estudios han demostrado que la desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} activa una cascada de señales mediadas por rutas enzimáticas, entre las que se incluyen proteincinasas, fosfolipasa A_2 , óxido nítrico sintetasa y proteasas (Deisseroth y cols., 2003; Surmeier y cols., 2010), que provocarían la generación de radicales libres (RL), especies químicas originadas a partir de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), que poseen uno o más electrones desapareados y son capaces de existir en forma independiente (Valko y cols., 2007).

La generación de ROS es una característica integral de la función celular normal, ya que se generan en diferentes sistemas celulares a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. También pueden ser generados por las radiaciones ionizantes o ultravioletas, tabaco, toxinas del medio ambiente, drogas y alcohol (Blomhoff, 2004).

Cuando el aumento del contenido intracelular de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes intracelulares se produce el estrés oxidativo (EO) provocando efectos perjudiciales, en lípidos, proteínas/enzimas, carbohidratos, ADN y tejidos, además de producirse una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} (Valko y cols., 2007).

Uno de los tejidos más vulnerables al daño producido por el EO es el neuronal, debido a que tiene una alta demanda de oxígeno molecular, generándose un exceso de producción de ROS, los que atacan la membrana celular neuronal, enriquecida de ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables. Sumado a ello, este tejido posee una abundancia relativamente baja de enzimas de defensa antioxidante (Emerit y cols., 2004).

La mayoría de los autores coinciden en que el EO sería un elemento común presente en el origen de las enfermedades neurodegenerativas (Lin y Beal, 2006) para las cuales aún no existen estrategias terapéuticas eficaces.

Resveratrol

Debido a sus propiedades medicinales y su potencial uso terapéutico en humanos (Kamat y cols., 2008), los polifenoles – compuestos antioxidantes presentes en abundancia en la naturaleza - han tenido una importante atención durante los últimos años. Entre dichos polifenoles destaca el resveratrol, (3,4,5'-trihidroxistilbeno), con fórmula molecular de $C_{14}H_{12}O_3$, y peso molecular de 228,25 Daltons (Lekli y cols., 2009). Resveratrol es una fitoalexina que se encuentran en una amplia variedad de fuentes alimenticias incluidas las uvas, ciruelas y maní. También está presente en los vinos, estando en mayor concentración en los tintos y en menor en los blancos. La síntesis de este compuesto, se produce en respuesta a factores de estrés ambiental (privación del agua, la radiación UV, y especialmente, la infección por hongos) que tienen las plantas, por lo que su producción puede ser considerada como mecanismo de defensa (Fremont, 2000).

Esta fitoalexina es un compuesto fenólico del grupo de los estilbenos, existe en las formas de isómeros *cis* y *trans* y es biosintetizada por la enzima estilbeno sintasa, mediante una reacción de condensación de una molécula de p-cumaril-CoA con tres moléculas malonil-CoA (Lekli y cols., 2009) (Fig. 2). El isómero *trans*-resveratrol (*tRV*) está disponible comercialmente y es relativamente estable, si está protegido de la luz y pH alcalinos (Pervaiz, 2001). Presenta buena absorción cuando se administra por vía oral, su biodisponibilidad es baja en plasma y tejidos, debido a que es metabolizado en el hígado por el citocromo P450 (CYP 1B1), sufriendo una reacción de fase II (conjugación) en los que se obtienen metabolitos glucorónicos y sulfatos que son eliminados por vía renal (Patel y cols., 2011). Cuando es administrado por vía oral se alcanza un

pico de concentración a los 30 minutos y presenta un tiempo de vida media de aproximadamente 9 horas (Baur y Sinclair, 2006). El *t*RV presenta una variedad de propiedades entre las que se encuentran:

Propiedades antiinflamatorias: tanto *in vitro* como *in vivo* exhibe su actividad a través de diferentes vías como la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores pro-inflamatorios, modificaciones en la síntesis de los eicosanoides, liberación de algunas células inmunes activadas, inhibición de enzimas como la ciclooxigenasa 1 (COX-1) o la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y reducción de la producción de prostaglandina E2. Además ha demostrado una supresión significativa de interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 (De la Lastra y Villegas, 2005).

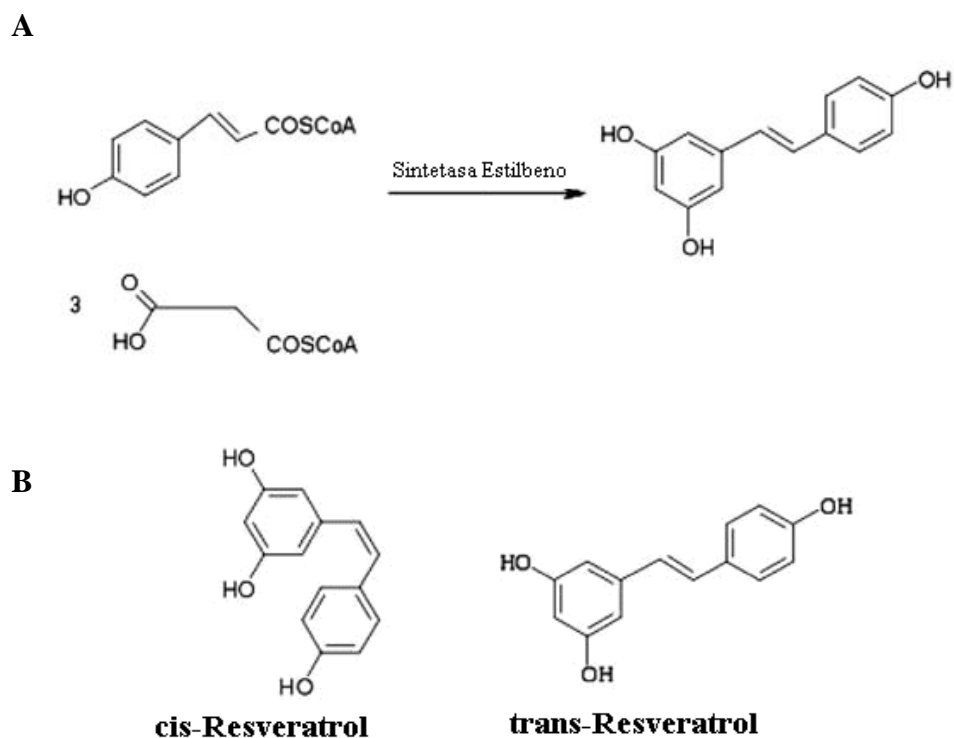


Figura 2. **A)** Síntesis de resveratrol a partir de una molécula de p-cumaril-CoA con tres moléculas malonil-CoA. **B)** Estructura química de *cis* y *trans*-resveratrol (Lekli y cols., 2009).

Propiedades cardioprotectoras: Interfiere en la vasodilatación de los vasos sanguíneos, pues aumenta la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) en las células del endotelio vascular (enzima responsable de sintetizar óxido nítrico) (Das y Maulik, 2006) y disminuye la expresión de endotelina, potente vasoconstrictor; inhibe la agregación plaquetaria, ya que impide la adhesión de plaquetas al colágeno tipo I, y además reduce la agregación inducida por trombina y adenosina difosfato (Wang y cols., 2002; Olan y Wachowicz, 2005). Protege a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la peroxidación debido a su actividad antioxidante, y posee efectos beneficiosos contra la lesión por isquemia-reperfusión (Das y Das, 2010).

Propiedades anticancerígenas: Se ha encontrado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* que el *tRV* tiene efectos antitumorales, ya que inhibe la iniciación, promoción y progresión de varios tipos de cáncer. Los mecanismos moleculares asociados a los efectos anti-proliferativos implican la detención del ciclo celular en las etapas G1 y S, activación de p53 y la supresión del activador de la proteína-1 (AP-1) y del factor nuclear-kB (NF-kB) (Cal y cols., 2003; Shukla y Singh, 2011). Por consiguiente el *tRV* puede prevenir y/o retardar la progresión de una amplia variedad de enfermedades degenerativas (Prahars y Jagruti, 2010).

Propiedades neuroprotectoras del resveratrol

Diversos estudios han demostrado que *tRV* tiene además efectos neuroprotectores, siendo capaz de atenuar significativamente la muerte celular inducida por el β A de una manera dependiente de la concentración en células de hipocampo de ratas en cultivo (Han y cols., 2004) y de disminuir la citotoxicidad inducida por el β A en cultivos de células de feocromocitoma de ratas (PC12) (Jang y Surh, 2003).

Por otro lado se ha demostrado que una dieta rica en *tRV* es capaz de contrarrestar los efectos tóxicos de la neurotoxina MPTP; utilizada para inducir en un modelo animal la enfermedad

de Parkinson; observándose que la administración diaria de *t*RV protege a las neuronas del insulto producido por el MPTP en ratones machos (Blanchet y cols., 2008).

En relación al mecanismo de acción por el cual actuaría el *t*RV, este aún no ha sido totalmente dilucidado, sin embargo, la neuroprotección por *t*RV hasta ahora se atribuye principalmente a sus propiedades antioxidantes intrínsecas. *t*RV modula la actividad de una serie de proteínas, incluyendo la activación de Sirtuin 1 - dinucleótido de nicotinamida adenosina (NAD)-dependiente deacetilasa, eliminando grupos acetilos de numerosas proteínas, por lo cual participa en una amplia gama de funciones fisiológicas, incluyendo el control de la expresión genética, el metabolismo y el envejecimiento; además *t*RV está implicado en múltiples respuestas biológicas relacionadas con la homeostasis energética, regulación térmica y el metabolismo de la glucosa (Markus y Morris, 2008; Pallas y cols., 2009; Rahman y Islam, 2011, Szkudelski y Szkudelska, 2011).

Existen antecedentes que demuestran que *t*RV es capaz de inhibir la Proteína-Tirosina-Kinasa, inhibiendo la activación de los CCDV tipo-L, así como su recuperación, en miocitos de ventrículo de rata; en este sentido, resulta de interés observar la acción inhibitoria de *t*RV sobre las corrientes de Na^+ (I_{Na}), K^+ (I_{K}) y I_{Ca} en miocitos cardíacos, cuyo efecto podría explicar, en parte, la acción antiarrítmica de este compuesto (Chen y cols., 2007).

Por otra parte, en experimentos electrofisiológicos realizados en rebanadas de hipocampo de rata, *t*RV inhibió la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo paraventricular ejerciendo una acción neuroprotectora frente al pre-tratamiento con L-glutamato, cuya acción aumenta significativamente las descargas espontáneas del tipo epileptiformes. Los autores han atribuido los efectos de *t*RV al bloqueo de CCDV tipo-L y a la subsecuente reducción de influjo de Ca^{2+} (Wang y cols., 2008).

Así también existen dos estudios que relacionan a *tRV* con la inhibición de la síntesis y secreción de catecolaminas, inducida por secretagogos, en células cromafines bovinas (CCB) y de ratas. El efecto inhibitorio de *tRV* se atribuye, en parte, al bloqueo de CCDV tipo-N en CCB y tipo-L en ratas (Shinohara y cols., 2007 ; Woo y cols.,2008).

Recientemente se evaluó los efectos de *tRV* sobre la liberación de catecolaminas en células cromafines bovinas. Utilizando técnicas amperométricas se observó que este compuesto causa una inhibición significativa de la liberación de catecolaminas. Mediante la técnica *patch-clamp*, configuración de célula entera, se observó que *tRV* a concentraciones nM no afectó las I_{Na} y I_{Ca} . Así también no tuvo un efecto en el incremento del Ca^{2+} citosólico producido por ACh o K^+ . Los autores proponen que el mecanismo por el cual actuaría *tRV* a bajas concentraciones, sería independiente de las etapas de la exocitosis dependiente de Ca^{2+} y podría ser mediada por un mecanismo asociado a óxido nítrico (Fernández y cols., 2010).

La célula cromafín bovina como modelo experimental.

La célula cromafín de la médula suprarrenal es una neurona postganglionar modificada, es decir, una paraneurona, de origen embriológico, estructura, función y metabolismo neuronal (Fujita, 1977). Por esta razón ha sido ampliamente utilizada como modelo experimental de neurosecreción. Deriva del ectodermo de la cresta neural (Huber y cols., 2009) y tiene por función la liberación de catecolaminas - adrenalina y noradrenalina – en situaciones de estrés (García y cols., 2006).

La célula cromafín obtenida de la medula adrenal de bovino ha sido ampliamente caracterizada. Los estudios electrofisiológicos y farmacológicos han demostrado que estas células son capaces de generar potenciales de acción y expresan CCDV del tipo- L, N, P/Q y R en una proporción de 20:30:50 (Bossu y cols., 1991; Fox y cols., 2008; García- Palomero y cols., 2001) que es muy similar a la célula cromafín humana cuya proporción es de 20:20:60 para los CCDV tipo-L, N y P/Q respectivamente (García y cols., 2006). Las CCB se obtienen de forma sencilla por

digestión enzimática, adoptando una morfología esférica en cultivo, lo que facilita la aplicación de técnicas biofísicas (Fenwick y cols., 1982; Garcia y cols., 2006). Entre estas técnicas destaca el *patch-clamp*, que en su configuración de célula entera permite fijar el potencial de membrana y, de este modo registrar las corrientes eléctricas generadas por el flujo de iones a través de los canales presentes en la membrana celular (Kornreich, 2007).

De acuerdo a los antecedentes planteados, resulta de especial relevancia, estudiar el efecto de *tRV* sobre los CCDV neuronales en un modelo de neurosecreción como la célula cromafín, contribuyendo a esclarecer los mecanismos que subyacen a los efectos neuroprotectores atribuidos a este compuesto.

HIPÓTESIS

Dado que, *tRV* ha demostrado efectos neuroprotectores mediados por la inhibición de las I_{Ca} tipo-L, entonces, es posible esperar que sea capaz de inhibir las I_{Ca} totales en células cromafines bovinas, debido a su acción sobre los CCDV tipo-L.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de *tRV* sobre los CCDV en células cromafines bovinas, mediante la técnica de *patch-clamp*.

Objetivos Específicos

1. Aislar la I_{Ca} total en CCB y evaluar el efecto de *tRV* sobre la amplitud máxima de corriente.
2. Aislar la I_{Ca} de tipo no-L utilizando herramientas farmacológicas y evaluar el efecto de *tRV* sobre la amplitud máxima de estas corrientes.
3. Evaluar el efecto de *tRV* sobre la relación intensidad de corriente *versus* voltaje (*I-V*).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Cultivo celular.

Colagenasa tipo I (Roche, Basilea, Suiza), penicilina (Laboratorio Chile, Santiago, Chile), gentamicina (Sanderson, Santiago, Chile), suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) (Gibco, Grand Island, NY, USA), Percoll (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut, USA), inhibidor tripsina, polilisina y BSA (SIGMA, St Louis, MO, USA). LOCKE: NaCl, KCl, NaHCO₃ y HEPES de Merck (Darmstadt, Alemania).

Soluciones para experimentos de *patch-clamp*

Extracelular: Krebs-Hepes (en mM): 145 NaCl; 5,6 KCl; 1,2 MgCl₂; 2 CaCl₂; 10 HEPES/NaOH; pH 7,4. Intracelular (en mM): 10 NaCl; 100 CsCl; 20 tetraetilamonio.Cl; 5 MgATP; 14 EGTA; 20 HEPES/CsOH; 0.3 Na.GTP; pH 7,2. Las sales fueron obtenidas de SIGMA (St Louis, MO, USA) y Merck (Darmstadt, Alemania).

Herramientas farmacológicas.

El nifedipino (SIGMA, St Louis, MO, USA) fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 10⁻² M, alicuotado y conservado a -20°C. La tetrodotoxina (TTX de RBI, One Strathmore Road, Natick, MA, USA) fue preparada en agua destilada desionizada estéril a una concentración de 10⁻³M, alicuotada y conservada a -20°C. Al inicio de cada día de experimentos, los fármacos y/o toxinas fueron diluidos en solución salina

(Krebs-Hepes) a la concentración deseada. La solución intracelular para *patch-clamp* se descongelaba en el día a partir de un *stock* conservado a -20°C .

Compuesto en estudio.

El *tRV* (Sigma, St Louis, MO, USA) fue disuelto en etanol (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 10^{-1} M, alicuotado y conservado a -20°C . La concentración final de etanol en los experimentos de *patch-clamp* no superó el 0.0001%.

MÉTODOS

Aislamiento y cultivo primario de células cromafines bovinas. Las células cromafines utilizadas en el presente estudio fueron gentilmente donadas por la Dra. Ana María Cárdenas del Centro de Neurociencias de Valparaíso y fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito por Moro y cols. (1990).

Las glándulas adrenales fueron obtenidas de un matadero local y mantenidas a 4°C en medio LOCKE/GLUCOSA (mM: 154 NaCl, 5,6 KCl, 3,6 NaHCO_3 , 10 Hepes; 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ gentamicina a pH 7,4.) hasta su traslado al laboratorio. Tras retirar la grasa externa, las glándulas fueron perfundidas 2 veces por la vena adrenal con solución LOCKE/ GLUCOSA. Posteriormente, fueron perfundidas con 0,25% de colagenasa y 0,01% de inhibidor de tripsina en solución LOCKE/ GLUCOSA conteniendo 0,5% de albúmina de suero bovino de manera tal de permitir la digestión del tejido conectivo que une la médula y la corteza adrenal. El proceso se repitió 2 veces por 20 minutos cada vez. Durante la digestión de la médula adrenal las glándulas fueron mantenidas a 37°C y 5% CO_2 fue disgregado con la ayuda de tijeras y filtrado por malla. La suspensión de células resultante fue centrifugada a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos a una

temperatura de 20°C. El precipitado fue lavado con solución LOCKE y posteriormente sometido a un gradiente de Percoll por centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos, produciéndose la separación en fases de células cromafines, células endoteliales, eritrocitos y otras células presentes en la suspensión. La fracción intermedia resultante del gradiente (correspondiente a las células cromafines) fue resuspendida en una solución LOCKE/GLUCOSA/BSA y centrifugada 2 veces a 1.000 r.p.m. a 20°C durante 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en medio de cultivo DMEM/F-12 (1:1) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 50 IU/mL penicilina y 100 µg/mL gentamicina y filtrado por última vez por malla.

Para el registro de las corrientes iónicas (experimentos de *patch-clamp*) las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 8 mm de diámetro; previamente tratados con polilisina para facilitar la adhesión de las células; a una densidad de 5×10^4 células/cubreobjeto. Las células fueron mantenidas de dos a seis días a 37°C en un incubador con atmósfera saturada en agua y 5% de CO₂. En los experimentos se utilizó células de 2 a 4 días de cultivo.

Registros electrofisiológicos. Las I_{Ca} fueron registradas mediante la técnica de *patch-clamp*, modo fijación de voltaje (*voltage-clamp*), configuración de célula entera (Hamill y cols., 1981). La técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño trozo (o parche) de membrana de la célula con ayuda de un amplificador; de este modo, si en respuesta a un determinado estímulo, se produce alguna corriente de entrada o de salida de iones a través de los canales y/o receptores presentes en dicho parche de membrana, la medición de la corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el potencial de membrana será equivalente al flujo de iones que se ha producido a través del parche de membrana de la célula.

Esta técnica emplea un único electrodo que permite el registro simultáneo de voltaje (para mantenerlo fijo en el parche de membrana) y de corriente (la inyectada para mantener fijo el potencial de membrana). El electrodo de registro es de plata (Ag) recubierta de Ag/AgCl; estos

iones son los que se utilizarán para estabilizar y fijar el potencial de membrana. Entre las principales ventajas de esta técnica se encuentran el poder ser aplicada a células pequeñas, y presentar una buena relación señal-ruido, permitiendo el registro de I del orden de picoamperios (pA).

El primer paso para ejecutar esta técnica es formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una pipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$. La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, con lo que se forma un sello eléctrico de alta resistencia (de unos $50\ \text{M}\Omega$) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente. Si la punta de la pipeta mantiene limpia su superficie, la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de $10\text{-}100\ \text{G}\Omega$, conocidos como *giga-sellos*, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, por lo que se puede fijar el potencial del parche de membrana. Se adquiere así la configuración de célula adherida (o *cell attached*). La configuración de célula entera se obtiene a partir de la de célula adherida, cuando la aplicación de una succión o presión negativa adicional al interior de la pipeta consigue romper el parche de membrana que hay bajo los bordes de la misma, con lo que todo el interior de la pipeta entra en contacto eléctrico con todo el interior de la célula y se pueden registrar las corrientes que fluyen a través de los canales y/o receptores abiertos en la totalidad de la membrana celular (Fig.3). Es la configuración más sencilla de obtener y permite el control de la composición intracelular ya que tras la ruptura del parche la solución intracelular se equilibra con la solución del interior de la pipeta (Álvarez, 2007).

Medición de I_{Ca} totales en la configuración de célula entera, modo fijación de voltaje.

El cubreobjeto con las células adheridas en su superficie, fue colocado en una cámara de experimentación de metacrilato y ésta, a su vez, sobre la platina de un microscopio invertido (Zeiss Axiovert 100). Las células fueron continuamente perfundidas con solución Krebs. En los experimentos de registro de corrientes se utilizó 10 mM de Ba^{2+} en lugar de 2 mM Ca^{2+} como ión transportador de carga ya que permite registrar corrientes de mayor amplitud y evidenciar la acción inhibitoria sobre las corrientes.

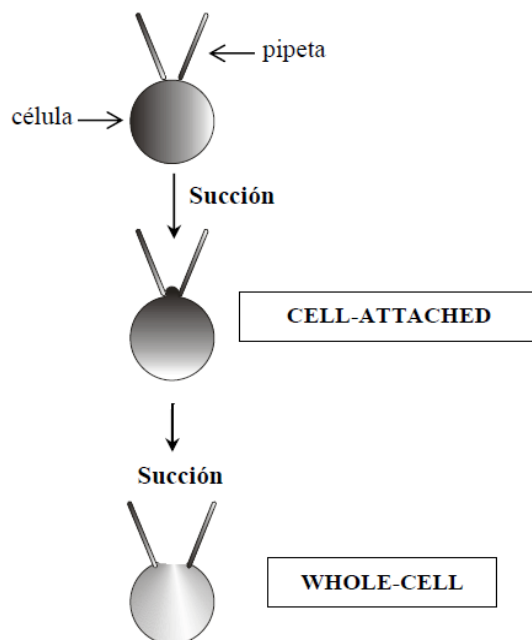


Figura 3. Técnica de *patch-clamp*. La figura muestra la configuración de célula entera (*whole-cell*).

La aplicación aguda de soluciones se realizó mediante un sistema de válvulas con solenoide miniatura excluyente, operado manualmente (Max Planck Institute, Dortmund, MPI-DO, Alemania) y acopladas a una pipeta de perfusión de múltiples vías con una punta de salida común que se posicionó a menos de 100 μm de la célula en experimentación. 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 1 s. Las pipetas de *patch* se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato (GB 150-8P, Science Products, diámetros 0.86-1.5 x 80 mm) con ayuda de un estirador vertical (MPI-DO), aplicando calor en dos pasos sucesivos. La punta de las pipetas se pulió al calor de una resistencia en una microforja (Luigs & Neuman, Ratingen, Germany), hasta que su diámetro interior fue de aproximadamente 1 μm ; una vez llenadas las pipetas con solución intracelular tuvieron una resistencia entre 3-4 $\text{M}\Omega$.

Los registros electrofisiológicos fueron realizados conectando los electrodos al preamplificador de un amplificador de *patch-clamp* EPC-7 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) con una interfase ITC-16 AD/DA integrada. Para la adquisición de datos se utilizó el programa informático PULSE (también de HEKA) y un computador McIntosh. El análisis de los datos se realizó con el programa OriginPro 7.0 (OriginLab), al que se exportaron los datos procedentes de Pulse con ayuda del programa Origin DataAccess 7.0 (Bruyton & OriginLab Corporation, Massachusetts, USA).

El potencial de membrana de las células se fijó a -80 mV (potencial de fijación o *holding potential*, HP) y para el registro de las corrientes a través de los CCDV se aplicaron pulsos despolarizantes cuadrados desde el potencial de fijación, de intensidad, duración y a intervalos que se especifican en cada experimento. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como el promedio de la amplitud de la $I_{Ca} \pm$ error estándar (SE), con “*n*” indicando el número de células ensayadas, de diferentes cubreobjetos y procedentes de a lo menos tres cultivos distintos. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante la prueba *t* de

Student. Como criterio indicador de diferencia estadística significativa se consideró un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Aislamiento de I_{Ca} total y efecto de tRV sobre la amplitud máxima de I

Los primeros experimentos realizados tuvieron como objetivo aislar y registrar las I_{Ca} mediante la técnica de *patch-clamp*, modo fijación de voltaje, en configuración célula entera. Para ello fue necesario bloquear los demás canales iónicos dependientes de voltaje que están presente en la membrana plasmática de las CCB, es decir, canales de Na^+ y canales de K^+ , evitando así el solapamiento de las I_{Ca} . Para el bloqueo de las corrientes de Na^+ (I_{Na+}) se utilizó TTX (10 μ M) en la solución extracelular, siendo aplicado de forma aguda sobre la célula, durante el registro de corrientes. Las corrientes de K^+ (I_{K+}) fueron bloqueadas utilizando TEA y Cs^+ en la solución intracelular.

Para conocer el perfil de la relación I - V se aplicó un protocolo consistente en pulsos despolarizantes cuadrados sucesivos con incrementos de 10 mV, desde un HP de -80 mV a potenciales entre -50 mV y +60 mV, de 50 ms de duración a intervalos de 10 s. Este protocolo permitió identificar la corriente registrada como corriente de entrada de Ca^{2+} , con un umbral de activación de -40 mV y una amplitud máxima de corriente de $180 \pm 36,4$ pA a 0 mV (n=2) (Fig. 4). Con el objeto de aumentar la amplitud de la corriente observada y de este modo poder evidenciar con una mejor resolución la acción del compuesto estudiado sobre las corrientes, se reemplazó Ca^{2+} por Ba^{2+} en la solución extracelular, como ion de carga. El Ba^{2+} permite registrar corrientes de mayor magnitud debido a que fluye a través de los CCDV, igual que el Ca^{2+} , pero es menos retenido que este último (Hess y cols., 1986). La Figura 4 muestra el perfil de la relación I - V obtenida tras la aplicación del protocolo previamente descrito a 4 células diferentes en condiciones de 10 mM de Ba^{2+} extracelular. La I_{Ba} registrada tuvo un umbral de activación cercano a los -40 mVm con una amplitud máxima promedio de $442 \pm 80,8$ pA a 10 mV y un potencial de reversión a + 60 mV.

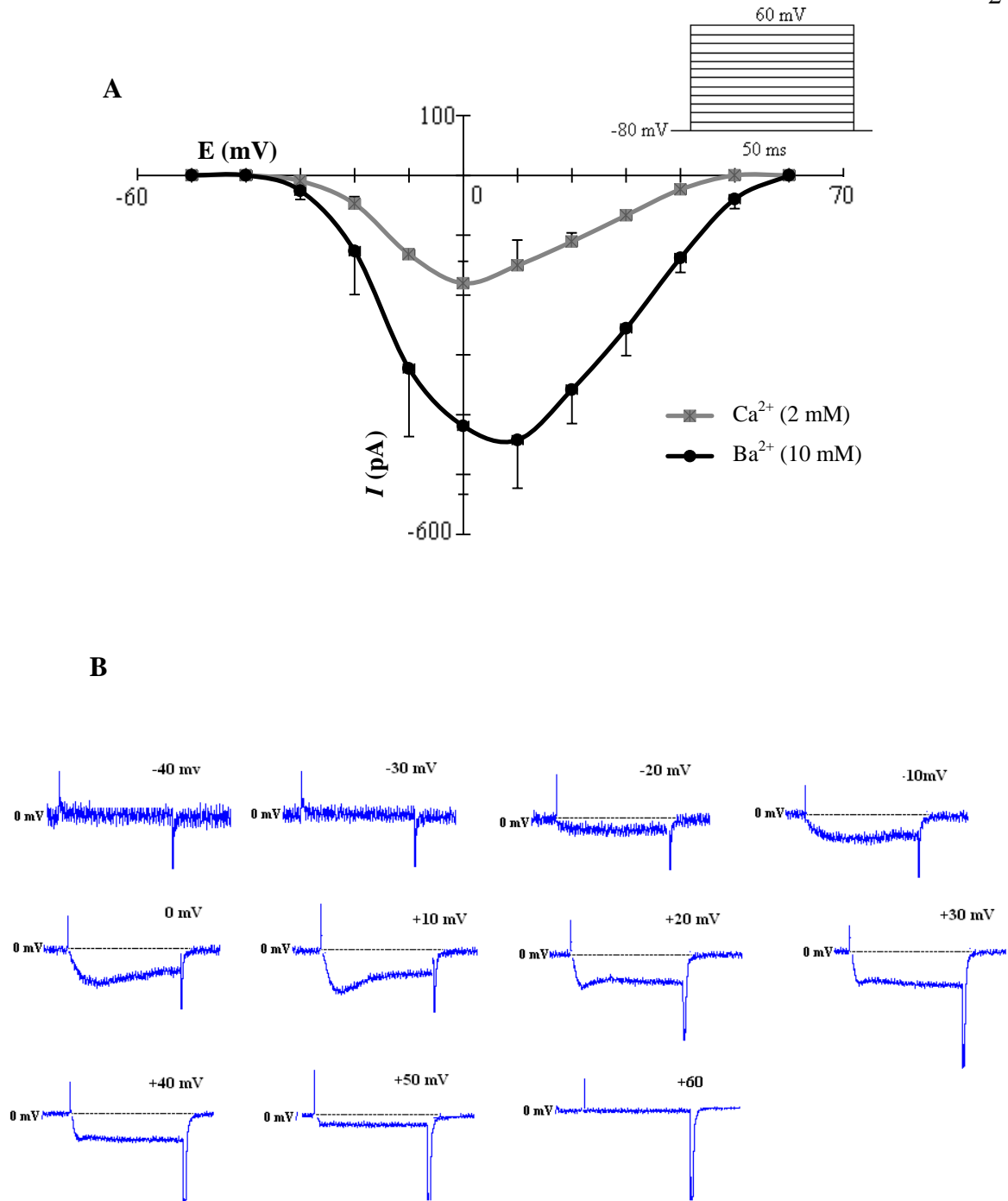


Figura 4. Corrientes totales de Ca^{2+} y Ba^{2+} en CCB. (A) La gráfica muestra la relación intensidad de corriente en función del potencial (E) de prueba (Curva I - V). Los experimentos fueron realizados en CCB utilizando la técnica de *patch-clamp*, configuración de célula entera, modo fijación de voltaje. A cada célula se le aplicó un tren de pulsos despolarizantes cuadrados de 50 ms de duración desde un potencial de mantención de -80 mV (HP) entre -50 y +60 mV y a una frecuencia de 0,1Hz (inserto) en presencia de 2 mM de Ca^{2+} (2 células) o 10 mM de Ba^{2+} (4 células) en la solución extracelular. Se utilizó TTX (10 μ M) en la solución extracelular para inhibir la I_{Na^+} y TEA-CS en la solución intracelular para inhibir la I_{K^+} . (B) Trazos originales de corriente obtenidos en una sola célula tras aplicar el protocolo antes descrito en presencia de 10 mM de Ba^{2+} como ión de carga.

Para determinar la estabilidad de la I_{Ba} en el tiempo y poder representar la relación de intensidad de corriente versus tiempo, se aplicó un pulso despolarizante cuadrado de 50 ms de duración a intervalos de 10 s, desde un HP de -80 mV hasta el potencial de máxima corriente (pulso control), determinado previamente por el protocolo $I-V$. Este protocolo control fue aplicado a seis células durante 4 min (Fig. 5).

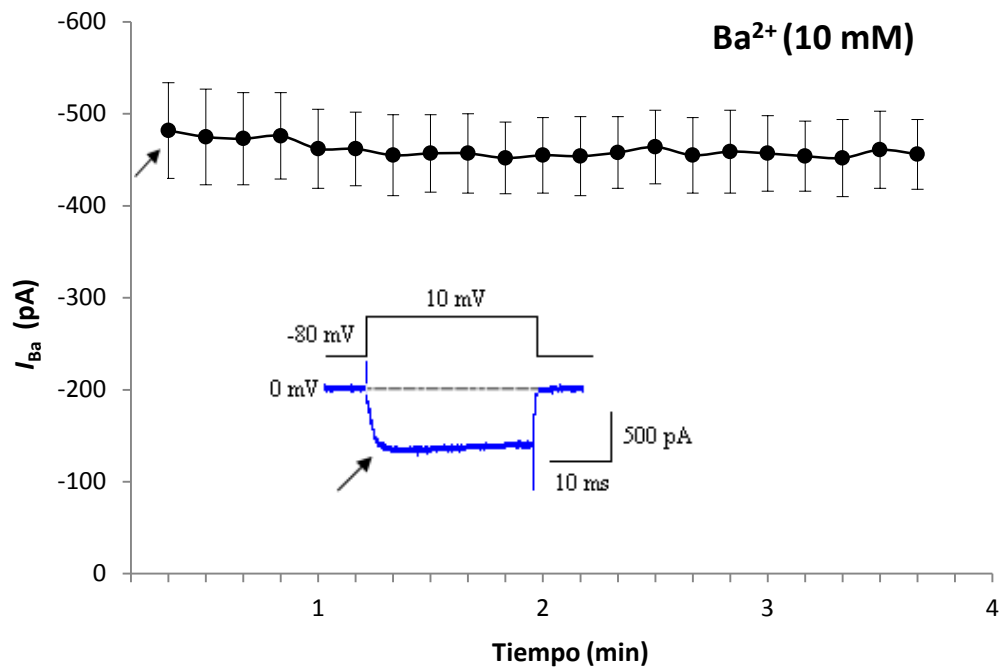


Figura 5. Curso temporal de las I_{Ba} en CCB. Curso temporal de la I_{Ba} registrada en 6 células (promedio S.E.) y registro de un trazo original (inserto) representativo de la I_{Ba} control inducida en una célula por un pulso despolarizante cuadrado desde un HP de -80 mV a 10 mV en presencia de 10 mM de Ba^{2+} extracelular. El curso temporal fue construido graficando el peak de la I_{Ba} inducida en cada pulso en función del tiempo ($n=6$). Las flechas indica el punto de máxima amplitud de corriente (peak o pico) que se consideró para construir el curso temporal.

Una vez estandarizadas las condiciones de registro y evidenciada la estabilidad de la I_{Ba} en el tiempo, se evaluó el efecto de tRV sobre los CCDV. Para ello, se realizaron registros de corriente en la configuración de célula entera, modo fijación de voltaje, aplicando entre 4 a 7 pulsos

despolarizantes desde -80 mV a 10 mV, durante 50 ms cada 10 segundos, correspondientes a la corriente control. Tras conseguir la estabilización de la I_{Ba} se aplicó *tRV* el de forma aguda a una concentración de 10 μ M durante aproximadamente 1 min para luego efectuar su lavado. En la Figura 6 se observa el efecto de bloqueo del peak de la I_{Ba} por *tRV*. El compuesto produjo un bloqueo parcialmente reversible de la I_{Ba} . Este bloqueo se expresa como porcentaje de inhibición y se calculó como la diferencia entre la media de la respuesta máxima, control 100%, y la respuesta media de los pulsos durante la aplicación, es así como *tRV* indujo un bloqueo de un $19,7 \pm 7,8 \%$ ($p=0.07$, $n=6$).

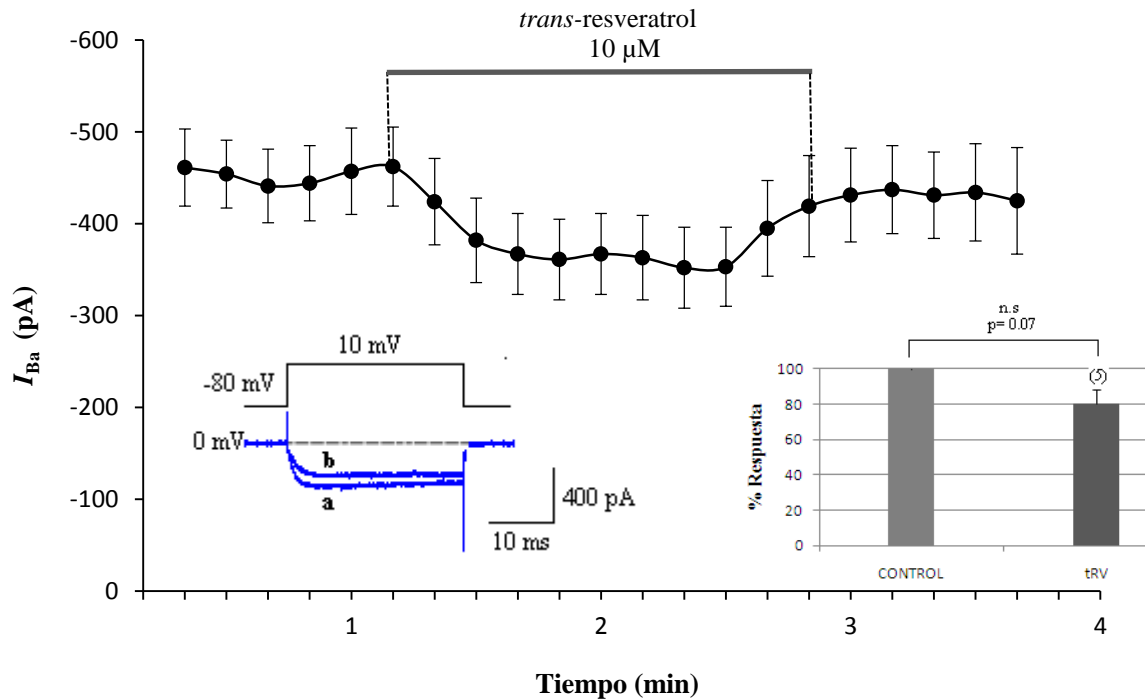


Figura 6. Inhibición de la I_{Ba} por *trans-resveratrol* en CCB. Curso temporal de la I_{Ba} registrada en 6 células (promedio S.E.) y registro de un trazo original (inserto) representativo de la I_{Ba} inducida en una célula mediante la aplicación de un pulso despolarizante cuadrado de 50 ms de duración desde un HP de -80 mV a 10 mV en intervalos de 10 s. La I_{Ba} control (a) fue inhibida tras la aplicación de *tRV* (b) y parcialmente reversible tras el lavado. La gráfica de barras resume los resultados obtenidos. Los datos están expresados como porcentaje de respuesta \pm S.E. (n.s. no significativo).

Aislamiento de I_{Ca} no-L y evaluación del efecto de tRV sobre la amplitud máxima de corriente.

Para aislar las I_{Ca} de tipo no-L se utilizó nifedipino ($10 \mu\text{M}$), antagonista selectivo de los CCDV tipo-L, el cual se aplicó de forma aguda sobre la célula, luego de alcanzar la estabilización del registro de las corrientes totales (I_{Ba}). A continuación, para evaluar el efecto de tRV ($10 \mu\text{M}$) sobre los CCDV no-L, este fue aplicado de forma aguda sobre la misma célula durante el registro de I_{Ba} en presencia de nifedipino, para posteriormente realizar un lavado. La Figura 7 muestra el resultado obtenido en una célula representativa de 4 ensayos. En ella se observó una inhibición parcial de la I_{Ba} total inducida por nifedipino ($19,6 \pm 3,9 \%$, $p=0.01$, $n=4$) y el bloqueo parcialmente reversible inducido por tRV sobre las corrientes de tipo no-L ($5,2 \pm 4,1 \%$, $p=0.27$, $n=4$). El porcentaje de inhibición fue calculado de igual forma que en las corrientes totales.

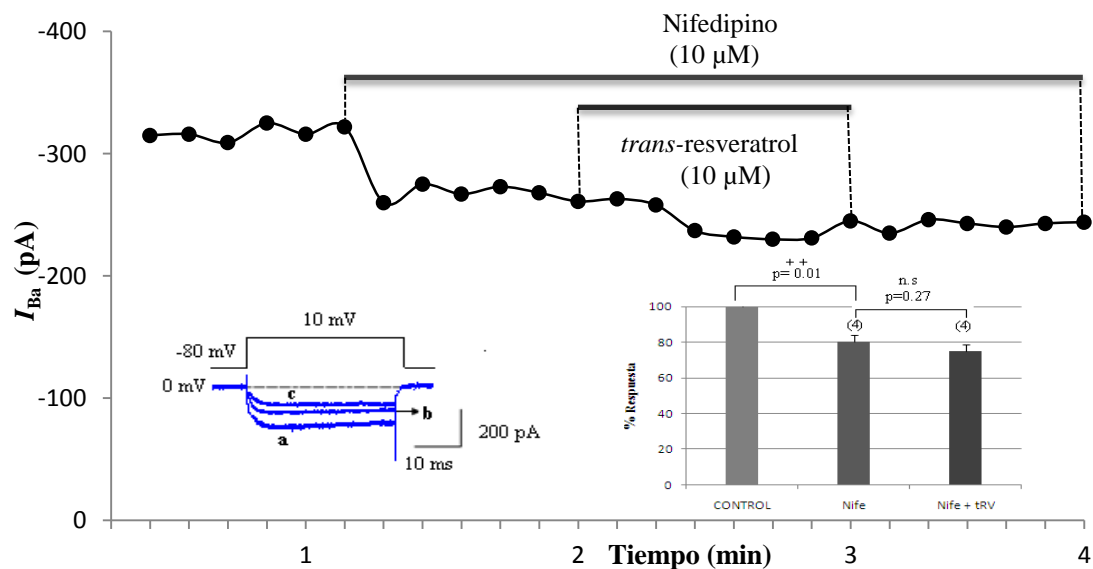


Figura 7. Efecto trans-Resveratrol sobre los CCDV no-L en CCB. Curso temporal y registro original de la I_{Ba} (inserto) obtenida en una célula representativa de 4 ensayos tras la aplicación de pulsos despolarizantes a 10 mV durante 50 ms a intervalos de 10 s desde un potencial de fijación de -80 mV. La célula fue perfundida con nifedipino ($10 \mu\text{M}$) (b) y posteriormente con una mezcla de nifedipino y el compuesto ($10 \mu\text{M}$) (c). tRV indujo un bloqueo adicional del pico de la I_{Ba} , parcialmente reversible tras el lavado. La gráfica de barras resume los resultados obtenidos. Los datos están expresados como porcentaje de respuesta \pm S.E. (n.s. no significativo).

Efecto de *t*RV sobre la relación intensidad de corriente *versus* voltaje (*I-V*).

Para descartar que el bloqueo del compuesto fuese debido a una modificación del perfil de la relación *I-V*, se aplicó *t*RV (10 μ M) de forma aguda sobre la célula durante la aplicación de un protocolo de pulsos despolarizantes de intensidad creciente desde -50 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -80 mV, con una duración de 50 ms cada pulso, a intervalos de 10s. Este protocolo se aplicó en ausencia (control) y en presencia de *t*RV. El valor del pico de corriente obtenida fue representado respecto de cada uno de los 12 pulso (-50 a +60 mV) correspondiente, obteniéndose así la relación *I-V*. La Figura 8 muestra que *t*RV produjo una inhibición de la I_{Ba} en las corrientes totales, alcanzando un $20,3 \pm 8,02$ % (n=5), sin alterar el perfil de la relación *I-V* control, ni el potencial de máxima amplitud (10 mV). Además, puede observarse que el bloqueo se produjo principalmente a potenciales mayores a -10 mV.

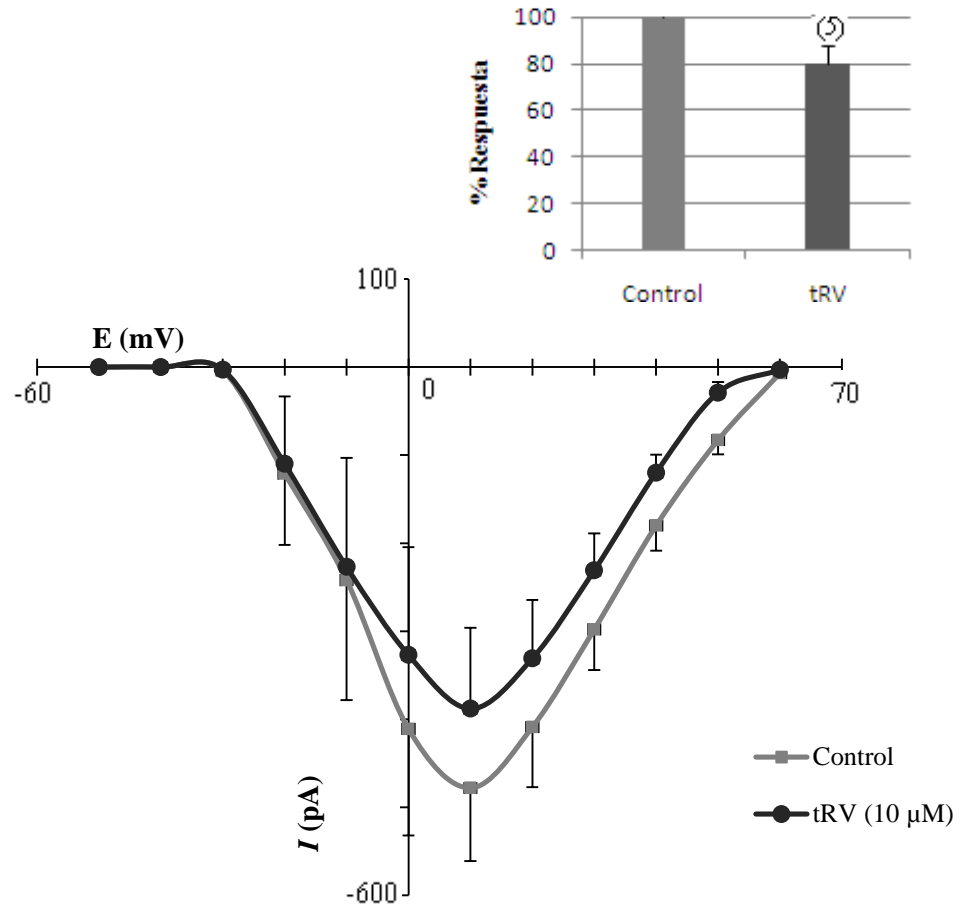


Figura 8. Efecto *Trans*-resveratrol sobre la relación I - V en CCB. La corriente fue inducida aplicando un protocolo de pulsos despolarizantes sucesivos a intensidad creciente de -50 a +60 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -80 mV. La grafica fue construida a partir de los valores de I_{Ba} máxima obtenida a los respectivos potenciales. El protocolo fue aplicado a las células en ausencia (control) y en presencia de tRV (10 μ M). La gráfica de barras resume los resultados obtenidos. Los datos están expresados como porcentaje de respuesta \pm S.E.

DISCUSIÓN

El primer punto a discutir es el uso de Ba^{2+} en reemplazo de Ca^{2+} como ion transportador de carga. Se utilizó Ba^{2+} dado que los CCDV presentan una menor afinidad a este catión, con lo cual su permeabilidad relativa a Ca^{2+} significativamente mayor (Hess y cols., 1986; Sather y McCleskey, 2003). Además, la acumulación de Ba^{2+} en el citosol inactiva de manera menos eficiente los CCDV que el Ca^{2+} (Hess y Tsien, 1984). Estos fenómenos permiten en la práctica visualizar corrientes de mayor tamaño al utilizar Ba^{2+} . Se ha descrito que el Ba^{2+} a concentraciones mayores a 2 mM puede alterar la unión del ligando a su canal (Albillos y cols., 1996) de manera que es probable que el efecto de *tRV* sea mayor cuando el ion de carga es Ca^{2+} .

Un segundo punto a considerar se refiere a la configuración utilizada en la técnica de *patch-clamp*, es decir la configuración célula entera (*whole-cell*), la cual muestra algunos inconvenientes, tal como la inhibición progresiva de la actividad del canal, lo que se visualiza como una disminución de la *corriente* con el tiempo, lo que en términos electrofisiológicos se denomina *run-down*. Este fenómeno se origina debido a que algunos componentes intracelulares, fundamentales para la activación de los CCDV, se pierden con el tiempo, diluidos por el líquido contenido en la pipeta de vidrio (Latorre y cols., 1996). El único método descrito hasta ahora que preserva el medio intracelular es la técnica de *patch-clamp* en configuración de parche perforado. En esta configuración el contacto eléctrico entre el medio intracelular y el contenido de la pipeta se establece por la formación de poros en la porción de membrana donde se forma el sello. Los poros se forman gracias a la inclusión de un ionóforo (nistatina, anfotericina B, gramicidina, etc.) en la solución de la pipeta (Akaike y Harata, 1994). Para evitar el fenómeno *run-down*, en nuestros experimentos se utilizó 14 mM EGTA y se reemplazó Ca^{2+} por Ba^{2+} en la solución intracelular. Bajo estas condiciones experimentales, el bloqueo de la I_{Ba} total inducido por *tRV*, a una

concentración de 10 μM ($19,7 \pm 7,8\%$; $p=0,07$), estuvo muy cercana a ser estadísticamente significativa.

Durante el transcurso de desarrollo de esta tesis, se publicó el único estudio que evalúa el efecto directo de *tRV* sobre CCDV en CCB, realizado por Fernández y cols. (2010). El trabajo indica que, tanto a concentraciones nanomolares como micromolares de *tRV*, no se ven afectados las CCDV, siendo capaz, a bajas concentraciones, de bloquear la liberación cuantal de catecolaminas inducida por ACh o alto K^+ . De acuerdo a estos autores, el mecanismo por el cual actuaría *tRV* a bajas concentraciones, sería independiente de las etapas de la exocitosis dependiente de Ca^{2+} y podría ser mediada por un mecanismo asociado a óxido nítrico. La única diferencia experimental entre el trabajo de Fernández y cols. (2010) y el presente trabajo es que ellos utilizaron 10 mM de Ca^{2+} como ión de carga. Sin embargo, esta diferencia no permite explicar la discrepancia en los resultados obtenidos, por lo cual es importante realizar experimentos adicionales que incluyan la construcción de curva concentración-respuesta de *tRV* y la determinación de la IC_{50} , en condiciones de 10 mM de Ba^{2+} y 10 mM de Ca^{2+} . Resulta relevante considerar que después de la administración por vía oral, los niveles plasmáticos de *tRV* se encuentran en el rango nanomolar, debido a que es rápidamente metabolizado en el hígado por el citocromo P450 (CYP 1B1) (Patell y cols., 2011).

Es importante considerar que si bien, *tRV* es un compuesto altamente fotosensible, es estable durante meses cuando se protege adecuadamente de la luz. En este estudio *tRV* fue preparado, conservado y utilizado protegido de la luz. Puesto que *tRV* se degrada y oxida al adicionarlo al medio de cultivo, pero es estable en solución Locke que contiene HEPES (Yang y cols., 2010), en este trabajo se utilizó soluciones que incluyeron HEPES. Otro factor que puede afectar la estabilidad de *tRV* es el pH, ya que es más inestable a pH alcalino (Pervaiz, 2001). La solución extracelular (Krebs-HEPES) en la que fue preparado *tRV* tenía un pH 7,4.

En todos los experimentos realizados, la inhibición inducida por *tRV* fue parcialmente revertida tras el lavado (10 min). Esta situación puede ser atribuida a sus características altamente lipofílicas, lo que le permite acumularse en la membrana plasmática, al igual que otros antioxidantes (Brittes y cols., 2010).

Tras estudiar el efecto de *tRV* sobre la amplitud máxima de la I_{Ba} total, se investigó cuál de los CCDV presentes en las CCB estaba implicado en el efecto inhibitorio observado. Las CCB presentan una proporción de CCDV muy cercana a la del humano, siendo esta una de las principales ventajas en su uso como modelo experimental. Además los CCDV pueden ser fácilmente disectados utilizando herramientas farmacológicas selectivas para cada uno de ellos. En este trabajo se utilizó nifedipino (una dihidropiridina) inhibidor selectivo de CCDV tipo-L. De este modo se aisló las corrientes de tipo no-L, que constituyen el 80% de la I_{Ca} total en CCB.

La aplicación aguda de nifedipino (10 μ M) sobre la célula durante el registro, produjo una inhibición significativa del peak de la I_{Ba} ($19,6 \pm 3,9$; $p=0,01$; $n=4$), reproduciendo los efectos previamente descritos en este modelo que indican una proporción de CCDV tipo-L del 20% en CCB (García y cols., 2006).

Tras la aplicación de *tRV*, en presencia de nifedipino, se produjo un bloqueo adicional no significativo ($5,2 \pm 4,1$; $p=0,27$; $n=4$) sobre CCDV de tipo no-L. Si estudios adicionales confirman este efecto, ello permitiría atribuir una acción bloqueadora de *tRV* sobre CCDV tipo-L en CCB, lo cual coincidiría con diversos estudios electrofisiológicos en células tales como miocito de ventrículo de rata (Chen y cols., 2007; Chen y cols., 2008), miocitos vasculares (Campos y cols., 2007) y línea de células beta INS-1E (Jakab y cols., 2008). En todos estos estudios *tRV* fue ensayado a concentraciones en el orden micromolar.

Para intentar explicar el posible efecto inhibitorio de *tRV* sobre CCDV observado en este estudio, es importante señalar que, la estructura química de *tRV* (estilbeno) es similar a la del

estrógeno sintético dietilestilbestrol, que ha demostrado (mediante la técnica de *patch-clamp*), inhibir la I_{Ca} tipo-L en las células A7r5 de músculo liso vascular (MLV) (Nakajima y cols., 1995).

Otros estudios sugieren que los estrógenos alteran el flujo de Ca^{2+} en el MLV a través de la modulación de CCDV; se ha observado que los estrógenos tienen la capacidad de inhibir la contracción inducida por Bay K8644 (un activador de CCDV) en arteria coronaria de cobayo (Jiang y cols., 1992). Así mismo, el 17 β -estradiol ha mostrado tener un efecto inhibitorio directo sobre los CCDV en la línea celular A7r5 (Zhang y cols., 1994), además de inhibir las corrientes de CCDV tipo-N y tipo-L en neuronas de ratas por mecanismo no genómicos (Lee y cols., 2002) y modificar la actividad eléctrica del miometrio de ratas preñadas, a través del bloqueo de CCDV (Okabe y cols., 1999).

En este sentido, existe un reconocimiento creciente respecto a que las hormonas esteroideas desempeñan un papel importante en la función normal del SNC, así como en la prevención de la muerte celular y enfermedades neurodegenerativas (Sur y cols., 2003; Numakawa y cols., 2007; McCarthy, 2009; Barha y Galea, 2010). Una posible explicación para el efecto neuroprotector mediado por estrógenos, es su capacidad para disminuir el incremento del Ca^{2+} citosólico después de la injuria producida por trauma, o por exposición a una sustancia tóxica (Sur y cols., 2003; Sribnick y cols., 2006). Esta citoprotección puede estar relacionada con el posible efecto inhibitorio de los estrógenos sobre CCDV tipo-L y tipo-N (Kim y cols., 2000; Kurata y cols., 2001; Chaban y cols., 2003; Sribnick y cols., 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que *tRV* inhibe los CCDV tipo-L en células cardíacas mediante inhibición de la PKC (Yi y cols., 2007). Los CCDV neuronales también pueden ser modulados por la fosforilación de proteínas quinasas, como por ejemplo PKC, la cual aumenta la actividad y sensibilidad del canal (Gardam y Magoski, 2009). Diversos estudios demuestran el efecto inhibitorio de *tRV* sobre la PKC asociada a cáncer (Stewart y cols., 1999; Días y cols., 2008).

Como ha sido mencionado, la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} constituye un elemento central en las enfermedades neurodegenerativas, principalmente en EA y EP. Diversos estudios clínicos han demostrado que pacientes tratados con antagonistas de CCDV (dihidropiridinas), tienen menor riesgo de padecer EP que los pacientes no tratados, por lo que se ha sugerido que estos fármacos se podrían utilizar como agentes preventivos y neuroprotectores frente a esta patología (Rodnitzky, 1999). Así mismo, observaciones experimentales apoyan la idea de inhibir los CCDV tipo-L y tipo-N, como estrategia farmacológica neuroprotectora (Lee y cols., 2004; Shahlaie y cols., 2010; Bagatini y cols., 2011; Anekonda y cols., 2011). Adicionalmente, existe evidencia que muestran que la peroxidación lipídica de la membrana celular provocada por ROS produce la apertura de los CCDV tipo-L (Waring, 2004).

Se concluye que los resultados de este trabajo sugieren que las propiedades neuroprotectoras atribuidas a *tRV* pueden ser explicadas, al menos parcialmente, a una acción inhibitoria sobre CCDV tipo-L; sería de gran interés continuar con este estudio para definir claramente el efecto de *tRV* sobre CCDV y de esta forma contribuir al esclarecimiento de uno de sus múltiples efectos a nivel celular.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir lo siguiente:

1. *t*RV (10 μ M), agregado en forma aguda en CCB, muestra una tendencia a disminuir la amplitud máxima de la I_{Ba} , siendo del orden de un 20%; tampoco se observó una modificación significativa del perfil de la curva *I-V*.
2. El porcentaje de inhibición de la I_{Ba} inducida por *t*RV (10 μ M) es similar a aquella inducida por nifedipino (10 μ M).
3. *t*RV (10 μ M) muestra una tendencia a disminuir la amplitud máxima de la I_{Ba} , en presencia de nifedipino (10 μ M), siendo del orden de un 5%.
4. Estos resultados sugieren que *t*RV puede bloquear los CCDV en CCB, más probablemente aquellos de tipo-L, sin embargo, esta afirmación requiere de estudios adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

Akaike N y Harata N. 1994 . Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. *Jpn J Physiol.*44(5):433-473.

Álvarez RM. 2007. Estudio de las propiedades de bloqueo de canales de calcio neuronales de compuestos orgánicos aislados de especies del *phylum Porífera*. Tesis para optar al grado de Doctor. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 2007.

Albillos A., García AG, Olivera B y Gandía L. 1996. Re-evaluation of the P/Q Ca^{2+} channel components of Ba^{2+} currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba^{2+} concentrations. *Pflugers Arch.*432: 1030-8.

Anekonda TS, Quinn JF, Harris C, Frahler K, Wadsworth TL y Woltjer RL.2011.L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 41:62-70.

Arikkath J y Campbell KP. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol.*13:298-307.

Arikkath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG y Campbell KP. 2003. Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem.* 278:1212-1219.

Bagatini PB, Saur L, Rodrigues MF, Bernardino GC, Paim MF, Coelho GP, Silva DV, de Oliveira RM, Schirmer H, Souto AA, Vianna MR y Xavier LL.2011. The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. *Invert Neurosci.* 11:43-51.

Barha CK y Galea LA. 2010. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta.*1800:1056-1067.

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

Blanchet J, Longpre F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G y Martinoli MG. 2008. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32:1243-1250.

Blomhoff R. 2004. Antioxidants and oxidative stress. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 124:1643- 1645.

Bossu JL, De Waard M y Feltz A. 1991. Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol*. 437:621-634.

Brittes J, Lucio M, Nunes C, Lima JL y Reis S. 2010. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chem Phys Lipids*. 163:747-754.

Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y y Bonavida B. 2003. Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 3(2): 77-93.

Campos-Toimil M, Elíes J, Álvarez, Verde I y Orallo F. 2007. Effects of trans- and cis-resveratrol on Ca²⁺ handling in A7r5 vascular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 577:91-99.

Catterall WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16:521-555.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP y Striessnig J. 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. 57:411-425.

Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K y Scheuer T. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. 49(2):124-141.

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.

Chaban VV, Mayer EA, Ennes HS y Micevych PE. 2003. Estradiol inhibits atp-induced intracellular calcium concentration increase in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience*. 118:941-948.

Chan CS, Gertler TS y Surmeier DJ. 2009. Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 32:249-256.

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

Chen YR, Yi FF, Li XY, Wang CY, Chen L, Yang XC, Su PX y Cai J.2008. Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 22:479-485.

Das M y Das DK. 2010. Resveratrol and cardiovascular health. *Mol Aspects Med*. 31: 503-512.

Das DK y Maulik N. 2006. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*. 6:36-47.

De la Lastra CA y Villegas I. 2005. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res*.49:405-30.

Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H y Tsien RW. 2003. Signaling from synapse tonucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 13:354-365.

Demuro A, Parker I y Stutzmann GE. 2010. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 285:12463-12468.

Dias PF, Berti FV, Siqueira JM Jr, Maraschin M, Gagliardi AR y Ribeiro-do-Valle RM. 2008. Trans-resveratrol inhibits early blood vessel formation (vasculogenesis) without impairment of embryonic growth. *J Pharmacol Sci*. 107:118-127.

Doering CJ y Zamponi GW. 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.

Doering CJ y Zamponi GW. 2005. Molecular pharmacology of non-L-type calcium channels. *Curr Pharm Des*.11:1887-1898.

- Dolphin AC. 2006. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl. 1:56-62.
- Elmslie KS. 2003. Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Bioenerg Biomembr.* 35:477-489.
- Elmslie KS. 2004. Calcium channel blockers in the treatment of disease. *J Neurosci Res.* 75:733-741.
- Emerit J, Edeas M y Bricaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 58:39-46.
- Evans RM y Zamponi GW. 2006. Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci.* 29:617-624.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M y Wehling M. 2000. Multiple Actions of Steroid Hormones-A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacol Rev.* 52(4):513-556.
- Fenwick EM, Marty A y Neher E. 1982. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol.* 331:577-597.
- Fernandez J, Yanez M, Orallo F, Cortes L, Gonzalez J, Hernandez J, Garcia A y de Diego A. 2010. Blockade by nanomolar resveratrol of quantal catecholamine release in chromaffin cells. *Mol Pharmacol.* 78(4): 734-744.
- Fox AP, Cahill AL, Currie KP, Grabner C, Harkins AB, Herring B, Hurley JH y Xie Z. 2008. N- and P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf).* 192:247-261.
- Fremont L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66: 663-673.
- Fujita T. 1977. Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn.* 40 Suppl:1-12.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM., Gandía L, Borges R y García-Sancho J. 2006 Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev.* 86:1093-1131.

García-Palomero E, Cuchillo-Ibáñez I, García A, Renart J, Albillos A y Montiel C. 2000. Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca^{2+} channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett.* 481: 235-239.

Gardam KE y Magoski NS. 2009. Regulation of cation channel voltage and Ca^{2+} dependence by multiple modulators. *J Neurophysiol.* 102:259-271.

Gribkoff VK. 2006. The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol.* 17:555-564.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cellfree membrane patches. *Pflugers Arch.* 391: 85-100.

Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG y Quirion R. 2004. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol.* 141:997-1005.

Hess P y Tsien RW. 1984. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature.* 309(5967):453-6.

Hess P, Lansman JB y Tsien RW. 1986. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J Gen Physiol.* 88(3):293-319.

Ho R, Ortiz D y Shea TB. 2001. Amyloid-beta promotes calcium influx and neurodegeneration via stimulation of L voltage-sensitive calcium channels rather than NMDA channels in cultured neurons. *J Alzheimers Dis.* 3:479-483.

Huber K, Kalcheim C y Unsicker K. 2009. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci.* 151:10-16.

Jakab M, Lach S, Bacová Z, Langelüddecke C, Strbák V, Schmidt S, Iglseider E, Paulmichl M, Geibel J y Ritter M. 2008. Resveratrol inhibits electrical activity and insulin release from insulinoma cells by block of voltage-gated Ca^{2+} channels and swelling-dependent Cl^- currents. *Cell Physiol Biochem.* 22:567-578.

- Jang JH y Surh YJ. 2003. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med.* 34:1100-1110.
- Jiang C, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P y MacLeod KT. 1992. Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca^{2+} current and intracellular free Ca^{2+} in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol.* 106: 739-745.
- Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN y Hensley K. 2008. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.* 15:473-493.
- Kang MG y Campbell KP. 2003. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 278:21315-21318.
- Kim YJ, Hur EM, Park TJ y Kim KT. 2000. Nongenomic inhibition of catecholamine secretion by 17beta-estradiol in PC12 cells. *J Neurochem.* 74: 2490-2496.
- Kochevarov AA. 2003. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium.* 33:145-162.
- Kornreich BG. 2007. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol.* 9:25-37.
- Kurata K, Takebayashi M, Kagaya A, Morinobu S y Yamawaki S. 2001. Effect of beta-estradiol on voltage-gated Ca^{2+} channels in rat hippocampal neurons: a comparison with dehydroepiandrosterone. *Eur J Pharmacol.* 416:203-12.
- Lacinova L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 24 Suppl 1:1-78.
- Latorre R, López-Barneo J, Bezanilla F y Llinas R. 1996. Canales de calcio. En: *Biofísica y Fisiología celular.* Universidad de Sevilla, España, pp 313-333.
- Lee DY, Chai YG, Lee EB, Kim KW, Nah SY, Oh TH y Rhim H. 2002. 17β -Estradiol inhibits high-voltage-activated calcium channel currents in rat sensory neurons via a non-genomic mechanism. *Life Sci.* 70(17):2047-2059.

Lee LL, Galo E, Lyeth BG, Muizelaar JP y Berman RF. 2004. Neuroprotection in the rat lateral fluid percussion model of traumatic brain injury by SNX-185, an N-type voltage-gated calcium channel blocker. *Exp Neurol*. 190:70-78.

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

Lin MT y Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 443(7113):787-795.

Markus MA y Morris BJ. 2008. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging*. 3:331-339.

Mattson MP y Chan SL. 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*. 34:385-397.

McCarthy MM. 2009. The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *Neuroscientist*. 15:599-610.

Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y y Mochizuki H. 2008. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 363:2215-2227.

Moro MA, López MG, Gandía L, Michelena P y Garcia AG. 1990. Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*. 185: 243-248.

Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M y Kurachi Y. 1995. 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 294:625-635.

Nowycky MC, Fox AP y Tsien RW. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*. 316:440-443.

Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, Taguchi T, Niki E, Hatanaka H, Kunugi H y Numakawa T. 2007. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology*. 148:627-637.

O'Connor D T, Mahata SK, Mahata M, Jiang Q, Hook VY y Taupenot L. 2007. Primary culture of bovine chromaffin cells. *Nat Protoc.* 2: 1248-1253.

Okabe K, Inoue Y y Soeda H. 1999. Estradiol inhibits Ca^{2+} and K^{+} channels in smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Eur J Pharmacol.* 376:101-108.

Olas B y Wachowicz B. 2005. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets.* 16(5):251-260.

Pallas M, Casadesus G, Smith MA, Coto-Montes A, Pelegri C, Vilaplana J y Camins A. 2009. Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Curr Neurovasc Res.* 6:70-81.

Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward W P y Brown K. 2011. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 1215: 161-169.

Pervaiz S. 2001. Resveratrol from the bottle to the bedside?. *Leuk Lymphoma.* 40:491-498.

Petersen OH , Michalak M y Verkhratsky A. 2005. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium.* 38:161-169.

Praharsh KS y Jagruti AP. 2010. Resveratrol and its biological actions. *International Journal of Green Pharmacy.* 15-21.

Rahman S y Islam R. 2011. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal.* 9: 1-8.

Ramsden M, Henderson Z y Pearson HA. 2002. Modulation of Ca^{2+} channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res.* 956:254-261.

Rodnitzky RL. 1999. Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease?. *Drugs.* 57:845-849.

Sather WA y Mccleskey EW. 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol.* 65: 133-159.

Shahlaie K, Lyeth BG, Gurkoff GG, Muizelaar JP, Berman RF. 2010. Neuroprotective Effects of Selective N-Type VGCC Blockade on Stretch-Injury-Induced Calcium Dynamics in Cortical Neurons. *J Neurotrauma*. 27:175-187

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

Shukla Y y Singh R. 2011. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 1215: 1-8.

Slater SJ, Seiz JL, Cook AC, Stagliano BA y Buzas CJ. 2003. Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 1637:59-69.

Sribnick EA, Ray SK y Banik NL. 2006. Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience*.137:197-209.

Sribnick EA, Del Re AM, Ray SK, Woodward JJ y Banik NL. 2009. Estrogen attenuates glutamate-induced cell death by inhibiting Ca^{2+} influx through L-type voltage-gated Ca^{2+} channels. *Brain Res*. 1276:159-170.

Sur P, Sribnick EA, Wingrave JM, Nowak MW, Ray SK y Banik NL. 2003. Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells. *Brain Res*. 97:178-188.

Surmeier DJ, Guzman JN y Sanchez-Padilla J. 2010. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium*.47:175-182.

Stewart JR, Ward NE, Ioannides CG y O'Brian CA. 1999. Resveratrol preferentially inhibits protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine-rich protein substrate by a novel mechanism. *Biochemistry*. 38:13244-51.

Szkudelski T y Szkudelska K.2011. Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 1215:34-39.

Toescu EC y Vreugdenhil M. 2010. Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium*. 47(2):158-164.

Triggle DJ. 2006. L-type calcium channels. *Curr Pharm Des.* 12:443-457.

Tseng TT, McMahon AM, Zahm RJ, Pacold ME y Jakobsson E. 2006. Calcium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 11:326-344.

Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K y Kawasaki K. 1997. Amyloid beta protein potentiates Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem.* 68:265-271.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M y Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44-84.

Vitko I, Shcheglovitov A, Baumgart JP, Arias- Olguin II, Murbartian J, Arias JM y Perez-Reyes E. 2008. Orientation of the calcium channel beta relative to the alpha(1)2.2 subunit is critical for its regulation of channel activity. *PLoS One.* 3:3560- 3570.

Wang R, Xiao L, Ma HJ, Zhang LH, He RR y Wu YM. 2008. Resveratrol inhibits electrical activity of paraventricular nucleus neurons in rat hypothalamic slices. *Sheng Li Xue Bao.* 60:279-283.

Wang Z, Zou J, Huang Y, Cao K, Xu Y yWu JM. 2002. Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Chin Med J (Engl).* 115(3):378-380.

Waring P. 2005. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch Biochem Biophys.* 434:33-42.

Woo SC, Na GM y Lim DY. 2008. Resveratrol inhibits nicotinic stimulation-evoked catecholamine release from the adrenal medulla. *Korean J Physiol Pharmacol.* 12: 155-164.

Yang NC, Lee CH y Song TY. 2010. Evaluation of resveratrol oxidation in vitro and the crucial role of bicarbonate ions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74:63-68.

Yi F, Tang Q, Feng S y Wang T. 2007. Effects of resveratrol on the L-type calcium current by protein kinase G pathway in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Chinese Journal of Pathophysiology.* 23: 648-651.

Yunker AM y McEnery MW. 2003. Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr.* 35:533-575.

Zhang F, Ram JL, Standley PR y Sowers JR. 1994. 17beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca^{2+} currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol.* 266:975-980.