



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



“EFECTO DE LA ASTAXANTINA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA B EN HIPOCAMPO DE RATAS ENVEJECIDAS Y EN CULTIVO DE CÉLULAS PC12”

Seminario de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener el grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

KARLA CATALDO CADENA

PATRICIO FARÍAS GONZÁLEZ

DANIELA MEZA MEZA

PROFESOR GUÍA: PABLO MUÑOZ CARVAJAL

PROFESOR CO GUÍA: TATIANA ADASME ROCHA

2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestro profesor guía de tesis Dr. Pablo Muñoz Carvajal, por habernos permitido ser parte de esta gran línea de investigación y por habernos dado la libertad de elegir el tema que nosotros quisiéramos, siempre facilitando los recursos necesarios para llevar a cabo nuestro proyecto, con buena disposición, con un trato ameno y horizontal hacia nosotros, brindándonos motivación, conocimiento y honestidad. A la vez, agradecer a nuestra profesora co-guía Tatiana Adasme Rocha por la paciencia y el conocimiento que nos brindó, además de facilitarnos vínculos con otros laboratorios. También, agradecer a Carolina Estay, Francisca García por la gran acogida a este laboratorio, entregándonos conocimientos y consejos.

Agradecemos a los laboratorios amigos, especialmente al laboratorio de Sinaptopatías a cargo del Dr. Álvaro Ardiles. También al laboratorio de Estructura y función celular especialmente a Belén Rodríguez por su constante ayuda y colaboración. Además, a los laboratorios a cargo de Mario Párraga y Joan Villena.

Patricio: Primero que todo, no puedo partir sin mencionar o agradecer el apoyo de mi familia, y en especial a mi madre que siempre da todo por mí, cosa que no es fácil. Segundo, es que, si no hubiera sido por muchas personas, hubiera estado 3 años haciendo la tesis y me hubiera sido mucho más difícil, por lo que gracias por todo lo que me enseñaron y las oportunidades que me dieron: a Ivana Gajardo, porque es una persona de quién pude aprender muchas cosas, gracias por tu paciencia y por la disposición a solucionar las simples dudas que tenía de todo lo que estaba haciendo. Gracias a Nieve Navarro, por su buena onda y facilitación de los equipos de su laboratorio, al igual que a Carolina Rejas y Juan Varas. También gracias a los que me dieron algún consejo en algún momento, como Claudia Palacios, que además siempre me preguntaba cómo iba y a Francisca García, que también me aportó con su saco de arena. Esperando no dejar a nadie afuera, por último, quiero incluir a Kurulik y Niña, que, con mordidas y rasguños, me acompañaron durante este tiempo.

Karla: Quisiera agradecer a mi madre Alejandra y a su pareja Rodolfo, además a mi padre Mario y a mi pareja Roberto a quienes les debo todo, porque que quizás sin ellos yo no estaría

escribiendo esta tesis, ya que siempre estuvieron allí brindando su apoyo de manera incondicional aún en los momentos más difíciles. También agradecer a mi hermano Tomás, por su preocupación y apoyo en los momentos en que lo necesité. Finalmente agradecer a todos aquellos quienes me brindaron su apoyo, no quiero agregar nombres ya que es una larga lista.

Daniela: En primer lugar, agradecer a mi familia, especialmente a mi madre Esmeralda por su paciencia y contención incondicional y a su pareja Fernando por su preocupación durante todo este proceso. A mi familia en Suecia por su constante cariño y apoyo. También agradecer a mis tíos, primos, padrinos, vecinos, amigas de la vida y a todos quienes me dieron alguna palabra de ánimo y buenas energías para concretar este proyecto. Finalmente, muchísimas gracias a los profesionales de los otros laboratorios del edificio Bruno Günther por la buena disposición para ayudar.

RESUMEN

Nuestras capacidades cognitivas, como la memoria dependiente del hipocampo, sufren un deterioro progresivo con el envejecimiento, el cual es también asociado con estrés oxidativo e inflamación. El factor nuclear kappa B, activado por oxidantes y relacionado con la inflamación, participa en el aprendizaje y la memoria; por lo tanto, una dieta saludable rica en antioxidantes puede disminuir el daño oxidativo y puede prevenir la inflamación al inhibir la vía NF- κ B. Al respecto, la astaxantina, un carotenoide obtenido principalmente de la microalga *Haematococcus Pluvialis*, es un poderoso antioxidante y disminuye la inflamación a través de NF- κ B. Dado que ASX cruza la barrera hematoencefálica, podría ser una molécula bioactiva prometedora para atenuar los efectos del envejecimiento cerebral. En este trabajo, evaluamos el efecto de ASX en el daño oxidativo del ADN, la expresión y la translocación nuclear de NF- κ B en el área del hipocampo de ratas *Sprague Dawley* jóvenes (4-5 meses) y envejecidas (14 meses) que fueron alimentadas con una dieta normal suplementada con ASX (4 mg/día) o vehículo (n = 6 por grupo) durante 20 días. Comparamos el efecto de ASX en un modelo celular de estrés oxidativo. Con ese fin, células PC12 se pre-incubaron durante 24 horas con ASX o vehículo, y luego, se estimularon con y sin peróxido de hidrógeno durante una hora. El daño en el ADN y la translocación nuclear de NF- κ B se evaluaron mediante inmunohistoquímica; la expresión de NF- κ B por western blot. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la regulación bioética. La estadística se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de prueba post hoc. Después de la suplementación, ASX no afectó la expresión de NF- κ B en ninguno de los grupos, pero evitó la translocación nuclear observada en ratas envejecidas y células PC12 tratadas con peróxido de hidrógeno. En conclusión, nuestros datos sugieren que ASX actúa como un neuroprotector a nivel del hipocampo ya que modula la ruta del NF- κ B.

PALABRAS CLAVES: Astaxantina, Envejecimiento, NF- κ B, Estrés oxidativo, Inflamación, Hipocampo.

ABSTRACT

Our cognitive abilities, such as hippocampal-dependent memory, suffer a progressive deterioration with aging, which is also associated to oxidative stress and inflammation. Nuclear factor kappa B, activated by oxidants and related to inflammation, participates in learning and memory; therefore, a healthy antioxidant-rich diet can decrease oxidative damage and can prevent inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway. Astaxanthin, a carotenoid obtained mainly from the microalgae *Haematococcus Pluvialis*, is a powerful antioxidant and decreases inflammation through NF- κ B. Given that ASX cross blood-brain barrier, could be a promising bioactive molecule to attenuate the effects of brain aging. In this work, we evaluated the effect of ASX in DNA oxidative damage, expression and nuclear translocation of NF- κ B in the hippocampal area from young (4-5 months), and aged (14 months) *Sprague Dawley* rats. These animals were fed with normal diet supplemented with ASX (4 mg/day) or vehicle (n=6 per group) for 20 days. We compared the effect of ASX in a cellular model of oxidative stress. To that aim, PC12 cells were pre-incubated for 24 hours with ASX or vehicle, and then, stimulated with and without hydrogen peroxide for one hour. DNA damage and nuclear translocation of NF- κ B were evaluated by immunohistochemistry; NF- κ B expression by western blot. Experiments were performed in accordance with bioethical regulation. Statistic was performed by one-way ANOVA followed by post hoc test. After supplementation, ASX did not affect NF- κ B expression in any of the groups, but prevented the nuclear translocation observed in aged rats and PC12 cells treated with hydrogen peroxide. In conclusion, our data suggest that ASX acts as a neuroprotector at hippocampus level since modulate NF- κ B pathway.

ACRÓNIMOS

8OHdG: 8-Hydroxy 2'-deoxyguanosine

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APOP: Producto de Proteínas de Oxidación Avanzada

ARN: Ácido Ribonucleico

ASX: Astaxantina

A β Os: Péptidos oligómeros beta amiloide

BSA: Bovine Serum Albumin

CIBICA: Comité Institucional de Bioética para la Investigación en Animales

DMBA: Dimetilbenzantraceno

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DOX: Doxorrubicina

ERNs: Especies Reactivas del Nitrógeno

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

FAWC: Farm Animal Welfare Committee

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IHQ: Inmunohistoquímica

I κ B α / β : Inhibidor kappa beta alfa/ beta

IKK α / β : Kinasa Inhibidora kappa alfa/beta

MDA: Malondialdehído

NF- κ B: Factor nuclear-kappa B

PBS: Buffer fosfato salino (Inglés)

PFA: Paraformaldehído

PVDF: Polifluoruro de Vinilideno

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD: Superóxido Dismutasa

TBS-T: Tris-buffer salino - Tween 20

ÍNDICE

“Efecto De la Astaxantina Sobre La Translocación Del factor nuclear kappa B En Hipocampo De Ratas Envejecidas Y En Cultivo De Células PC12”	i
Resumen	iv
Abstract.....	v
Acrónimos.....	vi
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Envejecimiento	1
1.2 Hipocampo.....	2
1.3 Inflamación y estrés oxidativo.....	3
1.3.1 Marcador de daño al ADN 8 hidroxil 2 deoxyguanosina	5
1.4 Factor nuclear kappa B	6
1.5 Astaxantina	8
Capítulo 2. Presentación Del Problema De Investigación.....	12
2.1 Pregunta De Investigación	12
2.2 Hipótesis	12
Capítulo 3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos	13
Capítulo 4. Metodología.....	14
4.1 Tipo de estudio	14
4.2 Población	14
4.3 Muestra	14

4.4 Variables	15
4.4.1 Astaxantina	15
4.4.2. Translocación del NF- κ B.....	15
4.2.3 Estrés oxidativo	16
4.5 Fuentes y Métodos de Recolección de Datos	16
4.6 Criterios de inclusión y exclusión.....	17
4.7 Análisis estadístico	17
4.7.1 Inmunofluorescencia.....	17
4.7.2 Western blot.....	18
4.8 Consideraciones éticas	18
4.8.1 No maleficencia	18
4.7.2 Beneficencia	19
Capítulo 5. Materiales y Métodos	20
5.1 Modelo <i>In vivo</i>	20
5.1.1 Animales	20
5.1.2 Diseño experimental modelo <i>in vivo</i>	20
5.1.2 Suplementación/ Dosis	21
5.1.3 Eutanasia Animales	22
5.1.4 Obtención de Hipocampo	22
5.2 Modelo <i>In Vitro</i>	23
5.2.1 Cultivo Células	23
5.2.2 Diseño Experimental modelo <i>in vitro</i>	23
5.2.3 Inmunofluorescencia.....	25
5.2.4 Western Blot	26
Capítulo 6. Resultados	29

6.1 Estudios <i>in vivo</i>	29
6.1.1 Localización intracelular del NF-κB en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal o suplementada con astaxantina.	29
6.1.2 Contenido relativo de la proteína NF-κB en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.	32
6.1.3 Presencia de marcadores de daño al ADN en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.	33
6.2 Estudios <i>in vitro</i>	36
6.2.1 Localización intracelular del NF-κB en línea celular PC12 con y sin pretratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.	36
6.2.2 Contenido relativo de NF-κB en línea celular PC12 con y sin previo tratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.	38
6.2.3 Presencia de marcadores de daño al ADN en línea celular PC12 con y sin pretratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.....	40
Capítulo 7. Discusion.....	43
7.1 Efecto de ASX sobre la Translocación de NF-κB.....	43
7.2 Efecto de ASX en la expresión relativa de NF-κB.....	44
7.3 Efecto de ASX sobre marcadores del daño al ADN.....	46
Capítulo 8 Conclusiones.....	48
Bibliografía.....	49
Anexos.....	57
A. Protocolos de preparación de soluciones.....	57
A.1 PBS 10X.....	57
A.2 Medio de cultivo.....	57

A.2.1 DMEM con antibiótico Solución Stock.....	57
A.2.2 Preparación de medio de crecimiento completo	58
A.2.3 Preparación de medio de crecimiento restringido.....	58
A.2.4 Preparación Tripsina- EDTA	59
A.3 Soluciones para inmunofluorescencia	59
A.3.1 Solución de Permeabilización.....	59
A.3.2 Solución para dilución de anticuerpo (PBS-tritón 0,4%).....	59
A.3.3 Solución de lavado (PBS- tritón 0,2%).....	60
A.3.4 Sacarosa 30%	60
A.3.5 Buffer Citrato (10 mM, pH 6.0).....	60
A.4 Soluciones Para Western Blot.....	61
A.4.1 Buffer de Lisis NP-40	61
A.4.2 Solución de Bloqueo (Leche descremada al 5% en TBS-T)	61
A.4.3 TBS 10X	61
A.4.4 TBS-T 0,05%	62
A.4.5 TBS-T 0,1%:.....	62
A.4.6 Laemmli Sampler Buffer 5X	62
A.4.7 Solución Tampón Tris-Glicina / Buffer de Electroforesis 10X.....	63
A.4.8 Laemmli Running Buffer/ Buffer de Transferencia 10X.....	63
A.4.9 PSA 10% p/v.....	63
A.4.10 SDS 10%:.....	64
A.4.11 Tris 1,0 M pH=6.8	64
A.4.12 Tris 1,5M pH=8,8	64
B. Protocolo De Subcultivo De Células Pc12	65
C. Cuantificación de Proteínas para Western Blot	66

D. Protocolo de Stripping Western Blot 66

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Circuitos neuronales en hipocampo	3
FIGURA 1.2 Rutas canónica y no canónica de NF- κ B	7
FIGURA 1.3 Estructura de astaxantina	9
FIGURA 6.1 Inmunofluorescencia de NF- κ B (p65/RelA) en hipocampo de ratas.	30
FIGURA 6.2 Efecto de astaxantina en translocación nuclear de NF- κ B en hipocampo de ratas Sprague Dawley.	31
FIGURA 6.3 Efecto de astaxantina sobre el contenido relativo de la proteína NF- κ B en células de hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas.	33
FIGURA 6.4 Inmunofluorescencia de 8OHdG en hipocampo de ratas.	34
FIGURA 6.5 Efecto de astaxantina en la intensidad de fluorescencia nuclear de 8OHdG en hipocampo de ratas Sprague Dawley.	35
FIGURA 6.6 Inmunofluorescencia de NF- κ B (p65/RelA) en línea celular PC12.	37
FIGURA 6.7 Efecto de astaxantina en translocación nuclear de NF- κ B en células PC12.	38
FIGURA 6.8 Efecto de astaxantina sobre el contenido relativo de NF- κ B en células PC12.	39
FIGURA 6.9 Inmunofluorescencia de 8OHdG en línea celular PC12.	41
FIGURA 6.10 Efecto de astaxantina en la intensidad de fluorescencia nuclear de 8OHdG en línea celular PC12.	42

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con un reporte del año 2015 de la organización de las naciones unidas en relación al envejecimiento de la población, estima que en los próximos 35 años la población de 60 años de edad o mayor será el doble que la actual, alcanzando una cifra mundial de 2.1 billones de personas (1). Lo anterior conlleva a un cambio en las prioridades de las políticas públicas a nivel mundial procurando focalizar los esfuerzos en promover un envejecimiento activo y saludable, mejorando la calidad de vida del adulto mayor (2). Además existe una gran preocupación debido a que junto a este aumento en la expectativa de vida hay una alta incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles tales como: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, obesidad, diabetes y algunos tipos de cáncer (3) (4).

1.1 ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento corresponde a un conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los individuos. A nivel cerebral, el envejecimiento se puede manifestar como un deterioro cognitivo (5) que está asociado a la incapacidad de memorizar, retener y recuperar la información adquirida, principalmente, aquella dependiente de claves espaciales (6) (7) (8) (9) (10). Relacionándose también con la integridad del hipocampo (11) (12). Este declive cognitivo se ha explicado en parte por cambios en la plasticidad sináptica o alteraciones celulares que afectan directamente los mecanismos que la sustentan (13) (14) (15), pérdida de la masa encefálica, aumento de la sustancia blanca, pérdida de la memoria dependiente del hipocampo y hasta distintos tipos de demencia (2). Estos cambios han sido documentados en distintos organismos incluyendo humanos, primates no humanos, perros y roedores (16) (17) (18) (9).

1.2 HIPOCAMPO

Una de las estructuras cerebrales de mayor interés en esta línea de investigación es el hipocampo, cuya red neuronal juega un rol fundamental en el aprendizaje, formación y consolidación de la memoria (19). El hipocampo es considerado crítico en la memoria y la neuroplasticidad, la cual es la capacidad de las neuronas de, a partir de estímulos externos e internos, adaptarse para formar nuevas redes en respuesta al desarrollo cerebral y aprendizaje (20). Sin embargo, así como presenta un alto grado de plasticidad también es altamente vulnerable a condiciones nocivas como la neuroinflamación, estrés oxidativo, neurodegeneración y envejecimiento. La neuroplasticidad por otro lado, presenta una fuerte influencia dependiente del tiempo y la edad, y que puede resultar en una adaptación positiva o negativa (19).

Dentro de la anatomía del hipocampo, podemos identificar dos zonas principales: Cornu Ammonis (CA1-CA3) y giro dentado, cada una de las cuales presenta estratos de neuronas que cumplen funciones determinadas. La zona del giro dentado procesa información espacial, la región CA3 es responsable de asociación de patrones espaciales, detección de sucesos u objetos novedosos, y en memoria a corto plazo, y finalmente la región CA1 interviene en procesos involucrados en la asociación de patrones temporales y memoria a largo plazo. Estas zonas presentan una circuitería neuronal entrelazada (21) como se muestra en la siguiente imagen:

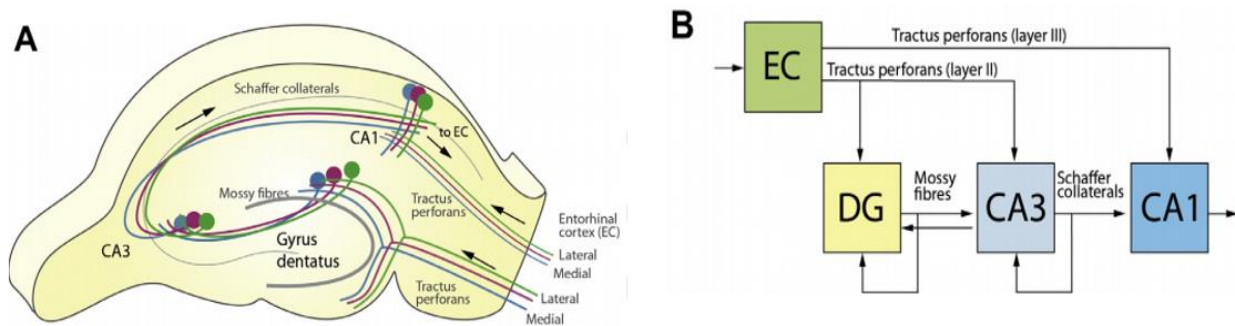


FIGURA 1.1 Circuitos neuronales en hipocampo (19).

En la imagen A, se puede apreciar la circuitería neuronal, los somas y axones que generan asociación entre las distintas zonas del hipocampo. En la imagen B se presenta un esquema con el flujo de información transmitida entre las neuronas.

La principal región del hipocampo afectada con el envejecimiento es la región CA1, ya que las neuronas piramidales presentan una especial vulnerabilidad a la neuroinflamación debido a que esta región presenta bajos niveles de enzimas antioxidantes a diferencia de las regiones CA3 y giro dentado las cuales presentan mínimos cambios. Esto podría explicar la elevada vulnerabilidad de esta región a diferentes agentes estresantes (19).

1.3 INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

La inflamación es una respuesta no específica de nuestro sistema inmune, esta ocurre como reacción a cualquier tipo de daño, siendo parte de los mecanismos de defensa innatos con los que se protege al cuerpo humano (22). Este proceso es autolimitado en condiciones normales, sin embargo en algunos casos persiste evolucionando hacia un proceso inflamatorio crónico (22) (23) (24). En la actualidad, las respuestas inflamatorias están recibiendo especial atención debido a su nexos con el desarrollo de diversas enfermedades, existiendo un gran interés en los mecanismos de neuroinflamación, que corresponden a respuestas inflamatorias en el cerebro o en

el cordón espinal (25). Este tipo de inflamación es mediada por la producción de citoquinas, quimioquinas, especies reactivas del oxígeno (EROs), mediadores secretados por la microglía, astrocitos, células endoteliales, entre otras (23) (22). Las EROs son un grupo de moléculas entre las que se incluye el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), y son generadas debido a la reducción incompleta que sufre el oxígeno (26). Sin embargo, no solo del oxígeno se obtienen moléculas altamente reactivas, también encontramos otro tipo de moléculas provenientes del nitrógeno, denominadas especies reactivas del nitrógeno (ERN) en las que encontramos al NO^{\cdot} , peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (27).

Bajo condiciones fisiológicas, la producción celular de EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) se encuentra estrictamente regulada mediante una amplia batería de enzimas antioxidantes, que contrarrestan el efecto de estas moléculas. Las principales enzimas clasificadas en este grupo son: el superóxido dismutasa (SOD), una clase de metaloenzimas que generan la dismutación del anión superóxido a H_2O_2 y O_2 , enzimas como la catalasa, peroxidasa, glutatión peroxidasa, que descomponen el H_2O_2 en agua y oxígeno. Existen otros tipos de moléculas como el glutatión, tioredoxinas y peroxiredoxinas, que actúan como donares de electrones (28).

Existen varios factores que pueden iniciar inflamación en el SNC, dentro de los cuales encontramos el envejecimiento, demencia, infarto, hipertensión, diabetes, tumores e infecciones (29) (30). En particular, el envejecimiento podría gatillar la neuroinflamación debido a diversas causas, siendo una de las más aceptadas el daño celular acumulativo (31), ya que, al no poder reparar los daños, estos se van acumulando generando un desbalance en los procesos normales. Esta teoría se relaciona también con los radicales libres, donde el daño acumulativo que ocurre en las células es producto del metabolismo del oxígeno y de los radicales libres que surgen de este metabolismo (31).

Si bien los efectos de estos procesos dependen del contexto, de la duración e intensidad del estímulo gatillante, sus consecuencias en el SNC se pueden observar tanto a nivel fisiológico, bioquímico e incluso psicológico. Más aún, se ha descrito que la neuroinflamación promueve la migración de células inmunitarias, formación de edema y daño tisular, que sucesivamente pueden gatillar la muerte celular (24) (23) (25). Este es un factor clave, ya que está ampliamente aceptado que en el SNC las neuronas no pueden regenerarse (32).

Con el paso del tiempo y el envejecimiento, estos procesos de oxidación van perdiendo su fino balance aumentando los agentes oxidantes como son el superóxido, H_2O_2 , radical hidróxilo, entre otros, lo que finalmente provoca no solo oxidación de las macromoléculas orgánicas para la obtención de energía, sino también de las moléculas que constituyen las membranas celulares, la matriz extracelular y ADN, como los fosfolípidos, proteínas del citoesqueleto, entre otras (33). Todo lo anterior finalmente se traduce en un daño acumulativo e irreversible que llamamos estrés oxidativo, lo cual es una de las principales causas del envejecimiento.

1.3.1 Marcador de daño al ADN 8 hidroxil 2 deoxyguanosina

El envejecimiento se encuentra asociado con la acumulación progresiva de diversas moléculas que son producto del daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos. El ADN mitocondrial y nuclear son moléculas particularmente sensibles a la oxidación, siendo afectado también el funcionamiento de diversos procesos biológicos, entre ellos la expresión génica (34). Uno de los productos más predominantes generados por la oxidación del ADN es el aducto 8-hidroxil-2'-deoxyguanosina (8OHdG) el cual ha sido ampliamente utilizado como un marcador de daño oxidativo al ADN causado por EROs. El radical hidroxilo y el anión superóxido, producidos por diversos complejos como la cadena transportadora de electrones son los principales causantes de la formación de este biomarcador (35). La interacción del radical hidroxilo con la base nitrogenada guanina, conduce a la formación de C8-hidroxiguanina o también la interacción con su nucleósido formando deoxiguanosina. Luego de una serie de reacciones intermediarias de reducción sobre las moléculas anteriormente mencionadas se forma 8OHdG (36). Se ha evidenciado que los niveles de 8OHdG en el ADN de ratas aumentan con el envejecimiento normal, especialmente en ratas cuya dieta carece de los niveles adecuados de antioxidantes (37).

Una de las vías activadas por estrés oxidativo y que está implicada en la generación de aún más estrés oxidativo gatillado por procesos inflamatorios, es la que involucra al factor nuclear kappa B (NF- κ B), el cual afecta principalmente a astrocitos y microglía (21) generando una sobre-activación de estas células durante el propio envejecimiento (38).

1.4 FACTOR NUCLEAR KAPPA B

Uno de los factores nucleares más ampliamente estudiados y que modula la inflamación es NF- κ B, cuya expresión y distribución intracelular es fundamental para esta investigación. Este factor de transcripción se encuentra ampliamente expresado en neuronas y microglía, y exhibe un efecto dual ya que en neuronas su activación se relaciona con la supervivencia celular, pero en la microglía posee un efecto neuroinflamatorio (39). Además, NF- κ B interviene en procesos como desarrollo embrionario, control de la proliferación celular, regulación de crecimiento axonal y dendrítico, y neurodegeneración (40) (41).

NF- κ B es un heterodímero que se constituye por la unión de dos subunidades de la familia de NF- κ B donde se encuentran 5 proteínas estructuralmente relacionadas: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB y c-Rel (40). Cada una de estas subunidades posee una zona N-terminal en común que consta de 300 aminoácidos denominada dominio de homología Rel “RHD” por sus siglas en inglés Rel Homology Domain, que es el sitio responsable de la unión entre subunidades, la unión al ADN y de la unión a su inhibidor I κ B (38), por lo que esta es la zona a través de la cual NF- κ B induce o reprime la transcripción génica. También existen distintas combinaciones de estos dímeros los cuales se distribuyen distintamente dependiendo del tipo celular y bajo ciertas condiciones, sin embargo, el heterodímero más comúnmente estudiado en la inducción de la inflamación es P65/p50 (42).

Normalmente en ausencia de estímulos, NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma celular interactuando con un miembro de la familia de proteínas inhibitorias de NF- κ B “I κ B”, dentro de las cuales I κ B α es la más común. La activación de este factor de transcripción puede ocurrir a través de dos vías conocidas: a través de la vía canónica y la vía no canónica, dentro de las cuales la vía canónica se caracteriza por ser activada por estímulos pro-inflamatorios detonados por citosinas como TNF- α e IL-1, y que además involucra la participación de la subunidad p65 de NF- κ B utilizada en este trabajo de investigación. Por lo tanto, esta investigación apunta a esclarecer sucesos que ocurren a través de esta ruta de activación (23). En relación a lo anterior, la activación de NF- κ B implica la fosforilación de su inhibidor I κ B por los complejos de kinasas IKK, lo que provoca la degradación del complejo NF- κ B-I κ B por parte del

proteosoma, resultando en la liberación del dímero de NF- κ B permitiendo su translocación al núcleo (43) como se muestra a continuación:

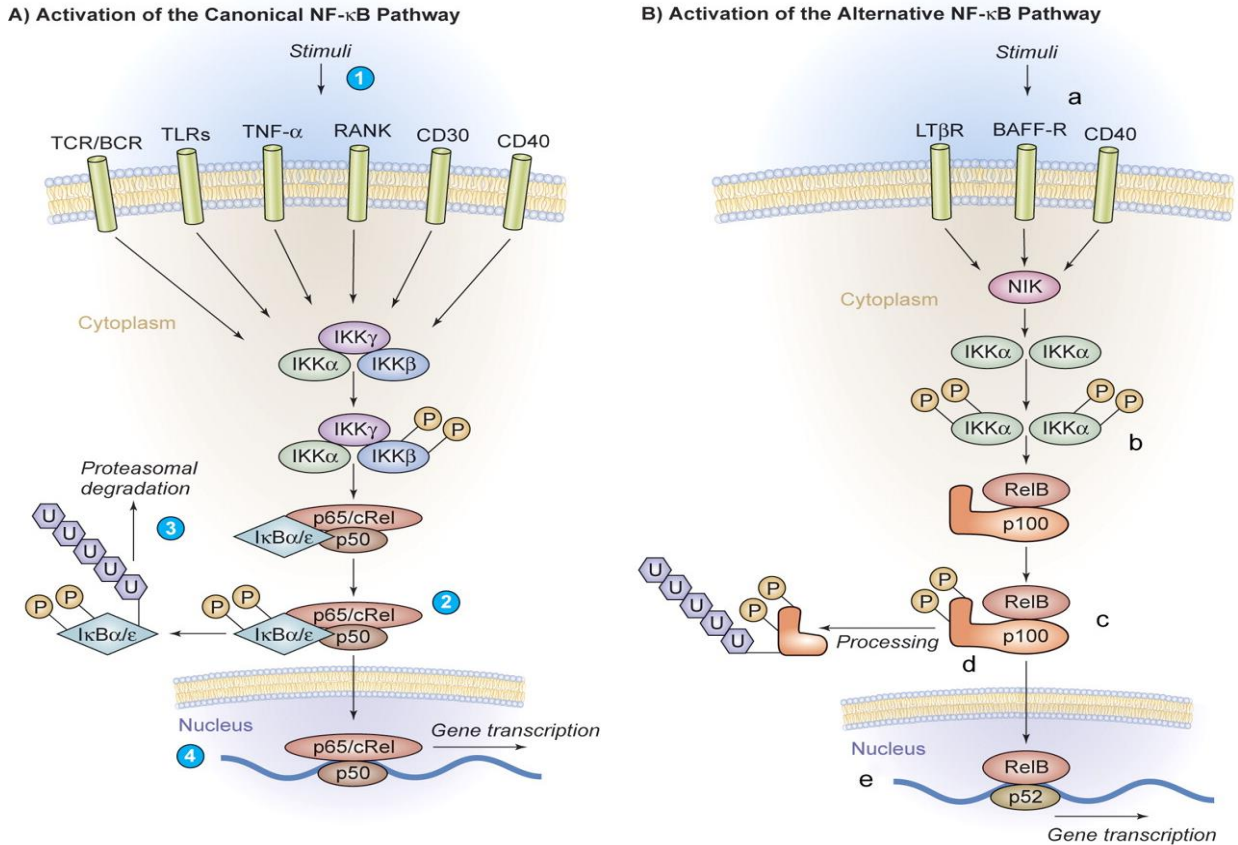


FIGURA 1.2 *Rutas canónica y no canónica de NF- κ B (44)*

La forma activa de NF- κ B promueve la expresión de más de 150 genes, y entre estos genes se incluyen 27 diferentes quimioquinas y citoquinas, receptores requeridos para el reconocimiento inmune como moléculas del complejo de histocompatibilidad, proteínas relacionadas con la presentación de antígenos, entre otros. Además, uno de los genes diana de NF- κ B es el que transcribe para su propio inhibidor I κ B α , efectuándose así una retroalimentación negativa (45).

Para evitar la sobre activación de NF- κ B y la neuroinflamación observada con la edad, existe una intensa búsqueda de compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria, entre los cuales está la Astaxantina (ASX).

1.5 ASTAXANTINA

Si bien el cuerpo humano posee enzimas antioxidantes endógenas encargadas de neutralizar los radicales libres y EROs, con el tiempo estas proteínas van perdiendo su función por lo que se requiere el uso de antioxidantes contenidos en los alimentos para disminuir el estrés oxidativo y la velocidad con que el organismo se va deteriorando, mejorando el envejecimiento (31). Estas sustancias actúan como dadores o aceptores de electrones neutralizando las EROs, y un antioxidante sobre el cual últimamente se han realizado numerosos estudios es la ASX (46).

ASX es un pigmento rojizo perteneciente al grupo de los carotenoides, particularmente a los xantófilos que se encuentra comúnmente en salmones y crustáceos como cangrejos, langostas, centollas y en la cadena alimenticia de organismos superiores como los flamencos (47). Este antioxidante es generado principalmente por la microalga *Haematococcus pluvialis* como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés, produciendo grandes cantidades de ASX que se acumulan en su citoplasma (48).

La estructura de la ASX consta de una parte apolar dada por una cadena de 40 carbonos con dobles enlaces (carbono-carbono), y una parte polar la cual consiste en grupos hidroxilo y cetona en anillos ionona en ambos extremos, (49) (50) (51) como se muestra a continuación:

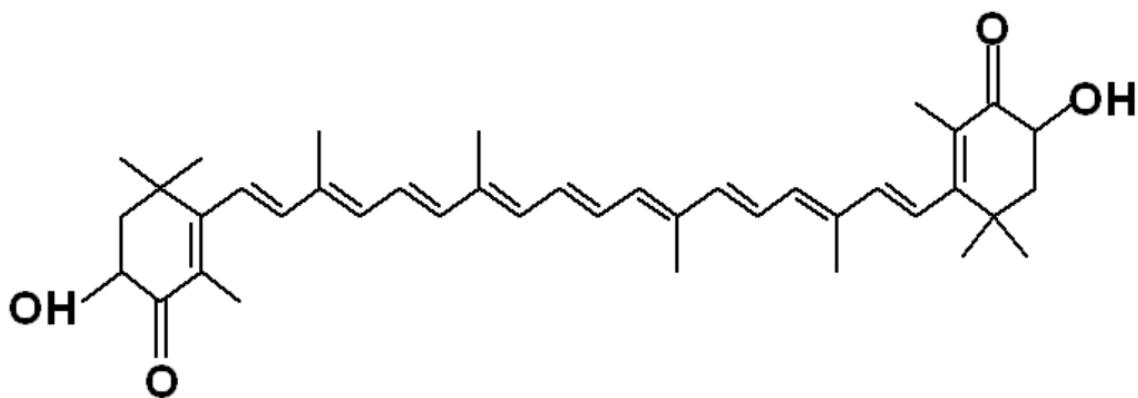


FIGURA 1.3 Estructura de astaxantina (52)

ASX posee una poderosa actividad antioxidante en comparación con otros miembros de la familia carotenoide como el beta caroteno, licopeno, luteína, y vitamina E, siendo 65 veces más potente que la vitamina C, 54 veces más potente que el beta caroteno y 14 veces más potente que la vitamina E. Además, este antioxidante previene la generación de EROs durante la exposición a la luz ultravioleta, lo que disminuye significativamente del daño al ADN (53).

Por otro lado, ASX tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (54) (55), lo que se relaciona con la disposición transmembrana que adquiere en la célula, ya que a diferencia de la vitamina E y el beta-caroteno, que se encuentran exclusivamente en la región hidrofóbica de la membrana celular y de la vitamina C, que se ubica en zonas hidrofílicas, ASX puede situar su cadena de 40 carbonos en la zona hidrofóbica de la bicapa lipídica con sus anillos hacia el exterior e interior de la célula, lo que protege a la célula del daño oxidativo (51).

En la actualidad ASX ha sido estudiada por un sinnúmero de investigaciones que utilizan modelos *in vitro* tanto en cultivos primarios como líneas celulares, y en modelos *in vivo* de roedores, incluso también en humanos.

Dentro de los estudios *in vitro*, ASX disminuyó la generación mitocondrial de H_2O_2 en cultivo primario de neuronas hipocampales en un modelo de estrés oxidativo mediado por oligómeros de péptido beta amiloide (A β Os) (56). En línea celular de células alveolares epiteliales tipo 2 (AECs-II) también en un modelo de estrés oxidativo mediado por H_2O_2 , ASX disminuyó la generación de EROs inducida por el estímulo de H_2O_2 , también inhibió la muerte celular inducida por H_2O_2 mejorando el estado de las mitocondrias en células estimuladas con

H₂O₂. En este último trabajo, se mostró que ASX previno la translocación de proteínas apoptóticas como Bax, Bad y Bcl-2 en células estimuladas con H₂O₂ previniendo la apoptosis, y finalmente ASX activó factores de transcripción relacionadas con la protección ante el estrés oxidativo (57).

Por otro lado, en el linfoma de histiocitos humanos U937 usando un modelo de estrés oxidativo mediado por H₂O₂, ASX también exhibe efectos protectores contra la citotoxicidad aumentando la viabilidad celular y regulando negativamente la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1B, IL-6 y TNF- α , además de prevenir la activación de NF- κ B (58).

En línea celular PC12 de feocromocitoma de rata en modelo de estrés oxidativo mediado por H₂O₂, el pre tratamiento con ASX aumenta la supervivencia celular, restaura la actividad de enzimas necesarias para el metabolismo y transporte transmembrana, disminuye la apoptosis, disminuye el estrés oxidativo y la inflamación al restaurar la actividad de enzimas antioxidantes endógenas, y disminuir la secreción de citosinas pro-inflamatorias (59). Además, en esta misma línea celular se ha evidenciado que ASX exhibe efectos protectores en modelos de enfermedad de Parkinson (60).

Por otro lado, en estudios *in vivo* realizados en roedores, los cuales presentan grandes similitudes al organismo humano, sobre todo en lo que se refiere a sistema nervioso (61). La suplementación con ASX resulta en una mejora de la neurogénesis del hipocampo dependiente de la dosis, y además mejora las funciones cognitivas dependientes del hipocampo como la memoria espacial (62). En otros estudios también en ratones, se ha visto que ASX disminuye los niveles de marcadores de peroxidación lipídica como el malondialdehído (MDA), y de los productos de oxidación proteica avanzada (APOP) ya que la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas está aumentada en hipocampo, hipotálamo, corteza frontal, corteza parietal, cerebelo y cuerpo estriado (63).

Se ha descrito también que la suplementación con ASX mejora las consecuencias cerebrales de fármacos citotóxicos utilizados para la quimioterapia como el DOX, disminuyendo la neurodegeneración hipocampal por disminución del estrés oxidativo e inflamación (64).

En otro modelo de daño causado por un carcinógeno e inmunosupresor DMBA, la suplementación con ASX disminuyó la translocación de NF- κ B evidenciada a través de IHQ,

observándose incremento de NF- κ B p65 en el citosol con respecto al núcleo probablemente por una disminución en la activación de su inhibidor I κ B α (65).

En virtud de la información entregada en relación al envejecimiento, estrés oxidativo, NF- κ B, y ASX, es que surge la interrogante de como la ASX administrada a través de la dieta afectaría a los factores anteriormente nombrados en hipocampo, así como también en un modelo celular; por lo que a continuación se plantean las siguientes interrogantes.

CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Considerando que:

1. El envejecimiento cerebral está asociado a un aumento de la generación de especies oxidantes y de componentes pro-inflamatorios que generan disminución de las capacidades cognitivas del individuo envejecido.
2. Numerosos estudios relacionan ASX con la disminución del estrés oxidativo, y la inhibición de la translocación de uno de los mediadores pro-inflamatorios (NF- κ B)
3. Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que ASX es un antioxidante que posee características de neuroprotector, ya que disminuye la expresión de genes pro-inflamatorios, en células de neuroblastoma humano.

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la ASX sobre la translocación del NF- κ B en: a) Neuronas hipocampales de ratas *Sprague Dawley* envejecidas, y b) un modelo celular de estrés oxidativo basado en H₂O₂, en células PC12?

2.2 HIPÓTESIS

La ASX previene el estrés oxidativo disminuyendo la translocación de NF- κ B al núcleo, en neuronas hipocampales de ratas *Sprague Dawley* envejecidas, y en un modelo celular de estrés oxidativo.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la suplementación con ASX en la alimentación de las ratas envejecidas *Sprague Dawley* o el tratamiento de células PC12 con ASX previo a la estimulación con altas concentraciones de H₂O₂ previene la translocación y el incremento en los niveles de NF-κB tanto en el hipocampo como en las células.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la localización intracelular del NF-κB en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.
- Determinar los niveles de expresión relativa de NF-κB en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.
- Estudiar la presencia de marcadores de daño al ADN en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.
- Identificar la localización intracelular del NF-κB en línea celular PC12 con y sin pretratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂.
- Determinar los niveles de expresión relativa de NF-κB en línea celular PC12 con y sin pretratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂.
- Estudiar la presencia de marcadores de daño al DNA en línea celular PC12 con y sin pretratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Es correlacional y según el nivel de intervención: Cuasi-experimental. Correlacional, debido a que se buscó evidenciar que la suplementación con ASX genera una relación inversa con respecto a la translocación de NF- κ B a núcleo, sin buscar una causalidad entre las variables. Además, corresponde a un tipo de estudio cuasi experimental debido a que la selección de los sujetos para el estudio no fue aleatoria.

4.2 POBLACIÓN

- Población objetivo: Ratas *Sprague Dawley* envejecidas.
- Población de estudio: Hipocampo de ratas *Sprague Dawley* de 4-5 meses de edad y de 14 meses de edad, y células de línea celular PC12.
- Muestra: Neuronas hipocampales de un grupo 24 de ratas *Sprague Dawley* de 4-5 meses de edad y de 14 meses de edad que no poseían patologías subyacentes, y células de línea celular PC12 viables que no alcanzaron una confluencia mayor al 70%.

4.3 MUESTRA

El tipo de muestreo es no probabilístico por conveniencia, debido a que seleccionamos un grupo de células que poseían características de interés para nuestra investigación, correspondientes a neuronas hipocampales de ratas *Sprague Dawley* y células de línea celular PC12.

Las características de interés para esta investigación fueron:

- La muestra que se utilizó para esta investigación no había sido objeto de investigación en el tema que estamos presentando.
- La muestra elegida presentaba una fuerte relación con funciones de aprendizaje y memoria que se ven afectadas por patologías neurodegenerativas, por lo que se consideró una zona crítica de estudio.

4.4 VARIABLES

4.4.1 Astaxantina

- Descripción de la variable: *Variable Independiente.*
- Definición Conceptual: ASX es un potente antioxidante extraído principalmente de la microalga *Haematococcus Pluvialis* perteneciente al grupo de los xantófilos, derivados de los carotenoides. Su estructura química consta de una cadena de 40 carbonos y dos anillos bencénicos en los extremos de la cadena. Estas características le otorgan su capacidad de neutralizar a los radicales libres y además de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que es ampliamente estudiada en patologías del sistema nervioso.
- Definición Operacional: ASX se dosificó en una pesa analítica para ser administrada a las ratas a través de una sonda, y además se llevó una bitácora con las fechas y las dosis de suplementación. En células PC12 se dosificó para ser administrada a través del medio de cultivo.

4.4.2. Translocación del NF- κ B

- Descripción de la variable: *Variable Dependiente.*
- Definición Conceptual: Es una respuesta a estímulos de crecimiento, supervivencia, diferenciación celular y plasticidad sináptica. NF- κ B es un dímero formado por la combinación de 5 subunidades, dentro de las cuáles la más común es p65. En condiciones

basales NF- κ B se encuentra principalmente distribuido en el citoplasma unido a su inhibidor I κ B y en presencia de estrés oxidativo y estímulos inflamatorios se libera de I κ B y se transloca al núcleo para llevar a cabo un rol modulador, activando la transcripción de genes dianas tales como IL-1, IL-6 o TNF- α . Existen estudios en los cuales se ha demostrado que esta respuesta puede ser modulada a través de la dieta.

- Definición Operacional: La translocación de NF- κ B se comprobó en células hipocampales de ratas *Sprague Dawley* de 4-5 meses de edad y 14 meses, y en células de línea celular PC12 que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión, mediante: 1) Evaluación visual por microscopía confocal de la localización de NF- κ B en la célula a través de la técnica de IF, 2) Cuantificación relativa de la subunidad p65 de NF- κ B a través de Western blot.

4.2.3 Estrés oxidativo

- Descripción de la variable: *Variable dependiente*.
- Definición Conceptual: Desequilibrio de la homeostasis entre la maquinaria antioxidante interna y la generación de especies reactivas de oxígeno a favor de estas últimas que provocan inflamación y posterior destrucción celular. Durante este proceso de estrés oxidativo e inflamación se ha evidenciado la activación de diversas cascadas de señalización celular y entre ellas las que involucran la activación del NF- κ B.
- Definición Operacional: Se comprobará mediante la identificación del biomarcador de estrés oxidativo 8OHdG a través de inmunofluorescencia, que permite identificar productos de la oxidación del ADN causados por radicales libres al ADN nuclear y mitocondrial en hipocampo de rata y en células PC12.

4.5 FUENTES Y MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Métodos de recolección de datos: Fuentes Primarias:

- Bitácora de administración de dosis de ASX a las ratas y al cultivo de línea celular PC12.

- Lector de Placas *Elx808 de Biotek®*.
- Microscopio confocal de barrido *laser Nikon CI Plus*.
- Programa *VisionWorks®LS Analysis Software-UVP*.
- Software de análisis de imagen *Image J 1.6*.
- Software de Análisis de imagen *EZ-CI 3.90 Viewer* y *NIS-Elements Viewer 4.20*.

4.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión: Neuronas hipocampales de ratas *Sprague Dawley* de 4-5 meses de edad y 14 meses, y células de línea celular PC12.

Criterios de exclusión: Células que no se pudieron evaluar por los siguientes motivos:

- Que no sobrevivieron a procesos de manipulación operador(a) dependiente (Extracción del cerebro, por ejemplo).
- Fijación inadecuada.
- Muestras de células hipocampales con artefactos en general.
- Muestras de células hipocampales cuya rata de origen tuvo algún trastorno metabólico o patología hipocampal subyacente.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.7.1 Inmunofluorescencia

Los datos obtenidos de los experimentos de inmunofluorescencia *in vivo* e *in vitro* se expresan como promedio \pm error estándar medio. Los resultados fueron analizados mediante el test ANOVA de una vía. Posteriormente se utilizó el test de comparaciones múltiples de Tukey para datos con tendencia gaussiana y test de comparación múltiple de Dunn para datos con tendencia no gaussiana. Se consideró una significancia estadística para $p \leq 0,05$.

4.7.2 Western blot

Los datos obtenidos de los experimentos de Western blot *in vivo* e *in vitro* se expresan como porcentaje del promedio \pm error estándar medio. En primer lugar, los resultados se normalizaron con respecto al control de carga, y luego con respecto al control experimental. Posteriormente se calculó el porcentaje y se utilizó el test ANOVA de una vía, para luego utilizar test de comparación múltiple de Dunn para datos con tendencia no gaussiana. Se consideró una significancia estadística para $p \leq 0,05$.

4.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

4.8.1 No maleficencia

Los animales de experimentación que se utilizaron, es decir las ratas *Sprague Dawley* de 4-5 meses y 14 meses de edad, se obtuvieron del Bioterio de la Universidad de Valparaíso, del cual está a cargo el Médico veterinario Enzo Seguel, ubicado en las dependencias del edificio Bruno Günther. Desde el comienzo de los procedimientos experimentales, se les suministró comida y agua *ad libitum* y además las dosis de ASX, las cuales son inocuas para la salud de las ratas.

Todo esto está bajo las condiciones establecidas por el FAWC (Farm Animal Welfare Committee), conocidas como las 5 libertades, las que establecen lo siguiente:

- Que los animales no padezcan ni hambre ni sed.
- Que no sufran malestar físico ni dolor.
- Que no sufran heridas ni enfermedades.
- Que puedan ajustarse a su comportamiento normal y esencial.
- Que no sufran miedo ni angustia.

Además, con respecto a la experimentación con estos animales, nos limitamos a seguir las normas ARRIVE del Centro nacional para el reemplazo, refinamiento y reducción de animales en

experimentación (3Rs) de Inglaterra, que es utilizado por el Comité Institucional de Bioética para Investigación y Cuidado Animal de la Universidad de Valparaíso (CIBICA).

REEMPLAZO: se aplicó este concepto, debido a que sustituimos parte de los animales de experimentación por cultivos celulares.

REDUCCIÓN: Se aplicó este concepto, debido a que utilizamos la menor cantidad posible de animales de experimentación, utilizando 6 animales por cada situación a investigar, y a partir de esto obtuvimos muestras estadísticamente significativas. Además, se compartieron los animales con otros estudiantes para así maximizar la información obtenida de cada rata.

REFINAMIENTO: se aplicó este concepto para evitar el estrés y sufrimiento del animal de las siguientes formas.

- ✓ Proveer de sustrato de papel y cilindros de cartón para su enriquecimiento durante su estadía en el bioterio.
- ✓ Evitar el flujo reiterado de personal no esencial dentro de la sala del bioterio.
- ✓ Mantener un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas.
- ✓ Mantener un extractor de aire y una temperatura apta para su desarrollo a través de aire acondicionado.
- ✓ Mantener Comida y agua *ad libitum*.
- ✓ Mantener bajos niveles de ruido en la sala.
- ✓ En cuanto al procedimiento de eutanasia, se llevó a cabo con una cámara de gases y anestésico.

4.7.2 Beneficencia

Con este estudio se benefició a las ratas envejecidas, mejorando sus capacidades cognitivas y disminuyendo la inflamación, lo cual se podría extrapolar a los humanos de forma indirecta.

Este proyecto además aporta información en el área de la investigación de los suplementos nutricionales.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MODELO *IN VIVO*

5.1.1 Animales

Para la realización de los experimentos se utilizaron un total de 24 ratas macho *Sprague Dawley*, de los cuales 12 animales corresponden a ratas de aproximadamente 14 meses de edad y otros 12 animales corresponden a ratas de entre 4 y 5 meses de edad que se utilizaron como control experimental. Todos estos roedores de experimentación fueron obtenidos desde el Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Los animales permanecieron en una habitación acondicionada con una temperatura ambiente de 22 ± 1 °C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con acceso a agua y comida *ad libitum*. En relación a la alimentación de las ratas, se utilizó pellet LabDiet® durante todo su crecimiento en el bioterio, los cuales cumplían con los requerimientos nutricionales necesarios. Las ratas fueron manipuladas de acuerdo a los protocolos de uso de animales de experimentación, aprobado por CIBICA, de la Universidad de Valparaíso.

5.1.2 Diseño experimental modelo *in vivo*

Los 12 animales envejecidos (14 meses) fueron subdivididos en 2 grupos: 6 animales fueron alimentados con dieta normal y suplementados con aceite de Oliva extra-virgen comestible (vehículo) que corresponden al grupo control; y otros 6 fueron alimentados con dieta normal y suplementados con ASX (AK Scientific, Inc .CA, USA, con 97% de pureza) diluida en aceite de oliva. De la misma manera los 12 animales jóvenes fueron subdivididos en 2 grupos: 6 animales fueron alimentados con dieta normal y suplementados con aceite de Oliva extra virgen y el otro grupo de 6 animales fueron alimentados con dieta normal y suplementados con ASX diluida en aceite de oliva. La finalidad de realizar experimentos en ratas jóvenes es debido a la

necesidad de tener un control con el cual se compare el modelo envejecido, y así poder establecer si la suplementación con ASX genera cambios beneficiosos que se asemejen a las condiciones basales de una rata joven.

Esta categorización de animales se realiza con fines teóricos, ya que los animales permanecen en las mismas jaulas con los mismos compañeros.

Para identificar al animal suplementado con ASX del animal suplementado con vehículo se realizó una marca con un rotulador permanente de color rojo en la base de la cola del animal alimentado con ASX y con un marcador de color negro en la base de la cola del animal alimentado con vehículo. En el caso de que el animal se encuentre solo en su jaula, se identifica con una señalética en el exterior de la caja. Durante la semana previa a la suplementación con ASX, se ingresó al bioterio para interactuar con los animales y generar una habituación mutua, siempre manteniendo las normas de vestimenta y seguridad para así poder disminuir el estrés del animal ante nuestra presencia en la etapa de experimentación.

5.1.2 Suplementación/ Dosis

La suplementación con ASX se realizó vía oral en dosis diarias de 4 mg a cada animal. La preparación del suplemento se realizó cada día partiendo con la dilución del antioxidante en aceite de oliva. En el caso de los grupos controles se proporcionó el mismo volumen de aceite de oliva utilizado en la dilución del antioxidante. La suplementación se efectuó durante 20 días consecutivos a la misma hora, concertando esa cantidad de días de acuerdo a la literatura y a estudios previos realizados en el laboratorio. La administración se realizó mediante una pequeña sonda plástica que contenía la solución diaria de suplemento, el cual se administró a través de una jeringa tuberculina sin aguja. Para evitar la manipulación innecesaria del animal y por lo tanto estados de estrés, solamente se acerca la sonda a la boca del animal, esperando que succione y así inyectar la solución completa.

5.1.3 Eutanasia Animales

Al término de la suplementación, a los animales se les realizó ensayos experimentales de conducta para otra investigación durante una semana, en virtud de minimizar la cantidad de animales en estudio, y por ende atendiendo al Principio de Reducción de las 3R. Finalmente los animales fueron anestesiados con solución de Halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano, con 99% pureza de Sigma-Aldrich), en un recipiente de plástico con tapa hermética. Una vez que el animal se sedó, se midieron los reflejos en sus extremidades y posteriormente se sacrificó. El corte se efectuó en la región cervical con el uso de instrumental adecuado (guillotina para ratas) permitiendo disponer de la región cefálica de manera más rápida, donde luego se traspasó a una placa de Petri plástica con papel absorbente en su interior. El resto del cuerpo del animal se envasó, etiquetó y eliminó como material biológico a través del bioterio según los protocolos correspondientes.

5.1.4 Obtención de Hipocampo

Se realizó un corte sagital en el cuero cabelludo del animal con una hoja doble filo (tipo Gillette). Con ayuda de una tijera quirúrgica se abrió el cráneo y con pinzas quirúrgicas se abrieron las meninges y se dejó expuesta la masa encefálica. Con una espátula curva se extrajo el cerebro del animal y se colocó encima de una placa petri con papel filtro, agregando solución de PBS (buffer fosfato salino) 1X frío (Ver anexo A.1) y así limpiar el exceso de sangre. Se realizaron cortes coronales con bisturí a fin de eliminar el cerebelo y la región frontal del cerebro. Se separaron ambos hemisferios, y se procedió a obtener el hipocampo de cada hemisferio con la ayuda de una espátula recta. Éste se disecciono en tres partes y se traspasó a tubos eppendorf. Dos de las tres secciones se congelaron a -80°C para la realización de técnica de Western blot y la tercera se introdujo en PFA (Paraformaldehído al 4% en PBS con 4% de sacarosa) para la fijación del tejido.

5.2 MODELO *IN VITRO*

5.2.1 Cultivo Células

El cultivo celular utilizado fue de la línea PC12, que son células aisladas de feocromocitoma de rata, provista por colaboración del laboratorio del Dr. Tulio Núñez, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. El cultivo fue transportado y adquirido en botella de cultivo T-25 (con un área de 25 cm², Trueline, USA), el cual se tripsinizó (ver anexo A.2.4 y B), obteniendo un pellet celular que se resuspendió en 1 mL de medio de crecimiento completo que contenía DMEM con 10% de antibiótico anti anti 100X (ver anexo A.2), suplementado con 10% suero de caballo y 5% suero bovino fetal (todo obtenido de Gibco by Life Technologies, USA.). Posteriormente se procedió a sembrar una nueva botella tomando 150 µL de la suspensión celular (1.000.000 de células aproximadamente) en 8 mL de medio de crecimiento completo.

El crecimiento del cultivo se realizó en incubadora a 37°C con 5% CO₂ y 95% de O₂, procurando tener un porcentaje de confluencia no superior al 70%, por lo que realizaba subcultivo celular cada 3 días.

5.2.2 Diseño Experimental modelo *in vitro*

El diseño experimental se constituyó de 4 condiciones, las cuales fueron:

- Cultivo control.
- Cultivo control + H₂O₂.
- Cultivo pre-tratamiento con ASX.
- Cultivo pre-tratamiento con ASX + H₂O₂.

Para lo anterior, se utilizaron placas de cultivo de 35 mm (Trueline, USA), donde se sembraron 70 µL de suspensión celular PC12 (aproximadamente 450.0000 células) en 3000 µL de medio completo (ver anexo A.2.2) por cada placa, por lo tanto, para un experimento (n = 1) se sembraron 8 placas (4 placas para inmunofluorescencia y 4 placas para Western blot) atendiendo a las condiciones ya mencionadas. En el caso de las condiciones que se destinaron para

inmunofluorescencia, las células se hicieron crecer sobre cubreobjetos de vidrio esterilizados de 12 mm de diámetro. Las células se incubaron durante 3 días, revisando que el porcentaje de confluencia no alcanzara el 70%. Una vez que las células se encontraron en las condiciones deseadas, se eliminó el medio de crecimiento completo y se lavaron las células con 500 μ L PBS 1X estéril. En esta etapa del proceso experimental se agregó a las células medio de crecimiento restringido (ver anexo A.2.3) el cual consistió en DMEM 10% de antibiótico anti anti 100X, suplementado con 1% suero bovino fetal, para evitar que las células siguieran multiplicándose y creciendo. Para el caso de las condiciones suplementadas con ASX, se utilizó un extracto obtenido de *Lithodes antarcticus*, más conocida como la centolla patagónica o magallánica a través de la empresa BIOTEX S.A., Santiago, Chile, provista a una concentración inicial de 467 mM en solución etanólica.

5.2.2.1 Pre-tratamiento con ASX

Con la finalidad de incorporar este extracto del antioxidante al medio de cultivo, fue necesario realizar diversas diluciones hasta conseguir la concentración adecuada: en primer lugar, se preparó un “Stock 1” al 5 mM diluyendo la concentración inicial en etanol absoluto. Luego a partir del “Stock 1” se preparó un “Stock 2” al 500 μ M también con etanol absoluto. Finalmente se extrajo 60 μ L del “Stock 2” y se diluyó en 2940 μ L de medio de crecimiento restringido (ver anexo A.2.3), que es el volumen final que se agrega a cada placa suplementada con ASX 10 μ M. Para las condiciones que no se suplementaron con ASX (es decir la condición control y H₂O₂), se agregó 60 μ L de etanol absoluto en 2940 μ L de medio de restricción, que es el volumen que se agrega a cada placa. Todas las condiciones se incubaron por 24 horas.

5.2.2.2 Estimulación con peróxido de hidrógeno

Pasadas las 24 horas de pre-tratamiento, se eliminó el medio con ASX y se lavó cuidadosamente con PBS 1X estéril, para luego estimular las placas correspondientes con H₂O₂ (30% 100 vol, Winkler). De la concentración inicial de H₂O₂ al 8,82 M, se realizó un “Stock 1” al 1 M, y a partir de este se realizó un “Stock 2” al 10 mM. De este “Stock 2” se extrajo 60 μ L y se diluyó en 2940 μ L de medio de restricción quedando el volumen final a una concentración de 200

μM . Se incubó con H_2O_2 durante 1 hora. Luego de transcurrido el tiempo, se eliminó el medio con H_2O_2 , se lavó cuidadosamente con PBS 1X estéril y se agregó medio de restricción, dejando a las células recuperarse por 24 horas.

5.2.3 Inmunofluorescencia

5.2.3.1 Inmunofluorescencia en Hipocampo

Al término de la fijación, se procedió a lavar con PBS 1X para luego sumergir las secciones en sacarosa al 30%, hasta que el hipocampo descendiera a la base del tubo eppendorf. En vibratomo (Leica VT1200S) se realizaron cortes de 50 μm de grosor y se traspararon a una placa de cultivo de 24 pocillos (Trueline, USA) manteniendo la identificación de las rebanadas de hipocampo de acuerdo al tratamiento y edad de cada rata.

Posterior a la realización de los cortes de hipocampo, se realizó recuperación antigénica inducida por calor con buffer citrato de sodio pH 6.0 en vaporera (Oster modelo CKSTST7711) cercano a los 97°C. Se precalentó una placa de cultivo de 24 pocillos con buffer citrato de sodio durante 10 minutos y luego se sumergieron las muestras en los pocillos correspondientes. Las muestras se mantuvieron durante 20 minutos en la vaporera, y posteriormente se dejaron enfriar.

Posterior a la recuperación antigénica se continuó con lavados en PBS-tritón al 0,2% (ver anexo A.3) y se incubaron las muestras con solución de permeabilización (ver anexo A.3) a 4°C por 24 hrs. Posteriormente se lavó con PBS-tritón al 0,2% y se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal anti NF- κ B (Conejo anti NF- κ B p65, Santa Cruz, USA) y con el anticuerpo primario monoclonal anti 8OHdG (Ratón anti 8OHdG, Santa Cruz, USA). Al término de la incubación, se continuó con lavados y se incubó para NF- κ B con un anticuerpo secundario fluorescente anti conejo (Alexa Flúor burro anti-conejo 546 nm de Life Technologies), y para 8OHdG se incubó con anticuerpo secundario fluorescente anti ratón (Alexa Flúor cabra anti-ratón 488nm de Life Technologies) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de lavados y terminando con una tinción nuclear con 1 μL de colorante fluorescente Hoechst 33342 por cada 1000 μL de PBS. El montaje del tejido se efectuó en portaobjeto con medio de montaje hidrofílico (Medio de Montaje para fluorescencia Dako, USA) y cubreobjetos libre de talco (Deltalab).

5.2.3.2 Inmunofluorescencia cultivo celular

En este caso, se tuvo en consideración retirar cuidadosamente los cubreobjetos de las placas de cultivo y posicionarlas en la placa de 24 pocillos. Se continuó con lavado en PBS-tritón 0,2% y posterior fijación con PFA al 4% con 4% de sacarosa durante 40 minutos. Se incubó en solución de permeabilización por 24 hrs, y se continuó con el mismo procedimiento de inmunofluorescencia mencionado anteriormente. Todo lo anterior, se realizó protegiendo la placa de la luz directa y utilizando para los lavados un homogeneizador orbital (Labnet Orbit P4).

5.2.4 Western Blot

5.2.4.1 Extracción de Proteínas de hipocampo

Muestras de hipocampo (10 mg) se lisaron con buffer de lisis Nonidet P-40 (ver anexo A.4) al cuál se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X, Thermo Scientific, USA) Posteriormente se sonicó durante 5 s a máxima potencia (Ultrasonic procesor de Colpalmer) y luego se dejó actuar el buffer de lisis durante 2 horas con agitación en vortex (LSE™ de Corning) durante 15 s cada 30 min. Posteriormente se centrifugaron (Microcentrífuga Universal 32 R de Hettich) a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C y finalmente se recolectó el sobrenadante obtenido y se almacenó en alícuotas de 35 µL a - 80°C. La posterior determinación de concentración de proteínas se realizó con el método de Bradford (Lector de Placas Elx808 de Biotek) (ver anexo C).

5.2.4.2 Extracción de proteínas de cultivo de células PC12

Primero se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS frío 1X. Posteriormente se lisaron con buffer de lisis NP-40 al cuál se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X, Thermo

Scientific,USA). Luego se dejó actuar el buffer de lisis durante 2 horas con agitación en vortex (LSE™ de Corning) de 15 seg cada 30 min. Finalmente se centrifugaron (Microcentrífuga Universal 32 R de Hettich) a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C para luego recolectar el sobrenadante y almacenarlo a -80°C en alícuotas de 35 µL. La posterior determinación de concentración de proteínas se realizó en un lector de placas (Elx808 de Biotek) con el método de Bradford.

5.2.4.3 Electroforesis y Western Blot

Primero se denaturaron las muestras obtenidas incubándolas durante 10 min a 95°C en un bloque térmico (Termoblock LSE® de Corning) en Laemmli Sample Buffer 5x. Para favorecer la separación de la subunidad p65 del NF-κB se utilizó una concentración de acrilamida al 12% preparada a partir de una solución de Acrilamida/Bis-Acrilamida (37.5:1 30% p/v, Winkler). Luego las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones denaturantes a 100 volts durante 3 horas a 4°C en una solución tampón de Tris-Glicina. Para lo anterior se utilizó una cámara de electroforesis (MiniPROTEAN® TetraCell, Biorad, USA) conectada a una fuente de poder (Power pack Basic, Biorad, USA). A continuación se transfirieron a una membrana de PVDF (Polifluoruro de Vinilideno) de 0,45 µm (Biorad, USA) utilizando un sistema de transferencia semi-húmeda durante 16 h a 4°C en la solución Laemmli Running Buffer 1X. Posteriormente se incubaron las membranas de PVDF en una solución de bloqueo de TBS-T al 0,05% con leche descremada al 5% durante 1,5 h a temperatura ambiente en un agitador digital orbital (2800A de Mrc Laboratories) con agitación constante, para luego ser incubadas con anticuerpo primario anti p65-NF-κB (D14E12 XP® Rabbit mAb de Cell Signaling) diluido 1:7000 en solución de bloqueo durante 16 h a 4°C con agitación constante.(Agitador Digital Orbital Shaker de Heathrow Scientific). Al finalizar la incubación, se realizaron 2 lavados de 10 min cada uno con una solución de TBS-T al 0,05% y a continuación, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Goat anti IgG Rabbit Pierce® Antibody de Thermofisher, USA) conjugado con peroxidasa en la solución de bloqueo con una dilución de 1:10000 durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con una solución de TBS-T (tris buffer salino – Tween 20) al 0,05% durante 10 min cada lavado. Finalmente, se visualizaron las bandas mediante un kit de quimioluminiscencia (Clarity™

Western ECL Blotting, Biorad, USA) y se capturaron las imágenes a través de una cámara digital (Biochemi 510 de UVP) conectado a un transiluminador (Epichemi 510 de UVP) controlado con el programa VisionWorks®LS Analysis Software-UVP. Las intensidades de las bandas capturadas se cuantificaron utilizando el software Image J 1.6. Después del procedimiento comentado, se siguió el protocolo de *stripping* (ver anexo D) para la posterior identificación de la proteína control. Para ello, posterior al *stripping*, se incubaron nuevamente las membranas con una solución de bloqueo de TBS-T 0,05% % con 5% de leche descremada durante 1,5 h a temperatura ambiente, para luego incubar con un anticuerpo primario monoclonal anti β III-Tubulina (Promega Corporation, USA) con una dilución de 1:7000 en solución de bloqueo durante 16 h a 4°C con agitación constante. Al terminar la incubación, se realizaron 2 lavados de 10 min cada uno con una solución de TBS-T 0,05% y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, (Goat anti IgG mouse Pierce® Antibody de Thermofisher) conjugado con peroxidasa en la solución de bloqueo con una dilución de 1:10000 durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Finalmente se visualizaron las bandas de la misma forma que para el anticuerpo anterior.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1 ESTUDIOS *IN VIVO*

6.1.1 Localización intracelular del NF- κ B en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal o suplementada con astaxantina.

Para la realización del primer objetivo de este trabajo de investigación se realizaron experimentos de Inmunofluorescencia, a través de los que se estudió la localización sub-celular de NF- κ B en las regiones CA1-CA3 del hipocampo de ratas *Sprague Dawley* para los distintos grupos en estudio. La FIGURA 6.1 muestra las diferencias observadas en la distribución de este factor de transcripción, donde las imágenes A y B corresponden a hipocampos de ratas jóvenes sin y con suplementación de ASX respectivamente. La comparación de estas imágenes sugiere que, no se observaron cambios en la distribución y localización de NF- κ B en estos grupos. La imagen C corresponde a un hipocampo de rata envejecida y suplementada sólo con vehículo, en ella la inmunodetección de NF- κ B sugiere que se encuentra localizado principalmente a nivel nuclear y en la imagen D, que corresponde al hipocampo de una rata envejecida y suplementada con ASX, sugiere que NF- κ B no se localiza en el núcleo.

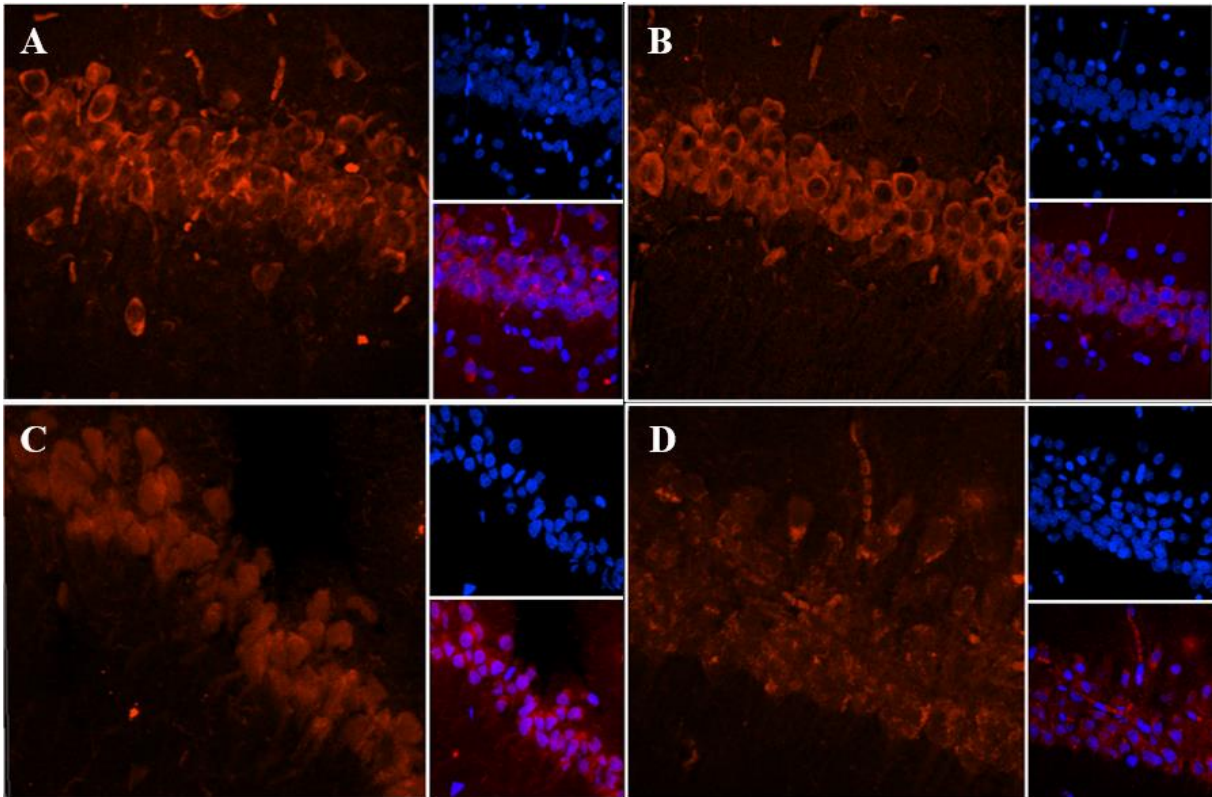


FIGURA 6.1 *Inmunofluorescencia de NF-κB (p65/RelA) en hipocampo de ratas.*

Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las zonas CA1-CA3 de hipocampo de ratas *Sprague Dawley*. En rojo se observa la fluorescencia de NF-κB obtenida excitando a 546 nm y en azul se observa la fluorescencia obtenida a 360 nm que corresponde a la contra-tinción nuclear con Hoechst. (A) Hipocampo de rata joven suplementada con vehículo. (B) Hipocampo de rata suplementada con 4 mg de ASX durante 20 días. (C) Hipocampo de rata envejecida suplementada con vehículo. (D) Hipocampo de rata envejecida suplementada con 4 mg de ASX durante 20 días.

Estos resultados se confirman con la cuantificación de los niveles nucleares de NF- κ B realizado en las zonas CA1-CA3 del hipocampo de las ratas en estudio. La FIGURA 6.2 muestra que las columnas que representan a las ratas envejecidas suplementadas con vehículo (Envejecidos VEH) identificadas con asterisco presentan una mayor intensidad de fluorescencia para NF- κ B en el núcleo significativa con respecto a la condición Joven VEH. Además, en el análisis estadísticos no se observan diferencias significativas en cuanto a las translocación de NF- κ B entre el grupo Envejecido ASX y las condiciones Joven VEH y Joven ASX.

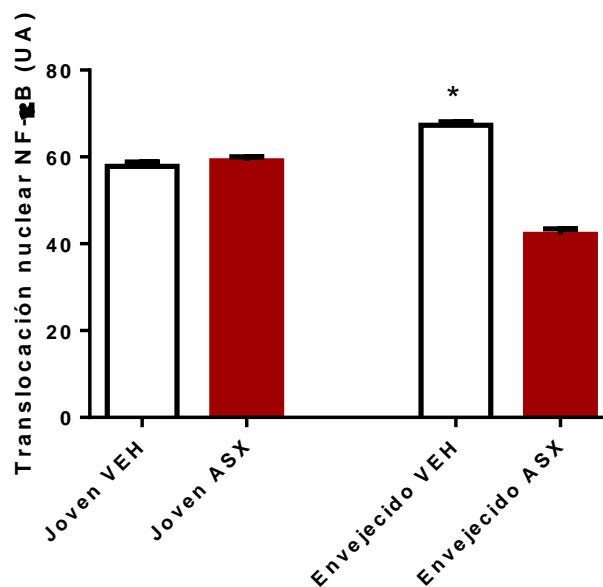


FIGURA 6.2 Efecto de astaxantina en translocación nuclear de NF- κ B en hipocampo de ratas Sprague Dawley.

Cambios en la translocación nuclear de NF- κ B con una dosis de ASX de 4 mg diarios por un periodo de 20 días. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar medio de la cuantificación de los núcleos ($n \geq 68$). * Indica diferencia significativa con respecto al animal joven VEH a $p \leq 0.05$ evaluada con ANOVA de una vía (no paramétrico) , y test de comparación múltiple de Dunn.

6.1.2 Contenido relativo de la proteína NF- κ B en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.

Para la realización del segundo objetivo se determinó, a través de Western Blot, si existía un cambio en los niveles de expresión de NF- κ B en las células de hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas al ser suplementadas en su dieta con 4 mg de ASX. En la FIGURA 6.3 A se muestran imágenes representativas de las electroforesis de proteínas realizadas para determinar los niveles de NF- κ B y de β III Tubulina agrupados según las condiciones (3 réplicas biológicas). En la FIGURA 6.3 B se observa un gráfico realizado a partir del porcentaje las medias de los niveles de NF- κ B proveniente de la cuantificación de la intensidad de las bandas de las imágenes de electroforesis, los que fueron normalizados con respecto a β -III Tubulina. Se graficaron los resultados tras ser normalizados respecto al control (Rata joven tratada con vehículo) en los distintos grupos evaluados. Al realizar el análisis de los datos (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Dunn) no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ASX y los grupos tratados con VEH, en ninguna de las condiciones evaluadas (Jóvenes VEH 1.000 ± 0.3602 , jóvenes ASX 1.163 ± 0.5532 , envejecidos VEH 1.080 ± 0.4026 , Envejecidos ASX 0.9584 ± 0.2951) ($p \leq 0,05$ $n=6$). Tampoco se observó diferencias significativas al comparar el grupo de ratas envejecidas con el grupo de ratas jóvenes.

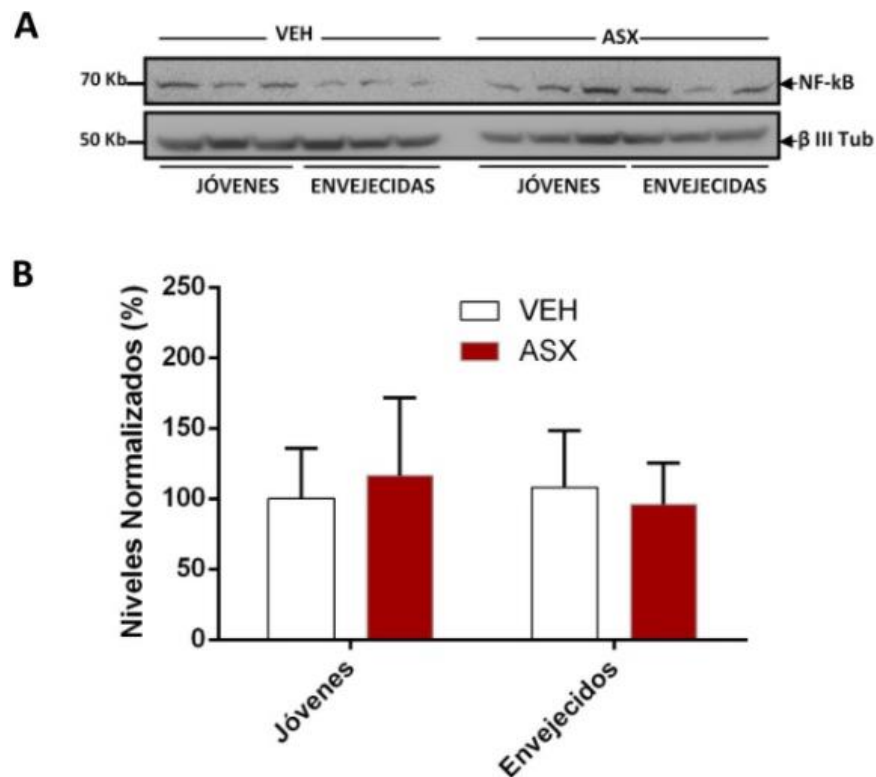


FIGURA 6.3 Efecto de astaxantina sobre el contenido relativo de la proteína NF-κB en células de hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas.

(A) imágenes representativas de las electroforesis de proteínas obtenidos mediante Western Blot para calcular el contenido de NF-κB en hipocampo de ratas *Sprague Dawley* jóvenes y envejecidas tratadas con 4 mg de ASX durante 20 días. (B) Gráfico con los resultados presentados como porcentaje del promedio \pm error estándar (6 réplicas biológicas) del contenido de la proteína NF-κB en hipocampo de ratas *Sprague Dawley* en las mismas condiciones.

6.1.3 Presencia de marcadores de daño al ADN en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con ASX.

Para la realización del tercer objetivo se realizaron inmunofluorescencias que permiten identificar a nivel nuclear la presencia de 8OHdG en las regiones CA1-CA3 de hipocampo de ratas *Sprague Dawley* en los distintos grupos. La FIGURA 6.4 muestra las diferencias observadas

en cuanto a la presencia de este marcador de daño oxidativo al ADN en las regiones CA1-CA3 del hipocampo de ratas en las distintas condiciones. Las imágenes A y B corresponden a hipocampos de ratas jóvenes sin y con suplementación de ASX respectivamente, estas no presentaron diferencias observables en la intensidad nuclear de 8OHdG. Las imágenes C y D que corresponden a hipocampo de ratas envejecidas sin y con suplementación de ASX respectivamente, presentan un aumento generalizado de 8OHdG.

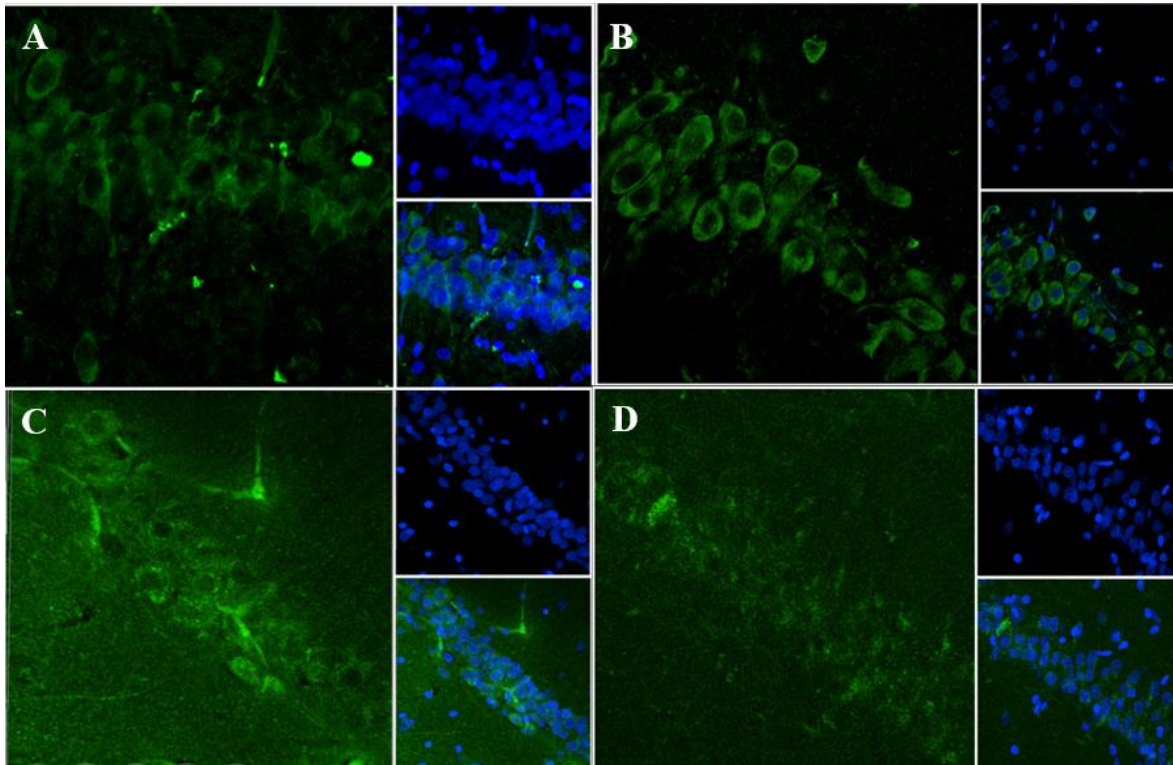


FIGURA 6.4 *Inmunofluorescencia de 8OHdG en hipocampo de ratas.*

Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las zonas CA1-CA3 de hipocampo de ratas. En verde se observa la fluorescencia de 8OHdG obtenida excitando a 488 nm y en azul se observa la fluorescencia obtenida a 360 nm que corresponde a la contra-tinción nuclear (Hoechst). (A) Hipocampo de rata joven suplementada con vehículo. (B) Hipocampo de rata joven suplementada con 4 mg de ASX durante 20 días. (C) Hipocampo de rata envejecida suplementada con vehículo. (D) Hipocampo de rata envejecida suplementada con 4 mg de ASX durante 20 días.

La FIGURA 6.5 muestra la cuantificación de los niveles de fluorescencia de 8OHdG nucleares de las regiones CA1-CA3 de los hipocampo de ratas. La columna que representa al grupo de ratas envejecidas suplementadas con vehículo identificadas con asterisco, presentó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia nuclear de 8OHdG con respecto a la columna del grupo joven suplementado con vehículo. Además la columna que representa al grupo de ratas envejecidas y suplementadas con ASX muestra una disminución significativa en los niveles de fluorescencia de 8OHdG respecto al grupo de ratas envejecidas suplementado con vehículo, y también con respecto al grupo de ratas jóvenes suplementadas con vehículo. Estos resultados sugieren que la suplementación de la alimentación de las ratas envejecidas con ASX previene el daño al ADN detectado en las ratas envejecidas alimentadas con dieta normal.

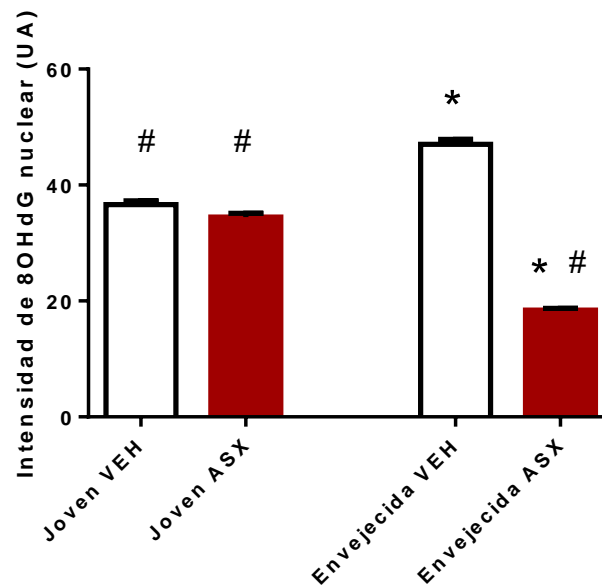


FIGURA 6.5 Efecto de astaxantina en la intensidad de fluorescencia nuclear de 8OHdG en hipocampo de ratas Sprague Dawley.

Cambios en los niveles de 8OHdG nuclear en hipocampo de ratas suplementadas con una dosis de ASX de 4 mg diarios por un periodo de 20 días. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar medio de la cuantificación de los núcleos ($n \geq 54$). * Indica diferencia significativa con respecto al animal joven VEH y # indica diferencia significativa con respecto a

envejecido VEH a $p \leq 0.05$ evaluada con ANOVA de una vía (no paramétrico) , y test de comparación múltiple de Dunn.

6.2 ESTUDIOS IN VITRO

6.2.1 Localización intracelular del NF- κ B en línea celular PC12 con y sin pre-tratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.

Para la realización del cuarto objetivo se realizaron inmunofluorescencias con el propósito de determinar la localización sub-celular de NF- κ B en células PC12 en cultivo sometidas a las distintas condiciones previamente descritas. La FIGURA 6.6 muestra las diferencias detectadas en la distribución sub-celular del factor de transcripción. Las imágenes A y B que corresponden a células PC12 sin y con suplementación de ASX respectivamente, y que además no fueron estimuladas con H₂O₂, no presentan cambios en la distribución sub-celular de NF- κ B el cual se observa predominantemente en el citoplasma. Sin embargo, en la imagen C que corresponde a células PC12 estimuladas sólo con H₂O₂, NF- κ B se observa preferentemente localizado en el núcleo en comparación con la imagen D, que corresponde a células PC12 pre-tratadas con ASX y estimuladas con H₂O₂, donde se detectó a NF- κ B localizado en el citoplasma, una distribución similar a la de los grupos que no fueron tratadas con H₂O₂.

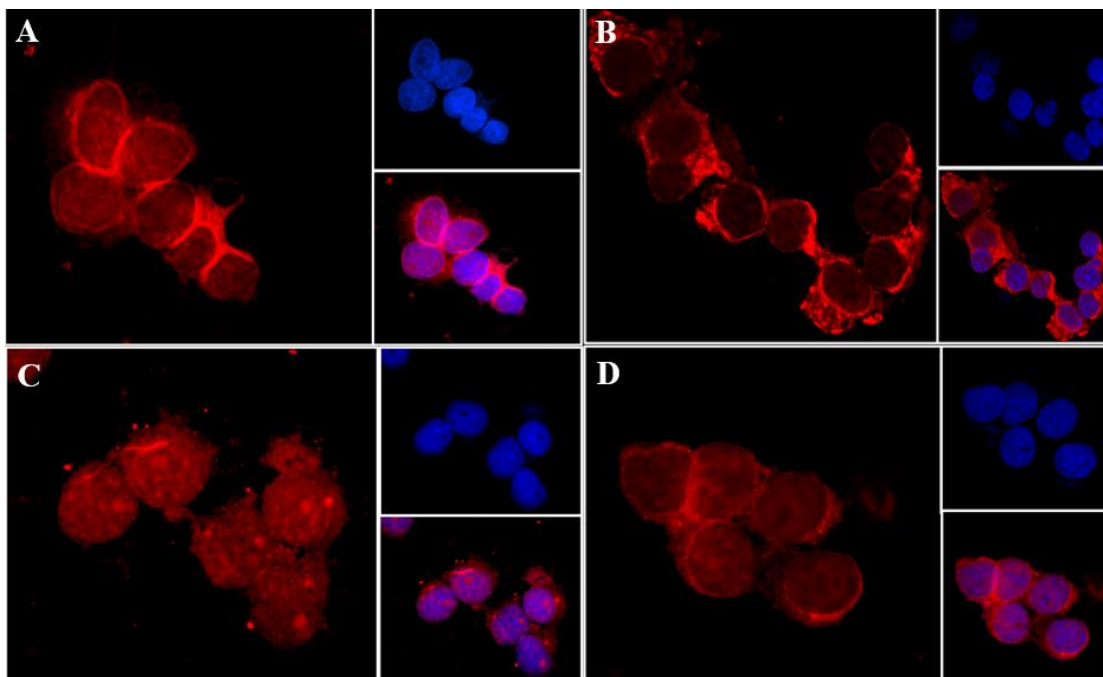


FIGURA 6.6 *Inmunofluorescencia de NF-κB (p65/RelA) en línea celular PC12.*

Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en células de línea PC12. En rojo se observa la fluorescencia de NF-κB obtenida excitando a 546 nm y en azul se observa la fluorescencia obtenida a 360 nm que corresponde a la contra tinción nuclear (Hoechst). (A) Células PC12 estimuladas con 200 μM de H₂O₂. (B) Células PC12 pre-tratadas con 10 μM de ASX y estimuladas con 200 μM de H₂O₂. (C) Células PC12 suplementada con vehículo. (D) Células PC12 suplementadas con 10 μM de ASX.

La FIGURA 6.7 muestra la cuantificación de los niveles de fluorescencia de NF-κB en las distintas condiciones de estudio. Se observan las diferencias que existen entre las columnas donde las células que fueron tratadas solo con H₂O₂ (identificadas con asterisco) presentan una mayor intensidad de fluorescencia para NF-κB en el núcleo, a diferencia de las células que fueron tratadas solo con el vehículo, las células que fueron tratadas solo con ASX, y las células que fueron pre-tratadas con ASX y estimuladas con H₂O₂, efectivamente presentan una menor intensidad de fluorescencia a nivel nuclear para NF-κB.

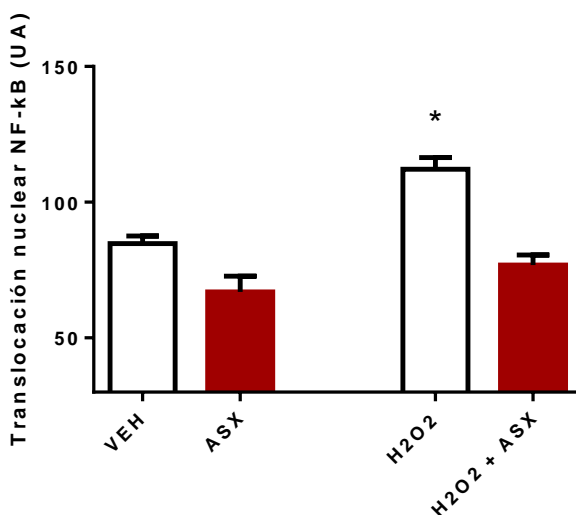


FIGURA 6.7 Efecto de astaxantina en translocación nuclear de NF-κB en células PC12.

Cambios en la translocación nuclear de NF-κB en células PC12 pre-tratadas con 10 μM de ASX durante 24 h y estimuladas con 200 μM de H₂O₂ durante 1 h. Los resultados se presentan como promedio ± error estandar medio (n≥31). * Indica diferencia significativa con respecto al vehículo a p≤0.05 evaluada con ANOVA de una vía, y test de comparación múltiple de Tukey.

6.2.2 Contenido relativo de NF-κB en línea celular PC12 con y sin previo tratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.

Para evidenciar si el pre-tratamiento con 10μM de ASX genera cambios en el contenido de proteína total de NF-κB, se utilizaron cultivos de células PC12 de acuerdo al modelo de estrés oxidativo inducido por 200μM de H₂O₂ durante 1 hora. En la FIGURA 6.8 A muestra las imágenes representativas de las electroforesis de proteínas a partir de las cuales se calcularon los niveles de NF-κB y de β III Tubulina agrupados según las condiciones (3 réplicas biológicas). En la figura 6.8 B se observa el gráfico obtenido a partir de la cuantificación del contenido de NF-κB

en las distintas condiciones normalizadas con respecto al contenido de β III Tubulina. La gráfica final muestra en porcentaje los resultados normalizados con respecto al control (VEH/-H₂O₂). Al realizar el análisis de los datos (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Dunn) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos (- H₂O₂ VEH 1.000 ± 0.1008 , - H₂O₂ ASX 0.8524 ± 0.2975 , + H₂O₂ VEH 0.3332 ± 0.1536 , + H₂O₂ ASX 0.6136 ± 0.07928) ($p \leq 0,05$ n=3).

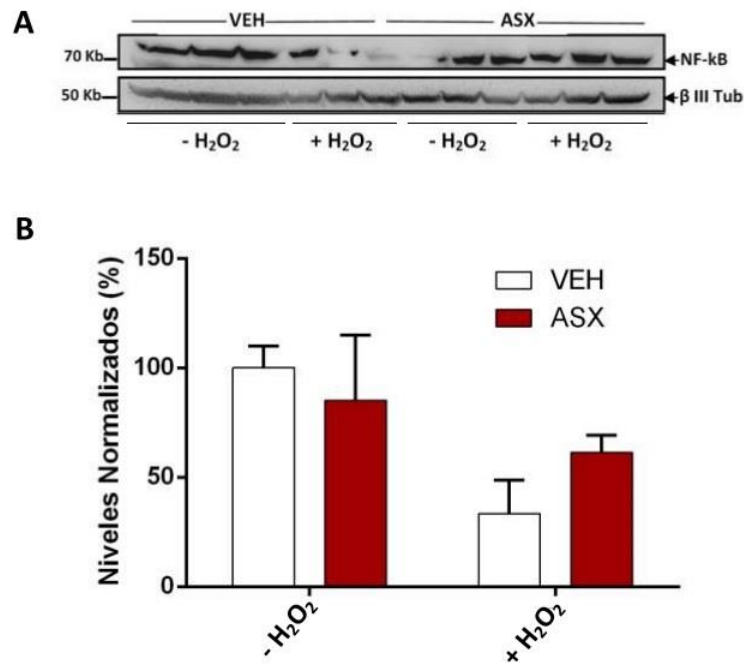


FIGURA 6.8 *Efecto de astaxantina sobre el contenido relativo de NF- κ B en células PC12.*

En A se observan los niveles de quimioluminiscencia obtenidos en Western Blot (3 réplicas biológicas) para la expresión de NF- κ B en células PC12 en un modelo de estrés oxidativo. En B se observa un gráfico con los resultados obtenidos presentados como un porcentaje del promedio \pm error estándar (3 réplicas biológicas) de la expresión de NF- κ B en células PC12 en las mismas condiciones.

6.2.3 Presencia de marcadores de daño al ADN en línea celular PC12 con y sin pretratamiento con ASX en un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno

Para la realización del sexto objetivo se realizaron inmunofluorescencias en células PC12 para medir los niveles nucleares de 8OHdG en las distintas condiciones. La FIGURA 6.9 muestra las diferencias en la intensidad de fluorescencia de 8OHdG. La imagen A que corresponde a células PC12 vehículo, en ella se observa una intensa marca para 8OHdG nuclear en comparación con la imagen B que corresponde a células de línea PC12 pre-tratadas con ASX, donde se observa una disminución aparente en la intensidad de la marca de 8OHdG nuclear. Por otra parte, la imagen C que corresponde a células de la misma línea celular estimuladas con H₂O₂, mostró una intensa marca nuclear de 8OHdG en comparación con la imagen D que corresponde también a células de la misma línea celular a la que se le realizó pre-tratamiento con ASX y luego se estimuló con H₂O₂, en donde se observó una disminución de la intensidad de 8OHdG nuclear.

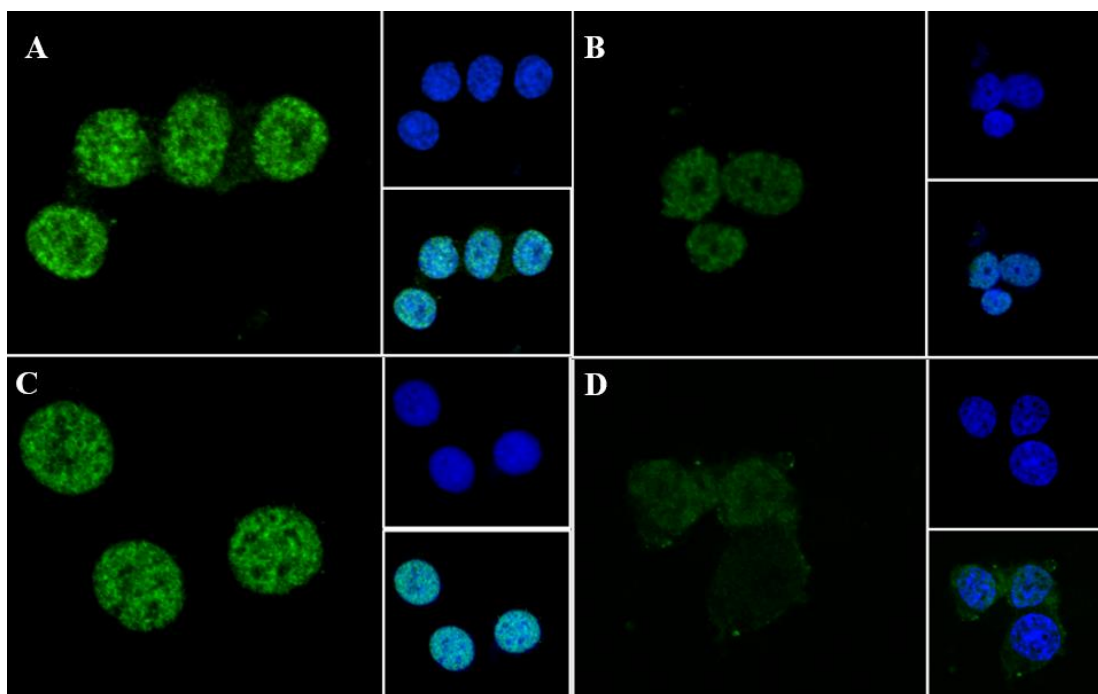


FIGURA 6.9 *Inmunofluorescencia de 8OHdG en línea celular PC12.*

Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en células de línea PC12. En verde se observa la fluorescencia de 8OHdG excitando a 488 nm y en azul se observa la fluorescencia obtenida a 360 nm que corresponde a la contra tinción nuclear (Hoechst). (A) Células PC12 suplementadas con vehículo. (B) Células PC12 pre-tratadas con 10 μ M ASX. (C) Células PC12 estimuladas con 200 μ M de H₂O₂. (D) Células PC12 suplementadas con 10 μ M de ASX y estimuladas con 200 μ M de H₂O₂.

La FIGURA 6.10 muestra la cuantificación de los niveles de fluorescencia de 8OHdG en las distintas condiciones de estudio. Se observan las diferencias existentes entre las columnas donde el grupo de células estimuladas con 200 μ M de H₂O₂ presentó un aumento significativo con respecto al grupo de células estimuladas sólo con el vehículo. Además el grupo de células pre-tratadas con ASX y estimuladas con 200 μ M de H₂O₂, presentó una disminución significativa con respecto al grupo suplementado con el vehículo y también con respecto al grupo estimulado con 200 μ M de H₂O₂.

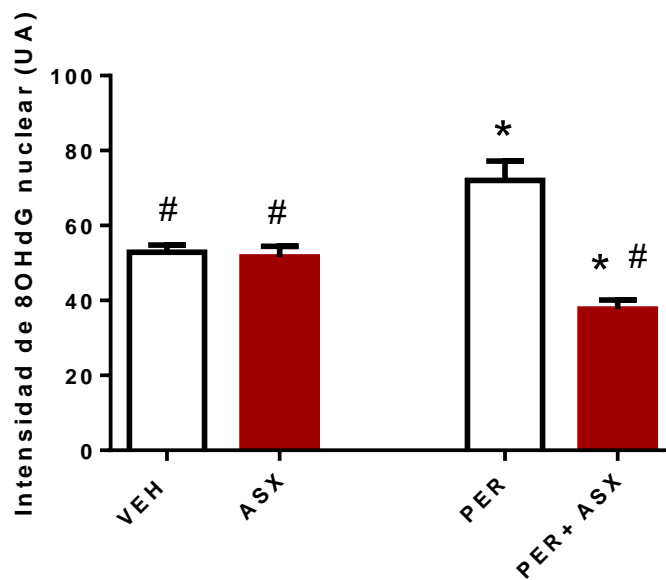


FIGURA 6.10 *Efecto de astaxantina en la intensidad de fluorescencia nuclear de 8OHdG en línea celular PC12*

Cambios en la intensidad nuclear de 8OHdG en células PC12 pre-tratadas con 10 μM de ASX durante 24 h y estimuladas con 200 μM de H_2O_2 durante 1 h. Los resultados se presentan como promedio \pm error estandar medio ($n \geq 54$). * Indica diferencia significativa con respecto a VEH y # indica diferencia significativa con respecto a PER a $p \leq 0.05$ evaluada con ANOVA de una vía, y test de comparación múltiple de Dunn.

CAPITULO 7. DISCUSION

7.1 EFECTO DE ASX SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE NF- κ B

Como ya se mencionó con anterioridad NF- κ B es un factor fundamental en el desarrollo del sistema nervioso ya que regula el crecimiento axonal y dendrítico por lo que se encuentra ampliamente expresado en neuronas. Además posee un rol crítico en respuestas inmunitarias innatas como por ejemplo en células gliales donde se incluyen astrocitos, microglía y oligodendrocitos ya que este tipo de células emplean NF- κ B como mediador que promueve la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias (39), lo que convierte a las proteínas NF- κ B en un potencial blanco terapéutico para estudios clínicos que busquen mejorar o prevenir la neuroinflamación (66).

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales que presenta una alta susceptibilidad al daño por neuroinflamación pero también se ve afectado por el proceso natural de envejecimiento. Esta estructura se caracteriza por presentar una red neuronal que juega un rol crucial en el aprendizaje y la memoria (19) lo cual se encuentra afectado durante la vejez, que en conjunto con otras patologías subyacentes da pie para el origen de enfermedades neurodegenerativas las cuales presentan una incidencia cada vez mayor debido al aumento de la esperanza de vida (67).

Existen diversos estudios que buscan modular la actividad de NF- κ B a través del consumo de sustancias ya sean sintéticas como de origen natural, y dentro de estos últimos, los antioxidantes se consideran la mejor opción debido a su fácil acceso. Vitamina C (68), resveratrol (69) y astaxantina (65) son algunos de los antioxidantes que han presentado efectos sobre la translocación de NF- κ B. En este estudio se evaluó ASX como un modulador de NF- κ B en hipocampo de ratas envejecidas donde se observó que este antioxidante disminuye la translocación de este factor de transcripción al núcleo (FIGURA 6.1 y 6.2), lo que sugiere que ASX presentaría un efecto protector de la neuroinflamación ante el estrés oxidativo subyacente al envejecimiento, lo cual es consistente con la literatura (65). Además ASX mejoraría funciones cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria a corto y largo plazo en ratas envejecidas (62) (55). Lo anterior se puede proyectar a estudios en humanos, ya que los niveles y distribución de NF- κ B en hipocampo son similares a los de ratas (70).

Para complementar los estudios *in vivo* de esta investigación, se realizó un estudio utilizando células PC12 pre-tratadas con ASX y estimuladas con H₂O₂ para evaluar cambios en la translocación de NF-κB ante un estímulo que produce inflamación aguda. Los resultados como se muestran en las FIGURAS 6.6 y 6.7 refieren resultados similares al estudio *in vivo*, ya que ASX disminuyó la translocación nuclear de NF-κB en presencia de daño oxidativo causado por H₂O₂.

Todo lo anterior se ve complementado con estudios en cultivo primario de neuronas hipocámpales de rata donde se evaluó el tiempo que toma NF-κB (RelA) en redistribuirse al núcleo, que resultó en una respuesta relativamente rápida ya que a los 80 minutos luego de haber sido estimulados con un neurotóxico, se produjo la translocación nuclear de este factor de transcripción (71).

7.2 EFECTO DE ASX EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE NF-κB

El rol de NF-κB y sus potenciales consecuencias en inflamación celular es objeto de intensa investigación en el envejecimiento. Se ha demostrado que la inhibición tanto genética como farmacológica de la señalización de NF-κB evita las consecuencias asociadas con la edad en roedores, prolongando significativamente su longevidad (72). Por otra parte, existen diversos estudios que correlacionan la suplementación de antioxidantes naturales adquiridos a través de la dieta, con los niveles de expresión de NF-κB, y sus efectos en la maquinaria antioxidante del organismo tales como vitamina E, licopeno, entre otros (41) (73) (74). En los últimos años, se han realizado un sin número de estudios evaluando el efecto de ASX sobre la activación de NF-κB, y principalmente el efecto de este antioxidante sobre las proteínas implicadas en la cascada de activación, y se ha evidenciado una modulación inhibitoria por parte de ASX en esta vía de señalización, ya que este antioxidante disminuye la actividad de proteínas quinasas activadoras de NF-κB tales como IKKα/β presentes en el citoplasma (cuya función es fosforilar IκBα y activar a NF-κB), por lo que ASX disminuiría la fosforilación de IκBα manteniendo secuestrado a NF-κB(RelA) en el citoplasma y en consecuencia disminuyendo su presencia a nivel nuclear. Todo lo anterior ha sido estudiado ante estímulos inflamatorios o de estrés oxidativo en microglía (75). En la figura 6.3 se muestran los resultados obtenidos en esta investigación, donde los niveles totales

de NF- κ B p65 en hipocampo de animales jóvenes y envejecidos suplementados con ASX, no exhiben diferencias significativas en la expresión relativa de este factor.

Es necesario destacar que, si bien esta investigación no mostró cambios en los niveles totales de expresión de NF- κ B, otros trabajos si se han evidenciado cambios en la distribución sub-celular de este factor, en donde la metodología empleada consistió en la separación de la fracción citoplasmática y nuclear, pudiendo de esta manera evaluar separadamente los extractos de proteínas y constatando diferencias en la expresión de este factor ante un pre-tratamiento con ASX y estímulos nocivos, lo cual resulta en la disminución nuclear de NF- κ B p65 con respecto al citoplasma en líneas celulares y modelos animales (65) (76). Además, en estructuras cerebrales tales como hipocampo (77) y células participes de la inflamación (78) la expresión proteica total de NF- κ B p-65 se utiliza como control, ya que permanece constante e invariable, en comparación con los niveles de expresión de NF- κ B p65 fosforilado que corresponde a su forma activada y unida al ADN.

Los resultados en esta investigación obtenidos del modelo *in vitro* fueron similares a los obtenidos en el modelo *in vivo* como se observa en la figura 6.8 donde la expresión relativa de NF- κ B p65 se mantiene constante en las 4 condiciones experimentales.

Cabe destacar que existen diversos mecanismos de autorregulación de NF- κ B mediante circuitos de retroalimentación negativa (*negative feedback loops*), que permiten finalizar de manera adecuada la respuesta de NF- κ B. Además, existe una amplia gama de complejos proteicos que contribuyen a que los procesos de inflamación sean rápidos y oportunos, y en el caso de NF- κ B, los propios mecanismos que activan su función transcripcional también son los encargados de favorecer la producción de los inhibidores de NF- κ B, los cuales generan distintos efectos según el nivel de la cascada de transducción de señales en que se presenten. Por ejemplo, proteínas que interfieren en pasos posteriores a la activación de receptores de membrana, pueden afectar toda la cascada de señalización río abajo, pero si las proteínas se presentan en etapas tardías de la activación de NF- κ B, se puede silenciar la transcripción de ciertos genes, pero no la respuesta completa de NF- κ B (79). Además, existe una retroalimentación clásica “NF- κ B-I κ B” que tiene como finalidad mantener una retroalimentación que controle la activación nuclear de RelA. La activación de esta retroalimentación se inicia al momento que NF- κ B ingresa al núcleo ya que este mismo factor induce la re-síntesis de sus propias proteínas inhibitorias I κ B- α/β que

contienen un dominio estructural (AR, “*ankyrin repeat*”), cuya función es recapturar e inactivar NF- κ B (80).

7.3 EFECTO DE ASX SOBRE MARCADORES DEL DAÑO AL ADN

Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* de esta investigación como se observan en las FIGURAS 6.4 y 6.5 evidenciaron que el tratamiento con ASX provocó una disminución de la intensidad del marcador de daño a ADN 8OHdG en relación a los animales que no fueron suplementados con una dieta rica en antioxidantes. Si bien en las imágenes 6.4 se observa una marca generalizada para el anticuerpo 8OHdG, este trabajo evaluó solo cambios en la intensidad nuclear de este marcador de daño al ADN, debido a que ASX prevendría la formación de 8OHdG al disminuir las EROs. Existe un aparente mecanismo de eliminación de 8OHdG, el cual consistiría en el clivaje de este residuo por la acción de enzimas con actividad endonucleasa/glicosilasa como parte del mecanismo de reparación del material genético nuclear, retirando este residuo del ADN, y migrando a través de la célula para finalmente, luego de circular por el sistema sanguíneo, ser excretado a través de la orina (81) (34) (82). No obstante, a diferencia del ADN nuclear, el ADN mitocondrial carece de la estructura cromatínica protectora, de histonas e intrones, por lo que posee mecanismos menos eficientes para combatir el daño causado por estrés oxidativo. La acumulación mitocondrial de 8OHdG se ha reportado como un factor de riesgo de diversas enfermedades, lo cual es de vital importancia en la herencia de enfermedades ligadas al ADN mitocondrial (83). Se calcula que diariamente, cada célula produciría 178 residuos de 8OHdG como producto de los procesos metabólicos normales, y además la tasa de producción sería más alta en animales y células que presenten un metabolismo más acelerado (81).

Cabe destacar que en la FIGURA 6.4 B y C correspondientes a ratas *Sprague Dawley* envejecidas sin y con suplementación con ASX respectivamente, se observa una intensa marca para 8OHdG citoplasmática, por lo que muchos se preguntaran el motivo por el cual se midió solo la intensidad nuclear de este marcador de daño al ADN, y es porque ASX no actuaría sobre los niveles de 8OHdG ya presentes y que se han acumulado durante largos periodos de tiempo,

sino que solo actuaría previniendo la formación de nuevas moléculas de 8OHdG a nivel nuclear y mitocondrial.

Lo mismo se podría discutir sobre los resultados de la medición de los niveles en la intensidad de 8OHdG en el modelo *in vitro* utilizado en este trabajo, ya que como se muestra en las FIGURAS 6.9 y 6.10, se observa una intensidad basal de 8OHdG en el grupo control similar a la observada en el grupo estimulado con H₂O₂, que se podría deber al normal metabolismo celular (81), pero que también se podría deber al efecto del vehículo utilizado en la dilución del extracto de ASX, que en este caso fue etanol absoluto, y que en la actualidad se sabe que esta sustancia posee un efecto carcinogénico (84). Sin embargo, ante el pre-tratamiento con ASX se pudo disminuir la intensidad de 8OHdG a nivel nuclear.

Para finalizar, los resultados obtenidos en esta investigación complementan investigaciones que demuestran los efectos beneficiosos del consumo de antioxidantes, especialmente los obtenidos a través de los alimentos, y que promueven el bienestar durante el envejecimiento, sin embargo, los mecanismos a través de los cuales estos antioxidantes actúan aún necesitan ser dilucidados. Otros estudios que podrían complementar los objetivos de esta investigación serían la cuantificación en hipocampo de mediadores pro-inflamatorios en presencia y ausencia de suplementación con ASX, la medición de la actividad de enzimas antioxidantes endógenas en la misma zona, y también la comparación de los niveles de expresión relativa de NF- κ B tanto en el citoplasma como en el núcleo.

CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis que ASX previene el estrés oxidativo disminuyendo la translocación de NF- κ B al núcleo, en neuronas hipocampales de ratas *Sprague Dawley* envejecidas, y en un modelo celular de estrés oxidativo.

1. En ratas envejecidas la suplementación con 4 mg diarios de ASX durante 20 días disminuyó la translocación nuclear de NF- κ B.
2. ASX no afectó los niveles de expresión relativa de NF- κ B en hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas alimentadas con una dieta normal y suplementada con 4 mg de ASX durante 20 días.
3. En ratas envejecidas la suplementación con 4 mg de ASX durante 20 días disminuyó la intensidad nuclear de 8OHdG.
4. En cultivo de células PC12 el pre-tratamiento con ASX 10 μ M disminuyó la translocación nuclear de NF- κ B ante el daño oxidativo causado por H₂O₂ 200 μ M.
5. ASX 10 μ M no afectó los niveles de expresión relativa NF- κ B en cultivo de células PC12 en presencia y ausencia de estimulación con H₂O₂ 200 μ M.
6. En cultivo de células PC12 el pre-tratamiento con ASX 10 μ M disminuyó la intensidad nuclear de 8OHdG ante el daño oxidativo causado por H₂O₂ 200 μ M.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*. 2016 noviembre.
2. Ritchie S, Dickie D, Cox S, Valdez Hernandez M, Corley J, Royle N, et al. Brain volumetric changes and cognitive ageing during the eighth decade of life. *Human brain mapping*. 2015 diciembre.
3. Alfonso U, Mauricio N. Calidad de vida en adultos mayores: análisis factoriales de las versiones abreviadas del WHOQoL-Old en población chilena. *Revista médica de Chile*. 2013 enero; 141(1).
4. Programa Adulto Mayor UC, Centro UC Estudios de Vejez y Envejecimiento. Chile y sus mayores, 10 años de la encuesta de calidad de vida en la vejez Rosell J, Hererra MS, Fernández MB, Rojas M, editors. Santiago: PUCV; 2016.
5. Burke S, Barnes C. Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews*. 2006 enero; 7(30-40).
6. Barnes C, McNaughton B. An Age Comparison of the Rates of Acquisition and Forgetting of Spatial Information in Relation to Long-Term Enhancement of Hippocampal Synapses. *Behavioral Neuroscience*. 1985; 89(6).
7. GAGE FH, DUNNETT SB, BJORKLUND A. Spatial Learning and Motor Deficits in Aged Rats. *Neurobiology of Aging*. 1984; 5.
8. Deupree DL, Turner DA, Watters CL. Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Research*. 1991; 554.
9. BERGADO JA, ALMAGUER W, ROJAS Y, CAPDEVILA V, FREY JU. SPATIAL AND EMOTIONAL MEMORY IN AGED RATS: A BEHAVIORAL-STATISTICAL ANALYSIS. *Neuroscience*. 2011; 172.
10. Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA. Pattern Separation Deficits May Contribute to Age-Associated Recognition Impairments. *Behavioral Neuroscience*. 2010 Octubre.

11. Morris RG, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982 Junio; 297.
12. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1984 Abril ; 11.
13. Norris C, Korol DL, Foster TC. Increased Susceptibility to Induction of Long-Term Depression and Long-Term Potentiation Reversal during Aging. *The Journal of Neuroscience*. 1996 September; 16.
14. Thibault O, Hadley R, Landfield PW. *The Journal of Neuroscience*. 2001 December ; 21.
15. Tombaugh GC, Rowe WB, Rose GM. The Slow Afterhyperpolarization in Hippocampal CA1 Neurons Covaries with Spatial Learning Ability in Aged Fisher 344 Rats. *The Journal of Neuroscience*. 2005 March; 25.
16. Save E, Poucet B, Foreman N, Buhot MC. Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex or hippocampal formation. *Behavioral Neuroscience*. 1992; 106.
17. Abea H, Ishida Y, Nonaka H, Iwasaki T. Functional difference between rat perirhinal cortex and hippocampus in object and place discrimination tasks. *Behavioural Brain Research*. 2009 February; 197.
18. Yankner BA, Lu T, Loerch P. The Aging Brain. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008 February; 3.
19. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in ageing and disease: from plasticity to vulnerability. *Neuroscience*. 2015 noviembre.
20. Castrén E, Antila H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Molecular psychiatry*. 2017 Agosto.
21. Miller D, O'Callaghan J. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing research reviews*. 2005 Marzo.
22. Rubin R, Strayer D. *Patología de Rubin: Fundamentos clinicopatológicos en medicina*. In Rubin E, editor.. Fialdelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

23. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. Cold spring harbor perspectives in biology. 2009; 1.
24. Ferrero-Miliani L, Nielsen O, Andersen P, Girardin S. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. Clinical and experimental immunology. 2006; 142(227-135).
25. Di Sabato D, Ning Q, Jonathan G. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. Journal of neurochemistry. 2016 octubre; 139.
26. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews. 2002 enero; 82(1).
27. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen Species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. Antioxidants & Redox signaling. 2009; 11(3).
28. Zhang Y, Martin S. Redox proteins and radiotherapy. Clinical oncology. 2014 febrero; 26.
29. Kempuraj D. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. Journal of neurology, neurosurgery and spine. 2016; 1(1).
30. Massaad C, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. Antioxidants & redox signaling. 2011 mayo; 14(10).
31. Zorrilla García A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Revista cubana de investigaciones biomédicas. 2002; 21(3).
32. Davies SJA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. Nature. 1997 September; 390.
33. Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. In Discurso de ingreso en la Academia Iberoamericana de Farmacia; 2005 marzo; Sevilla.
34. Donati A, Cavallin G, Bergamini E. Effects of aging, antiaging calorie restriction and in vivo stimulation of autophagy on the urinary excretion of 8OHdG in male Sprague–Dawley rats. Age (dordr). 2013 Abril; 35.

35. Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, et al. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 45.
36. Athanasios V, Thomais V, Constantinos F. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and health*. 2009 Mayo.
37. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutation research*. 1996 febrero; 316.
38. Rojo A, McBean G, Cindric M, Egea J, Lopez M, Rada P, et al. Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *antioxidants & redox signaling*. 2014; 00(00).
39. Mattson MP. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochemical Research*. 2005 julio; 30(6/7).
40. Gavaldà N, Gutierrez H, Davies A. Developmental switch in NF-κB signalling required for neurite growth. *Development*. 2009 Agosto; 136(20).
41. Bowie A, O'Neill L. Oxidative Stress and Nuclear Factor-κB Activation. *Biochemical pharmacology*. 1999; 59.
42. Gutierrez H, Davies A. Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-κB. *Trends in neuroscience*. 2011 Julio; 34(6).
43. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nature reviews molecular cell biology*. 2007 enero; 8.
44. Jost P, Ruland J. Aberrant NF-κB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*. 2006 julio; 109.
45. Heike PL. Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*. 1999; 18.
46. Papa T, Pinho V, do Nascimento E, Santos W, Burtoloso A, Skibsted L, et al. Astaxanthin diferulate as a bifunctional antioxidant. *free radical research*. 2015 enero.

47. Kumar S, Narayan B, Sawada Y, Hosokawa M. Combined effect of astaxanthin and squalene on oxidative stress in vivo. *Journal of molecular and cellular biochemistry*. 2016.
48. Zhang C, Zhang L, Liu J. The role of photorespiration during astaxanthin accumulation in *haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). *Plant physiology and biochemistry*. 2016 Octubre; 107.
49. Gammone MA, Riccioni G, D'Orazio N. Marine Carotenoids against oxidative stress: Effects on Human Health. *Marine drugs*. 2015 Septiembre; 13.
50. Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative medicine review*. 2011; 16(4).
51. Oryza Oil & Fat Chemical Co. Ltd. Astaxanthin: natural antioxidant for neuro-protection, vision enhancement & skin rejuvenation..
52. Ambati RR, Moi PS, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*. 2014 enero; 12(1).
53. Biswal S. Oxidative stress and astaxanthin: The novel super nutrient carotenoid. *International journal of health & allied sciences*. 2014 agosto; 3(3).
54. Tso M. United states patent and trademark office. [Online].; 1996 [cited 2017 noviembre 15]. Available from:
<https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US5527533.pdf>.
55. Grimming B, Kim SH, Nash K, Bickford P, Douglas R. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive functions in age and neurodegeneration. *Geroscience*. 2017 enero; 39.
56. Lobos P, Bruna B, Cordova A, Barattini P, Galáz JL, Adasme T, et al. Astaxanthin Protects Primary Hippocampal Neurons against Noxious Effects of A β -Oligomers. *Neural plasticity*. 2016 febrero; 2016.
57. Song X, Wang B, Shengcui L, Jing L, Mao C, Pan X, et al. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014 mayo; 18(11).

58. Speranza L, Pesce M, Patruno A, Franceschelli S, De lutiis MA, Grilli A, et al. Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target. *Marine Drugs*. 2012 abril; 10(4).
59. Kung-Chin C, Mei-Chin M, Mei-Chin Y. Antioxidative and antiinflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in Nerve Growth Factor differentiated PC12 cells. *Journal of food science*. 2009; 74(7).
60. Ye Q, Huang B, Zhang X, Zhu Y, Chen X. Astaxanthin protects against MPP⁺-induced oxidative stress in PC12 cells via the HO-1/NOX2 axis. *Biomedical center of neuroscience*. 2012; 13(156).
61. Lannaccone P, Jacob H. *Rats! Disease models & mechanisms*. 2009 junio; 2.
62. Soo YJ, Masahiro O, Randeep R, Junko S, Chul LM, Takashi M, et al. Astaxanthin supplementation enhances adult hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice. *Molecular nutrition & food research*. 2016 noviembre; 60.
63. Al amin M, Akhter S, Tasdid Hasan A, Alam T, Naheeb S, Saifullah A. The antioxidant effect of astaxanthin is higher in young mice than aged: a region specific study in brain. *Metabolic brain disease*. 2015 octubre; 30.
64. El-Agamy S, Abdel-aziz AK, Wahdan S, Esmat A, Azab S. Astaxanthin ameliorates Doxorubicin-induced cognitive impairment (chemobrain) in experimental rat model: impact on oxidative, inflammatory and apoptotic machinery. *Molecular neurobiology*. 2017 octubre; 54.
65. Kavitha K, Kowshik J, Kranthi Kiran Kishore T, Basit Baba A, Nagini S. Astaxanthin inhibits NF- κ B and Wnt/B-catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochimica et biophysica Acta*. 2013 mayo.
66. Li Q, Verma I. NF- κ B regulation in the immune system. *Cell reviews immunology*. 2002 octubre; 2.
67. Burch W, Russell. *The Principles of humane experimental techniques*. Special Edition ed. Md B, editor. Londres: John Hopkins Center for alternatives to animal testing; 1959.

68. Son EW, Sung-Ji M, Rhee DK, Pyo S. Vitamin C blocks TNF-alpha induced NF-kappa B activation and ICAM-1 expression in human neuroblastoma cells. *Archives of pharmacal research*. 2004 octubre; 27.
69. Daniel R. Efecto del resveratrol sobre la proliferación e invasión en líneas de cáncer gastrico AGS y MKN45: posible relación entre SOD, NF-κB y heparanasa. 2014. Tesis para optar a grado de magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular.
70. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: A mini review. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2015 diciembre; 18.
71. Henning W, Barbara K, Christian K. Retrograde Transport of Transcription Factor NF-κB in Living neurons. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2001 abril; 273(15).
72. Osorio F, Bárcena C, Soria-Valles C, Ramsay A, de Carlos F, Cobo J, et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-κB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes & Development*. 2012 Septiembre.
73. Glauert H. Vitamin E and NF-kappaB activation: a review. *Vitamins & Hormones*. 2007; 76.
74. Hwang S, Lim J, Kim H. Inhibitory Effect of Lycopene on Amyloid-β-Induced Apoptosis in Neuronal Cells. *Nutrients* by MDPI. 2017 Agosto; 9.
75. Yeon Hyang K, Hyung-Kon K, Doo-Sik K. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF-κB-mediated signals in activated microglia. *International Immunopharmacology*. 2010; 10.
76. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Misun K. Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing IκB Kinase-dependent NF-κB Activation. *Molecules and Cells*. 2003; 16.
77. Jiang X, Chen L, Shen L, Chen Z, Lexing X, Zhang J, et al. Trans-astaxanthin attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and depressive-like behavior in mice. *BrainResearch*. 2016; 1649.
78. Doo P, Ryeojin K, Kwon SH, Bokkee M, Yun SH, Kim MH, et al. FlexPro MD, a Mixture of Krill Oil, Astaxanthin, and Hyaluronic Acid, Suppresses Lipopolysaccharide-Induced

Inflammatory Cytokine Production Through Inhibition of NF- κ B. JOURNAL OF MEDICINAL FOOD. 2016 Diciembre; 19.

79. Renner F, Schmitz ML. Autoregulatory feedback loops terminating the NF- κ B response. Cell Press. 2009 Marzo; 34.

80. Brasier A. The NF- κ B Regulatory Network. Cardiovascular Toxicology. 2006 Junio; 6.

81. Chen K, Cahil D, Kasai H, Nishimura S, Loeb L. 8-Hydroxyguanine, an Abundant Form of Oxidative DNA Damage, Causes G - T and A - C Substitutions. The journal of biological chemistry. 1992 enero; 267(1).

82. Sauvain JJ, Setyan A, Wild P, Tacchini P, Lagger G, Storti F, et al. Biomarkers of oxidative stress and its association with the urinary reducing capacity in bus maintenance workers. Journal of occupational medicina and toxicology. 2011 mayo; 6(18).

83. Grevendonk L, Janssen B, Vanpoucke C, Lefebvre W. Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs. Environmental health. 2016 enero; 15(10).

84. World Health Organization. International agency fr research in cancer. [Online].; 2012 [cited 2017 noviembre 29. Available from:

http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php.

ANEXOS

A. PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A.1 PBS 10X

Para 2 L de solución se utilizaron los siguientes reactivos:

- Cloruro de Sodio (NaCl): 161,2 g
- Cloruro de Potasio (KCl): 4,4 g
- Fosfato de Sodio Dibásico (Na₂HPO₄): 23 g
- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄): 4 g

Se utilizó agua destilada para el volumen requerido. Luego para la obtención de PBS 1X se diluyó un volumen de 100 mL de PBS 10X en 900 mL de agua. Se almacenó a 4°C.

Nota: en el caso de PBS 1X utilizado para cultivo celular, antes de ser almacenado a 4°C la solución se filtró con filtro estéril para jeringa con un poro de 0,2 µm.

A.2 MEDIO DE CULTIVO

A.2.1 DMEM con antibiótico Solución Stock

Para realizar esta solución se necesitó:

- Medio de cultivo DMEM polvo. Sobre para reconstituir en 1 L
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃): 3.7 g
- Antibiótico Anti-Anti 100X: 10 mL
- Hidróxido de sodio (NaOH) 5M o ácido clorhídrico (HCl) 5M estéril para ajustar pH

Primero se autoclavó 1 L de agua destilada en botella de vidrio, y se dejó a temperatura ambiente hasta disminuir la temperatura del agua. Luego bajo campana de flujo laminar, se vació contenido del sobre de DMEM en la botella con el agua autoclavada. Se homogeneizó manualmente hasta percibir la disolución completa del polvo (medio de color amarillento), se

agregó el bicarbonato de sodio (el medio debe cambiar a color rojo intenso), y posteriormente se midió el pH con un pH-metro (Hanna Instruments, USA) ajustando 0,2 -0,3 unidades por sobre el pH deseado, alrededor de 7,2 a 7,4. Una vez ajustado el pH se procedió a filtrar el medio bajo campana de flujo laminar utilizando unidad de filtraje de 0,45 μm (Thermo Scientific Nalgene™ Rapid- Flow Filtration Products) junto con una bomba al vacío. Finalmente se agregó antibiótico Anti Anti 100x. La botella se selló con parafilm y se mantuvo en condiciones de almacenamiento estéril a una temperatura de 4°C.

A.2.2 Preparación de medio de crecimiento completo

Para 50 mL:

- DMEM con antibiótico solución stock: 42,5 mL
- Suero de caballo: 5 mL
- Suero bovino fetal: 2,5 mL

Luego se filtró con Filtro estéril para jeringa con un poro de 0,2 μm y se almacenó en tubos falcon de 50 mL sellado con parafilm a 4°C

A.2.3 Preparación de medio de crecimiento restringido

Para 50 mL:

- DMEM con antibiótico solución stock: 49,5 mL
- Suero bovino fetal: 500 μL

Luego se filtró con filtro estéril para jeringa con un poro de 0,2 μm y se almacenó en tubos falcon de 50 mL sellado con parafilm a 4°C.

A.2.4 Preparación Tripsina- EDTA

Para 20 mL

- Tripsina al 2,5% 10X (Gibco by Life Technologies, USA): 2 mL
- PBS 1X estéril: 17 mL
- EDTA (sal disódica 2-Hidrato, Winkler) estéril a 0,25 M: 80 μ L

A.3 SOLUCIONES PARA INMUNOFLUORESCENCIA

A.3.1 Solución de Permeabilización

Para 50 mL

- Suero de Cabra: 2,5 mL
- Borohidruro: 50 mg
- Tritón 100X: 350 μ L

Completar hasta un volumen de 50 mL con PBS 1X. Se almacenó a 4°C

A.3.2 Solución para dilución de anticuerpo (PBS-tritón 0,4%)

Para 50 mL

- Tritón 100X: 200 μ L
- PBS 1X: 49,8 mL

Se almacenó a 4°C.

A.3.3 Solución de lavado (PBS- tritón 0,2%)

Para 1 L

- Tritón 100X: 2 mL
- PBS 1X: 998 mL

Se almacenó a 4°C.

A.3.4 Sacarosa 30%

Para 50 mL

- Sacarosa: 15 g
- PBS 1X: 50 mL

A.3.5 Buffer Citrato (10 mM, pH 6.0)

Solución A:

- Ácido cítrico: 2,31 g
- Agua destilada: 110 mL

Solución B:

- Citrato de sodio: 14,7 g
- Agua destilada: 500 mL

Para almacenar las soluciones:

Se toman 9 mL de solución A y 41 mL de solución B, se mezclan. Posteriormente se congelan en tubos falcon de 50 mL.

Nota: A la hora de utilizar el buffer, se descongela el falcon con la solución A+B y se diluyen en 450 mL de agua destilada. Ajustar pH a 6,0

A.4 SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

A.4.1 Buffer de Lisis NP-40

Para realizar esta solución se necesitó:

- Cloruro de Sodio (NaCl) (150mM): 0,825 g
- Tris Base (50mM): 1,51 g
- Agua destilada: 200 mL

Al volumen anterior se le adicionó:

- NP-40: 2,5 mL
- Agua destilada: 247,5 mL.

Se almacenó a temperatura ambiente.

A.4.2 Solución de Bloqueo (Leche descremada al 5% en TBS-T)

Para realizar esta solución se necesitó:

- Leche descremada: 10 mg
- TBS-T al 0,05%: 200 mL

Se preparó cada vez que se iba a bloquear.

A.4.3 TBS 10X

Para realizar esta solución se necesitó:

- Tris (25 mM): 30.02 g
- Glicina (190 mM): 144.10 g
- SDS (0.02% p/v): 0,2 g
- Agua destilada: 1 L

Se ajustó el pH a 7,4 y almacenó a 4°C.

A.4.4 TBS-T 0,05%

Para esta solución se necesitó:

- TBS 10X: 200 mL
- Tween 20: 1 mL
- Agua destilada: Necesaria para completar 2 L

Se almacenó a temperatura ambiente.

A.4.5 TBS-T 0,1%:

Para esta solución se necesitó:

- TBS 10X: 50 mL
- Tween 20: 500 μ L
- Agua destilada: volumen necesario para completar 500 mL

Finalmente se almacenó a temperatura ambiente.

A.4.6 Laemmli Sampler Buffer 5X

Para esta solución se necesitó:

- SDS (10 % p/v): 1 g
- Glicerol (50 % v/v): 5 mL
- Tris Base (1M): 0,363 g
- DTT (0,5 M): 0,77 g
- Agua destilada: Se aforó a 10 mL.
- Posteriormente se agregó Azul de Bromofenol (0,0005% p/v): 0,005 g

Se almacenó a -20° C

A.4.7 Solución Tampón Tris-Glicina / Buffer de Electroforesis 10X

Para esta solución se necesitó:

- Glicina (192mM): 145,7 g
- Tris Base: 30,2 g
- SDS (0,1% p/v): 10 g
- Agua destilada: volumen necesario para completar 1 L

Se ajustó el pH a 8,3 y almacenó a temperatura ambiente.

A.4.8 Laemmli Running Buffer/ Buffer de Transferencia 10X

Para esta solución se necesitó:

- Glicina (190mM): 144,1 g
- SDS (0,2% p/v): 2 g
- Tris Base (25mM): 30,3 g
- Agua destilada: Volumen necesario para completar 1 L

Se ajustó el pH a 8,3

Para una concentración de 1X

- Laemmli Running Buffer 10X: 100 mL
- Agua destilada: 700 mL
- Metanol: 200 mL

Se ajustó el pH a 8,3 y antes de ocupar se dejó enfriar a 4°C.

A.4.9 PSA 10% p/v

Se necesitó:

- PSA: 1 g
- Agua destilada: 10 mL

- Se prepararon alícuotas de 200 μ L

Se almacenó a -20°C

A.4.10 SDS 10%:

Se necesitó:

- SDS: 10 g
- Agua destilada: 100 mL

Se almacenó a temperatura ambiente.

A.4.11 Tris 1,0 M pH=6.8

Se necesitó:

- Tris Base: 30,285 g
- Agua destilada: 250 mL de agua destilada
- Se ajustó el pH a 6.8.

Se almacenó a temperatura ambiente.

A.4.12 Tris 1,5M pH=8,8

Se necesitó:

- Tris Base: 45,43 g
- Agua destilada: 250 mL
- Se ajustó el pH a 8.8

Se almacenó a temperatura ambiente.

B. PROTOCOLO DE SUBCULTIVO DE CÉLULAS PC12

- Observar las células en microscopio óptico, procurando que el porcentaje de confluencia celular no supere en un 70%.
- En campana de flujo laminar estéril, con puntas autoclavadas y pipetas de uso exclusivo para cultivo celular, extraer el medio de cultivo de la botella y lavar las células con 1 mL de PBS 1X estéril. Agregar el PBS por el borde de la botella para evitar que las células se despeguen.
- Eliminar el PBS y agregar 1 mL de tripsina-EDTA estéril.
- Dejar en incubadora a 37°C durante 5-6 minutos.
- Inactivar tripsina con 400 µL de suero bovino fetal y tomar toda la suspensión celular para traspasarla a un tubo falcon de 15 mL. Luego centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y re-suspender el pellet en 1 mL de medio de crecimiento completo DMEM
- Para sembrar otra botella de cultivo agregar 150 µL de la suspensión celular en 8 mL de medio de crecimiento completo DMEM.

C. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PARA WESTERN BLOT

La cuantificación se realiza en una placa desechable de 96 pocillos. En donde se realiza una curva de calibración por duplicado con concentraciones ascendentes de BSA 0 μ L- 2 μ L- 4 μ L- 6 μ L- 8 μ L- 10 μ L, volumen de agua necesario para completar 50 μ L y 200 μ L de Reactivo de Bradford. Posteriormente, por duplicado se ocupan 2 μ L de la muestra problema y se completa el volumen de la misma forma que para BSA. Finalmente se miden en un lector multiplacas a 595 nm.

D. PROTOCOLO DE STRIPPING WESTERN BLOT

Las membranas fueron sumergidas en una solución 0.5 M de NaOH por 10 min. en agitación. Luego las membranas fueron lavadas con agua destilada y luego dos veces por 10 min. con agitación constante con grandes volúmenes de tampón PBS 1X con 0.1% Tween 20. Finalmente, luego de este procedimiento las membranas pudieron ser nuevamente utilizadas para el tratamiento con anticuerpos.