

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR E INHIBIDOR DE CASPASAS 3 Y 9 DE LOS CURCUMINOIDES EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 Y SH-SY5Y SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO, AREQUIPA 2013”

Trabajo de tesis presentado por el bachiller:

BAUTISTA HUMPIRE, Adler Shiuji

Para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

Asesor:

PhD. José Villanueva Salas

AREQUIPA – PERU

2015

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera.

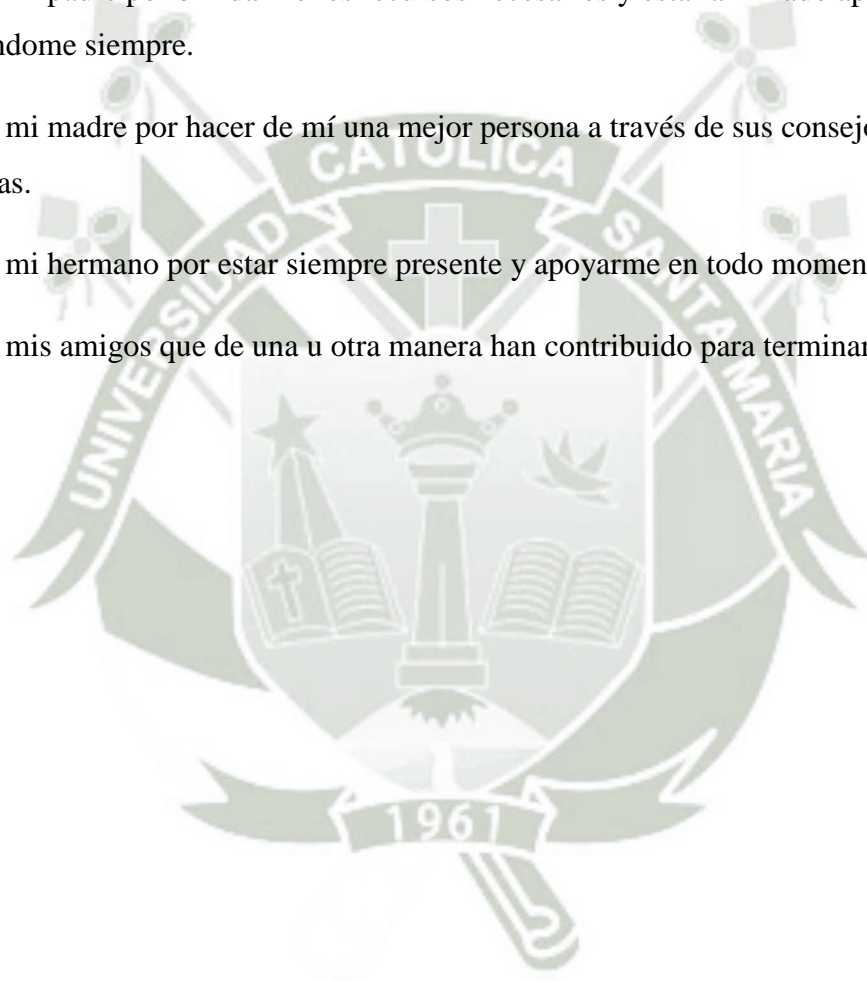
A mis padres y hermano por su apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mi padre por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre.

A mi madre por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos y enseñanzas.

A mi hermano por estar siempre presente y apoyarme en todo momento.

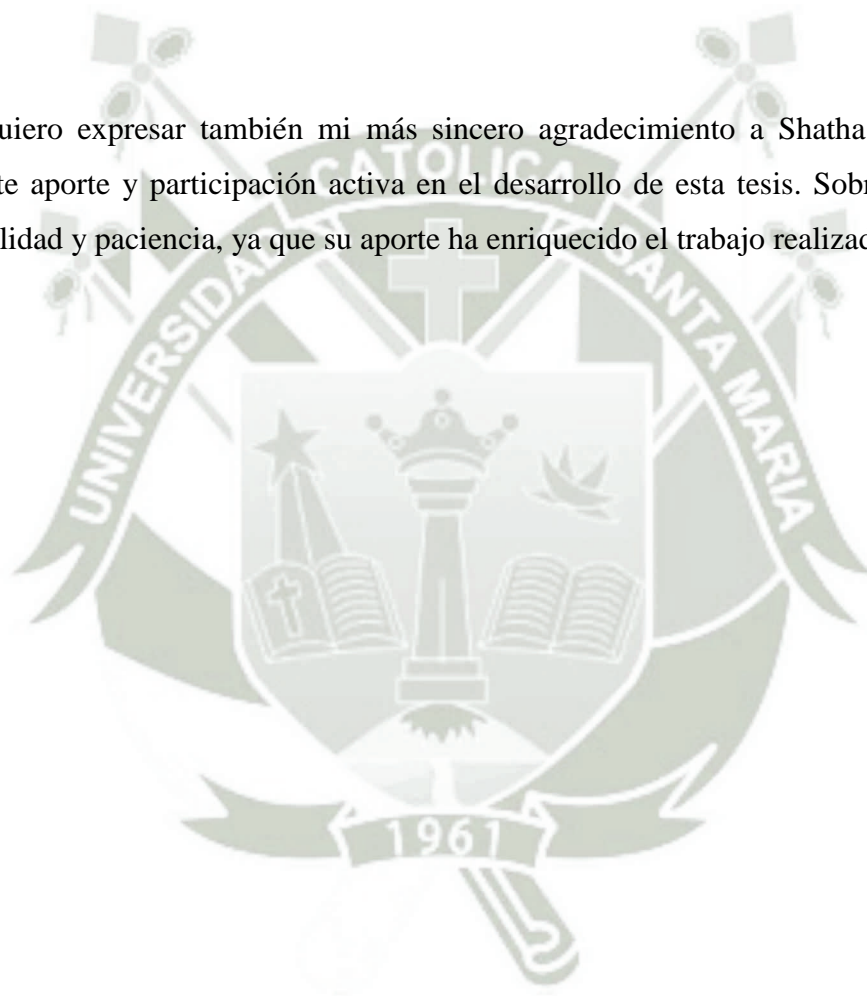
A mis amigos que de una u otra manera han contribuido para terminar la tesis.



AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer de manera especial al Doctor Alejandro Pino Figueroa por darme la oportunidad de participar en el programa de intercambio y aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a Shatha Mufti por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Sobre todo por su disponibilidad y paciencia, ya que su aporte ha enriquecido el trabajo realizado.



ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
GLOSARIO DE TÉRMINOS	I
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	5
1. Cúrcuma sp. (curcumina).....	5
1.1. Clasificación taxonómica.....	5
1.2. Descripción botánica.....	6
1.3. Composición química.....	7
1.4. Usos tradicionales.....	8
1.5. Curcumina.....	9
1.6. Biodisponibilidad.....	9
1.7. Efectos terapéuticos.....	11
2. Cultivo celular.....	14
2.1. Fundamentos.....	14
2.2. Estadios del cultivo celular.....	16
2.2.1. Cultivo primario.....	16
2.2.2. Pasaje celular.....	17

2.2.3. Línea celular	17
2.2.4. Cepa celular	17
2.3. Células de neuroblastoma	18
2.3.1. Características biológicas	18
2.3.2. Células de neuroblastoma B-35	19
2.3.3. Células de neuroblastoma SH-SY5Y	20
3. Muerte celular	20
4. Apoptosis	22
4.1. Inducción de apoptosis	23
4.2. Caspasas	24
4.3. Apoptosis vía extrínseca	27
4.4. Apoptosis vía intrínseca	29
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. Materiales	31
1.1. Material biológico	31
1.2. Material de laboratorio	32
1.3. Reactivos	33
2. Métodos	33
2.1. Preparación de muestra de curcuminoides	33
2.2. Determinación de pureza de curcuminoides	34
2.2.1 Procedimiento	34
2.3. Cultivo de células de neuroblastoma	35

2.3.1. Procedimiento.....	35
2.4. Preparación de peróxido de hidrógeno.....	36
2.5. Ensayos de viabilidad.....	37
2.5.1. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad.....	37
de las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y	
2.5.1.1 Ensayo con MTS.....	37
2.5.1.2. Cambios en las características morfológicas de.....	39
las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y sometidas	
con peróxido de hidrógeno en tiempos determinados	
2.5.2 Efecto de los curcuminoides sobre la viabilidad de.....	40
células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y	
2.5.3. Efecto sobre la viabilidad de células de neuroblastoma.....	42
B-35 y SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides seguido por	
peróxido de hidrógeno	
2.6. Test de inhibición de caspasas 3 y 9.....	49
2.6.1. Detección de la inhibición de caspasa 3 ABCAM®.....	49
2.6.2. Detección de la inhibición de caspasa 9 ABCAM®.....	51
2.7. Análisis estadístico.....	52
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
1. Análisis de la determinación de pureza de los curcuminoides.....	53
2. Cultivo de células de neuroblastoma.....	54
2.1. Viabilidad y conteo de células de neuroblastoma B-35.....	54
2.2. Viabilidad y conteo de células de neuroblastoma SH-SY5Y.....	57
2.3. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de.....	60

las células de neuroblastoma B-35	
2.4. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y	63
2.5. Efecto de los curcuminoides sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35	66
2.6. Efecto de los curcuminoides sobre la viabilidad de células de neuroblastoma SH-SY5Y	67
2.7. Efecto sobre la viabilidad de células de neuroblastoma B-35 pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno	68
2.8. Efecto sobre la viabilidad de células de neuroblastoma SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno	74
3. Inhibición de caspasas	81
CONCLUSIONES	86
SUGERENCIAS	87
BIBLIOGRAFÍA	88

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
- MTS : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
- FBS : Fetal bovine serum
- PBS : Phosphate buffered saline
- PEG : Polietilenglicol
- DMSO : Dimetilsulfoxido
- TLC : Thin Layer Chromatography
- UDP-glucoronil transferasa : Uridinadifosfato glucuroniltransferasa
- PRP4 : Proteína quinasa serina/treonina
- NF-Kb : Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- TPA : Acetato descarboxilasa
- ODC : Descarboxilasa ornitina epidermal
- ADN : Acido desoxiribonucleico
- IC50 : Concentración inhibitoria media máxima
- EDTA : Ácido etilendiaminotetraacético
- BDNF : Factor neutrónico derivado del cerebro
- AMPc_{db} : Dibutiril Adenosina monofostato ciclico
- ATP : Adenosina trifosfato
- dATP : Desoxiadenosina trifosfato
- PARP-1 : Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1
- CSF : Factores estimuladores de colonias
- TNF : Factor de necrosis tumoral
- TNFR : Receptor del factor de necrosis tumoral
- CARD : Dominio de reclutamiento de caspasa
- DED : Dominio efector de muerte
- FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
- IAP : Inhibidor de proteínas apoptóticas

- Smac : Second mitochondria derived activator of caspase
- DIABLO : Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low PI
- Omi/HtrA2 : Endonucleasa G
- AIF : Factor inductor de apoptosis
- ROS : Especies reactivas de oxígeno





RESUMEN

El presente estudio tuvo como finalidad demostrar el efecto neuroprotector de los curcuminoides en células de neuroblastoma B-35 (rata) y SH-SY5Y (humano), teniendo en cuenta el posible mecanismo de neuroprotección la inhibición de caspasas 3 y 9.

Se preparó cultivos celulares de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y, de las cuales se tomaron muestras con un conteo aproximado de 2.0×10^6 células/mililitro y porcentaje de viabilidad alrededor de 90%. Estas muestras fueron sometidas a factores de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno.

Para el estudio se utilizó curcumina con una pureza de $> 90 \%$, la misma que fue analizada por cromatografía en capa fina identificándose la presencia de Curcumina, Dimetoxicurcumina y Bis-dimetoxicurcumina que en su conjunto se denominan curcuminoides.

Para el desarrollo del presente estudio primero se demostró que el peróxido de hidrógeno es un agente productor de estrés oxidativo, tal efecto fue evidenciado cuando se produjo un daño significativo sobre la viabilidad en las células luego de 24 horas de tratamiento,

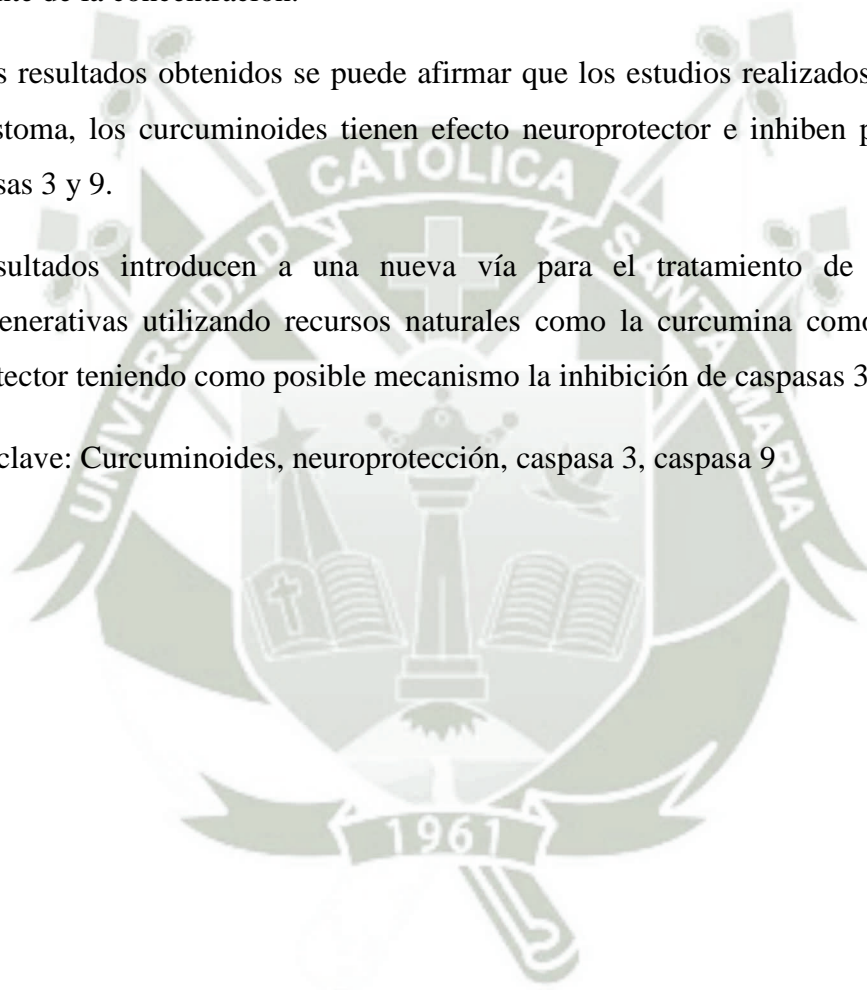
teniendo en cuenta que para las pruebas de viabilidad se utilizó el ensayo de proliferación celular (MTS), la viabilidad de las células mostró mejoría cuando las células se trataron previamente con curcuminoides, lo cual demostró el efecto neuroprotector de los curcuminoides.

Teniendo en cuenta, como posible mecanismo de neuroprotección a la inhibición de caspasas 3 y 9 se usó un kit de detección e inhibición de caspasas 3 y 9 por fluorescencia. Según los ensayos con curcuminoides resultó en una inhibición parcial de las caspasas no dependiente de la concentración.

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que los estudios realizados en células de neuroblastoma, los curcuminoides tienen efecto neuroprotector e inhiben parcialmente a las caspasas 3 y 9.

Estos resultados introducen a una nueva vía para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas utilizando recursos naturales como la curcumina como un producto neuroprotector teniendo como posible mecanismo la inhibición de caspasas 3 y 9.

Palabras clave: Curcuminoides, neuroprotección, caspasa 3, caspasa 9





ABSTRACT

This study aimed to evaluate the neuroprotective effect of curcuminoids contained in *curcuma longa* (curcumina) in B-35 (rat) and SH-SY5Y (human) neuroblastoma cells by administering hydrogen peroxide to produce oxidative stress, taking note that the possible mechanism of neuroprotection is inhibition of caspase 3 and 9.

B-35 and SH-SY5Y neuroblastoma cells were prepared, using cells having not less than 90% percentage of viability and counting approximately 2.0×10^6 cells per milliliter. These samples were subjected to oxidative stress factors with hydrogen peroxide.

For the study, curcumin was used containing > 90% purity, which was analyzed by thin layer chromatography (TLC), in which results was identified Curcumin, Dimethoxycurcumin, Bis-Dimethoxycurcumin, which all of them are called curcuminoids.

For the development of this study was first demonstrated that hydrogen peroxide is an agent producing oxidative stress, this effect was shown when there was significant damage on the viability in cells after 24 hours of treatment, considering that for viability assays cell

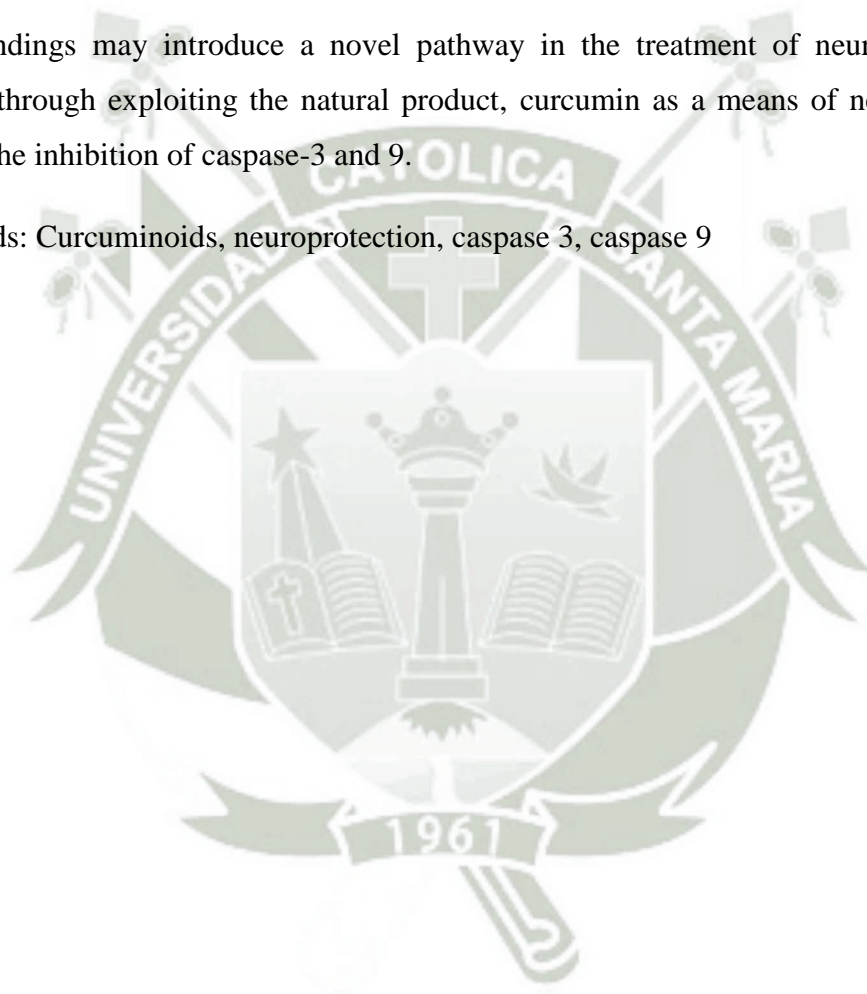
proliferation assay (MTS) was used, the improved cell viability when cells were pretreated with curcuminoids, demonstrating the neuroprotective effect of curcuminoids.

Given as a possible mechanism of neuroprotection the inhibition of caspase 3 and 9 was that detection kit and inhibition of caspase 3 and 9 Fluorescence was used as testing curcuminoids resulted in partial inhibition of caspases not concentration-dependent.

According to the results it can be stated that studies in neuroblastoma cells curcuminoids have neuroprotective effect and partially inhibit caspases 3 and 9.

These findings may introduce a novel pathway in the treatment of neurodegenerative diseases through exploiting the natural product, curcumin as a means of neuroprotection through the inhibition of caspase-3 and 9.

Key words: Curcuminoids, neuroprotection, caspase 3, caspase 9



INTRODUCCIÓN

La curcumina es el miembro principal de la familia de curcuminoides, siendo usada extendidamente en la India como una planta medicinal y también representando un símbolo sociocultural en el sureste de Asia. La variedad de cúrcuma que es conocida en el Perú es la *Cúrcuma longa* que toma el nombre de palillo y su principal área de cultivo es la selva peruana, que es conocida por sus propiedades diuréticas y los nativos la usan como anti-inflamatorio en las vías respiratorias, urinarias, su uso ha sido extendido como especia en la cocina.

La curcumina ha mostrado diversos efectos farmacológicos como la capacidad antioxidante, la capacidad de eliminar radicales libres (Molina-Jijon et al., 2011), antiinflamatoria (Buhrmann et al., 2011), anti amiloide (Wang et al., 2010), propiedades anti isquémicas (Shukla et al., 2008) y demás. Además, curcumina ha mostrado efecto neuroprotector que puede ser explorado por la administración hacia las neuronas junto con la inducción de la apoptosis para estudio de diferencias en la viabilidad celular.

El peróxido de hidrógeno, un agente causante de daño a las neuronas y un inductor de apoptosis, se forman a partir de un anión superóxido a través de la superóxido dismutasa, que produce especies reactivas de oxígeno (ROS). El peróxido de hidrógeno altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial que resulta en la liberación de citocromo c en el citoplasma produciendo la activación de las caspasas las cuales son las responsables de la apoptosis.

Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína-aspartato las que se ha demostrado que desempeñan un papel crucial que es inducida por diversos estímulos nocivos y fisiológicos que terminan en apoptosis, para este estudio se toma importancia a la caspasa 3 ya que representa a la caspasa iniciadora para la cascada de reacciones, y la caspasa 9 que representa a la caspasa ejecutora de la apoptosis.

La caspasa 3 y caspasa 9 son uno de los principales mediadores en las vías de señalización de apoptosis. La activación de la caspasa 3 por la caspasa 9 resulta en la activación de la apoptosis celular. La inhibición de las caspasas puede retrasar o incluso inhibir la apoptosis, lo que implica una oportunidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Estudios preliminares llevados a cabo en los laboratorios de MCPHS University en células de neuroblastoma de rata B35 expuestas a factores de estrés oxidativo, tales como peróxido de hidrógeno, han demostrado que la curcumina actúa como un agente neuroprotector que antagoniza la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno.

El objetivo de este estudio es continuar los estudios preliminares utilizando células de neuroblastoma de rata B35 y ampliar el estudio para incluir evaluaciones del efecto neuroprotector de la curcumina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. El efecto inhibitorio de la curcumina sobre la caspasa 3 y caspasa 9 se explora como el posible mecanismo de neuroprotección.



OBJETIVOS

1. Cultivar células de neuroblastoma B-35 (rata) y SH-SY5Y (humano).
2. Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma.
3. Evaluar el efecto de los curcuminoides sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma.
4. Evaluar el efecto inhibitor de los curcuminoides sobre las caspasas 3 y 9.
5. Determinar el probable efecto neuroprotector de los curcuminoides en células de neuroblastoma.

HIPÓTESIS

Dado que las células de neuroblastoma sometidas a estrés oxidativo promueven la activación de reacciones que terminan en muerte celular, es posible que los curcuminoides presenten efecto neuroprotector teniendo como probable mecanismo de acción a la inhibición de caspasas 3 y 9.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *CÚRCUMA SP.*

La cúrcuma, *cúrcuma sp.*, es una planta perteneciente a la familia de las Zingiberaceae, originaria del sureste de Asia y muy cultivada en India, Jamaica, Perú, Haití, Taiwán y parte de China. La *Cúrcuma longa L.*, representa al "turmeric" usado comercialmente como fuente de pigmento, especia, preservante de comida y como cosmético. (27, 46, 51)

1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de la *Cúrcuma* sp. es la siguiente:

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Zingiberidae
Familia	Zingiberaceae
Género	<i>Cúrcuma</i>

Fuente: Elaboración propia

1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una hierba perenne, robusta, con tallo corto y flores de color amarillo pálido. Los rizomas son cortos y gruesos, llenos de tuberosidades. (5)

De los rizomas de la cúrcuma se produce la curcumina, un tinte de color amarillo intenso. (5, 28)

Este arbusto puede alcanzar hasta un metro de altura en su fase de desarrollo pleno. Presenta hojas grandes, suaves de color verde claro típico; flores de color blanco amarillento y sus raíces que pueden tener un grosor de cinco a ocho centímetros son pardas y muy arrugadas. (5, 28)

La cúrcuma es una planta herbácea, tiene unos rizomas o tallos subterráneos que son los que desde hace siglos se emplean como condimento, tinte y estimulante medicinal. La reproducción la realiza a partir de yemas que surgen en el propio rizoma en el último año de crecimiento y que da lugar a una nueva planta renovada. Estos rizomas se desarrollan mejor en climas cálidos y húmedos. (5, 39)

Posee flores de color blanco amarillento y sus raíces que pueden tener un grosor de cinco a ocho centímetros son pardas y muy arrugadas, si las abrimos en su interior presentan un color amarillo anaranjado intenso. La recolección se

realiza a los diez meses de haberse plantado. (28)

Se distinguen los siguientes tipos de cúrcuma:

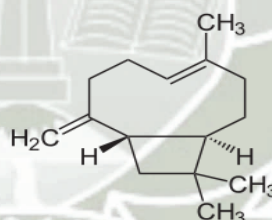
- Madrás: el tipo más apreciado, color amarillo limón.
- Allepey: color amarillo oscuro a anaranjado.
- Haití: color amarillo anaranjado oscuro.

1.3.COMPOSICIÓN QUÍMICA

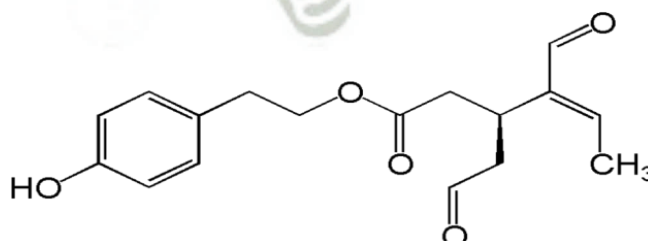
Entre los principales componentes están: carbohidratos (4.7-8.2) %, aceites esenciales (2.44-4.0) %, ácidos grasos (1.7-3.3) %, curcuminoides (curcumina, dimetoxicurcumina y bisdimetoxicurcumina), cuyo contenido aproximado es de un 2 %, aunque puede variar entre 2.5-5.0 % del peso seco, y otros polipéptidos como la turmerina (0.1 % del extracto seco). (11)

La cúrcuma cuenta en su composición química compuestos volátiles y no volátiles. Entre los compuestos volátiles fueron hallados:

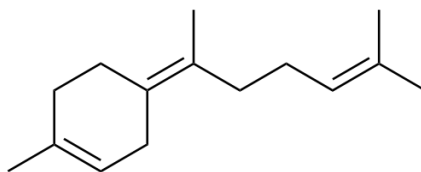
- Cariofileno



- Zingibereno

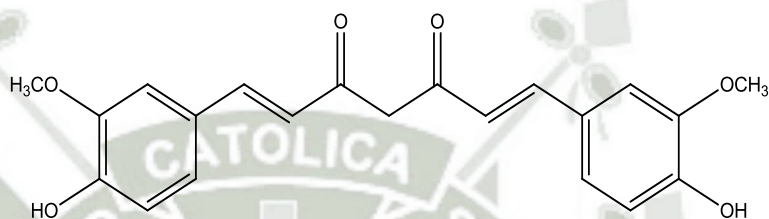


- Bisaboleno

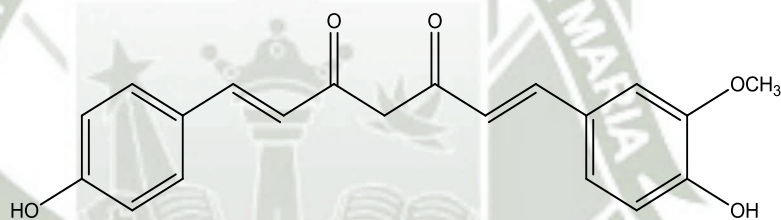


Entre los compuestos no volátiles fueron hallados

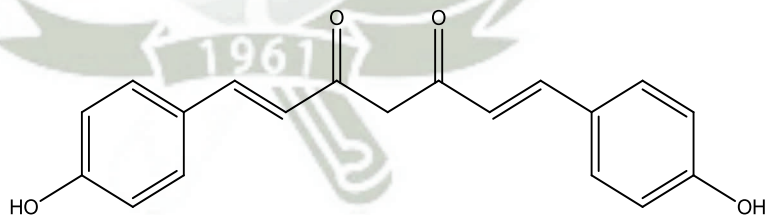
- Curcumina



- Dimetoxicurcumina



- Bis-dimetoxicurcumina



1.4.USOS TRADICIONALES

Antiguamente la cúrcuma en la india fue usada para el tratamiento de ictericia y el tratamiento de la lepra como se describe en los antiguos escritos del Ramayana, también tiene gran impacto sociocultural en la India.

Evidencias demuestran que la cúrcuma fue usada como colorante textil en las regiones de China (Rosengarten, 1969). Este uso ha sido extendido como colorante para mostazas, sopas y caldos y en algunos productos cárnicos.

La cúrcuma también es utilizada en la formulación de productos cosméticos, ya que puede encontrarse en productos cosméticos por sus propiedades antioxidantes (39, 51).

1.5.CURCUMINA

La curcumina es el principal polifenol curcuminoide encontrado en el turmeric, junto con la demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina y la recientemente descubierta ciclocurcumina forman el complejo conocido como azafrán indio, raíz amarilla, jengibre amarillo o amarillo natural. (8, 15, 51)

La curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) es también conocida como diferuloilmetano o 1,7-bis-(4-hidroxí-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, es un compuesto enólico de bajo peso molecular (369.37 g/mol) con punto de fusión $183^{\circ}C$, de color amarillo en medio ácido ($pH = 2,5-7$) y rojo en medio básico ($pH > 7$), es soluble en solventes orgánicos como dimetilsulfoxido, etanol, metanol o acetona y muy poco soluble en solventes acuosos. (4, 6, 20)

1.6.BIODISPONIBILIDAD

Según estudios la curcumina es inestable a pH básico, degradándose hasta ácido ferúlico y ferulometano. (55, 32)

Aunque el mecanismo exacto de degradación todavía no se conoce parece ser un mecanismo oxidativo, ya que la presencia de ácido ascórbico, N-acetilcisteína previene completamente su degradación a pH 7.4. (32)

Se supone que en las condiciones del estómago ($pH = 1-2$) y del intestino delgado ($pH = 6.5$), la curcumina es estable, ya que a pH entre 1 y 7, su degradación es extremadamente lenta. (32, 55)

Según diversos estudios se ha observado un 90 % de degradación al incubar curcumina a pH 7.2 y 37 °C en tampón fosfato o en medio sin suero, comprobando la descomposición es pH dependiente. (40)

Su elevada lipofilia permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva. Se ha determinado, usando curcumina radioactiva en ratas, que aproximadamente el 35 % de dosis orales entre 2.5 y 1000 mg/kg se excreta por las heces en 48 horas (17), absorbiéndose el 65 % (40).

Con la administración intraperitoneal de curcumina se obtienen resultados similares, lo que indica que se absorbe fácilmente desde la cavidad peritoneal (17).

Tras una dosis oral de curcumina marcada radiativamente, el (6.3 ± 2.5) % de la radioactividad es excretada por la orina tras 72 h, mientras que con la administración intraperitoneal aumenta aproximadamente el doble (11.2 ± 0.7) % (17). Todavía no se conoce con exactitud la naturaleza de los metabolitos urinarios.

Tras la administración de curcumina se biotransforma primero a dihidrocurcumina y tetrahydrocurcumina, y estos compuestos son convertidos, posteriormente a conjugados monoglucoronidos (39), de forma que los principales metabolitos de la curcumina in vivo son los glucoronidos de la curcumina. Se han identificado los metabolitos biliares de la curcumina por espectrometría de masas, después de recolectarlos de la bilis de ratas que recibieron 50 mg/kg de curcumina intravenosa (17) entre el 50-60 % de la dosis administrada fue excretada por la bilis en 5 horas. Los principales metabolitos biliares fueron glucoronidos de la tetrahydrocurcumina y de la hexahydrocurcumina (52 % y 42 % de los metabolitos biliares respectivamente); un componente minoritario fue el ácido dihydroferúlico. Esto demuestra que la mayor fracción de la curcumina se reduce de forma endógena y después es glucoronizado por la UDP-glucoronil transferasa.(17, 40).

1.7.EFECTOS TERAPÉUTICOS

Según diversos estudios se ha encontrado una amplia gama de efectos terapéuticos, como los estudios que se mencionan a continuación que demuestran innumerables beneficios que a través de evidencias científicas demuestran los beneficios atribuidos a la curcumina. (1, 24, 26, 48, 50, 59, 60, 61)

Khanna y col. Demostraron el efecto neuroprotector y antiinflamatorio en neuronas de hipocampo de HT4 de ratón inducidas a stress oxidativo por glutamato de un nuevo curcuminoide demetilado.

Buapondri y col. Demostraron que una curcumina sintética inhibe el edema en la pata de ratas inducida por carragenina comprobando su capacidad antiinflamatoria comparando el tratamiento con indometacina.

Jingxian y col. Demostraron la neuroprotección de la curcumina en la lesión cerebral isquémica consiste en la vía Akt/Nrf2, que envuelve el efecto antioxidante de la curcumina en daño producido experimentalmente en ratas.

Adeeb y col. Demostraron que la curcumina induce la apoptosis en células de carcinoma colorrectal humano (HCT-15) regulando la expresión de PRP4 y p53.

Shukla y col Demostraron el efecto neuroprotector de la curcumina en ácido okadaico en el deterioro de la memoria inducida en ratones, en el que se demuestra las propiedades antiisquémicas de las curcumina

Buhrmann y col. Demostraron el efecto antiinflamatorio de la curcumina al determinar que la curcumina modula la inflación del factor kappa B (NF-kB) mediada en tenocitos humanos in vitro en la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt

Ringman y col. Demostraron el rol potencial de la curcumina en la enfermedad de alzheimer, mostrando su capacidad anti-amiloide los estudios fueron realizados en ratas y en pacientes con cáncer y/o pacientes con lesiones pre cancerosas.

Así como el estudio de Lim y col. cuyos resultados indican que la curcumina reduce el daño oxidativo mostrándose como un agente antioxidante y anti-amiloide en ratones con alzheimer transgénico.

Molina y col. Examinó el efecto protector de la curcumina frente al daño producido por reperfusión cardiaca mediante la atenuación de estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

Aggarwal y col. Mostraron los efectos potenciales de la curcumina como agente antiinflamatorio, contra enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, metabólicos, autoinmunes y enfermedades neoplásicas. Según los estudios es probable que la curcumina regule numerosos factores de transcripción, citoquinas, protein quinasas, adhesión molecular y enzimas que han sido ligadas a la inflamación.

Los efectos de la curcumina en la peroxidación lipídica ha sido también estudiada por varios autores como el estudio de Pulla Reddy & Lokesh, en su estudio curcumina es un buen antioxidante e inhibe la peroxidación lipídica en microsomas hepáticas de rata, membranas de eritrocitos y homogenizado de cerebro. La peroxidación lipídica tiene un rol importante en la inflamación, enfermedades cardiacas y el cáncer.

Actividad nematocida del aceite de cúrcuma se estudió en *Paramecium caudatum* en diferentes concentraciones, variando de 1 en 2000 a 1 en 5000. Los ciliados se hicieron lentos y finalmente murieron (Chopra et al. 1941). Kiuchi et al. (1993) demostraron la actividad de las fracciones (metanólicos y clorofórmico) de la cúrcuma contra *Toxocara canis*. En este trabajo se aislaron

un nuevo curcuminoide, el cyclocurcumin. Todas las sustancias no mostraron actividad cuando se aplica de forma independiente, pero se observó la actividad cuando eran mixtos, lo que sugiere una acción sinérgica entre ellos.

Anti- VIH - Mazumber et al. (1995) demostraron que la curcumina tiene una actividad antiviral , es un inhibidor de la integrasa del VIH - 1 ($IC_{50} = 40 \text{ M}$) y se sugiere que los análogos de curcumina se pueden desarrollar como los medicamentos anti- Sida. Los datos mostraron que la curcumina inhibe la replicación del VIH- 1 proteína integrasa. Eigner y Scholz (1999) informaron de que la curcumina fue reclamada para el anti -HIV- 1 y HIV- 2 actividades en una aplicación de patente reciente.

La actividad anti - tumoral - Huang et al. (1988), estudiando el efecto de la curcumina , ácido clorogénico , ácido cafeico y el ácido ferúlico en la promoción de tumores en la piel del ratón en un 12 -O- tetradecanoil -13 - acetato (TPA) , observó que todos estos compuestos inhiben la decarboxilasa ornitina epidermal (ODC) y la síntesis de ADN epidérmico , siendo la curcumina el más eficiente . En otro trabajo (1991), los resultados sugieren que la curcumina era un potente inhibidor de TPA - y la inflamación inducida por ácido araquidónico y de las actividades de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa en la epidermis del ratón. La IC_{50} para la inhibición dependiente de la curcumina de estas actividades de la enzima era de 5-10 mM. En este estudio, los resultados indicaron que la curcumina inhibe el metabolismo epidérmico de ácido araquidónico a través de las vías de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa .

Además, Ozaki et al. (2000), el examen de la acción de la curcumina sobre la apoptosis de osteoclastos de conejo, demostró que la curcumina inhibe drásticamente la resorción ósea en paralelo con su estimulación de la apoptosis en las células. Dado que el cáncer y la inflamación de hueso son enfermedades que aumentan la resorción ósea, los autores sugieren que la curcumina puede ser útil en la terapia de estos patógenos.

Otras actividades - curcumina y su sal de sodio han estado mostrando una fuerte actividad anti - inflamatoria en carragenina y edema inducido Caoline. Polvo de la cúrcuma protege la mucosa gástrica contra los irritantes. La curcumina puede disminuir los altos niveles de colesterol como la estatina y tienen actividad anti-mutagénica (Scartezzini y Speroni 2000). Chuang et al. (2000) mostraron que la curcumina a concentraciones de 200 mg / kg o 600 mg / kg podría inhibir de forma eficaz la inflamación del hígado inducida dietilnitrosamina en ratas. Otra acción interesante de esta sustancia fue demostrado por Park et al. (2000), cuando la hepatotoxicidad aguda se indujo por inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono en ratas. Después de estos animales habían sido tratados con curcumina y los resultados mostraron que la lesión del hígado se inhibió.

2. CULTIVO CELULAR

2.1. FUNDAMENTOS

Diversas investigaciones demuestran la complejidad del estudio de células específicas o grupos celulares en plantas y animales intactos. Siendo una alternativa el uso de órganos aislados, sin embargo la complejidad de los órganos aun siendo aislados puede presentar diversos problemas de investigación, es por ello que muchas investigaciones conducen estudios sobre células aisladas mantenidas a condiciones que permiten su crecimiento al que se le denomina cultivo celular.(23, 29, 44)

El cultivo celular fue originada como una herramienta de investigación celular, comportamiento de los tejidos así como su funcionamiento in vitro. La utilización de cultivos celulares para propósitos terapéuticos comenzó para la producción de vacunas, en los cuales las células fueron usadas para el crecimiento de virus abriendo campo a la generación de diversas líneas celulares. (29, 44)

Los cultivos celulares poseen diversas ventajas sobre los organismos intactos. Primero la mayoría de los tejidos animales y vegetales se componen de diversos tipos de células, mientras que pueden ser cultivadas células de un único tipo

específico con propiedades homogéneas. Segundo, las condiciones experimentales pueden controlarse mejor en un cultivo que en un organismo intacto. Tercero, en muchos casos una única célula puede ser cultivada más rápidamente hasta formar una colonia de muchas células idénticas. (19, 21)

Una desventaja importante de las células cultivadas es que no se encuentran en su ambiente normal y por ende sus actividades no están reguladas por otras células y tejidos como ocurre en un organismo intacto. Como también la distribución de las células y la matriz extracelular alrededor de una célula influye en su forma y comportamiento (19, 21)

A diferencia de las bacterias las células necesitan de diversos factores para su desarrollo y su correcto funcionamiento (23). Las condiciones del cultivo celular varía de acuerdo al tipo celular, en un medio artificial en el cual las células son cultivadas en un envase debe contener un sustrato o medio que proporcione los nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), factores de crecimiento, hormonas y gases (O_2 , CO_2), y la regulación del medio físico-químico (pH, presión osmótica, temperatura).

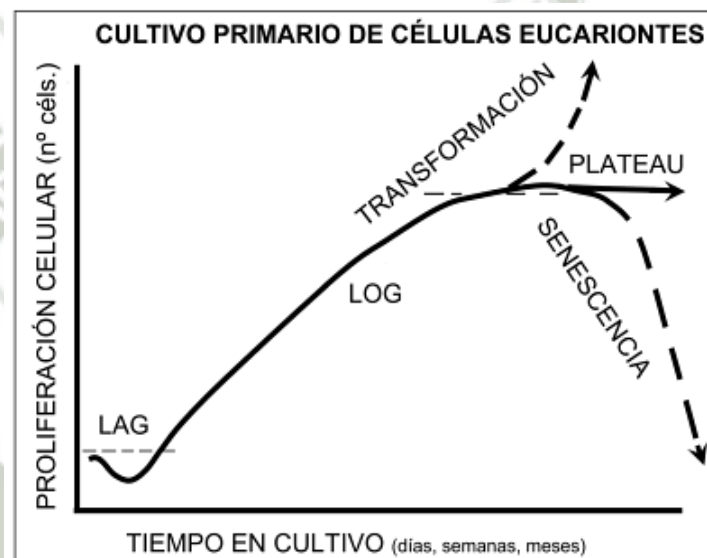
Muchos tipos de células pueden crecer sobre vidrio o sobre plásticos especialmente tratados con grupos cargados negativamente sobre la superficie (p. ej. SO_3^{2-}), las células secretan componentes de la matriz extracelular que se adhieren a estas superficies, y luego se adhieren y crecen sobre la matriz secretada. Una única célula cultivada sobre una placa de vidrio o de plástico prolifera para formar una masa visible que contiene miles de células genéticamente idénticas en 4-14 días, dependiendo del tipo de célula a este tipo de cultivo se denomina cultivo adherente o monocapa. Algunas células sanguíneas especializadas y células tumorales se pueden mantener o cultivar en suspensión como células individuales a este tipo de cultivo se denomina cultivo en suspensión. (19, 37)

2.2. ESTADIOS DEL CULTIVO CELULAR

2.2.1. CULTIVO PRIMARIO

El cultivo primario refiere al estado del cultivo después que las células son aisladas del tejido y proliferan bajo condiciones apropiadas hasta que ellos ocupen todo el sustrato disponible (Fig. 01). (19)

Figura 01: Curva de crecimiento de células de cultivo. Fases de LAG (adaptación), LOG (Cese de proliferación e inicio de la diferenciación celular), Envejecimiento o senescencia.



Fuente: Cultivo de células animales y humanas, aplicaciones en medicina regenerativa.

Para su preparación se deben romper las interacciones entre células y célula y entre célula y matriz, para ello los fragmentos de tejidos son tratados con una combinación de una proteasa (tripsina y/o colagenasa) y un quelante (EDTA) que reduce el nivel de Ca^{2+} o Mg^{2+} del medio. Luego las células liberadas son ubicadas en placas en un medio rico en nutrientes complementando con suero, donde pueden adherirse a la superficie entre sí. (19, 23, 29, 37)

2.2.2. PASAJE CELULAR

Las células adherentes crecen en una monocapa hasta que tengan buena confluencia. La cinética del crecimiento celular in vitro sigue un patrón similar a la cinética clásica demostrada en un cultivo bacteriano, las cuales tiene en su primera etapa la de latencia en las cuales las células empiezan a crecer, siguiendo la fase de crecimiento exponencial en el que la población celular se multiplica y al final la fase de crecimiento estacionario en la que prácticamente no hay crecimiento. En este estado las células pueden ser tripsinizadas y reintroducirlas en medios nuevos a este proceso se le denomina pasaje celular o subcultivo. (37)

2.2.3. LÍNEA CELULAR

Después del primer pasaje el cultivo primario comienza a ser conocido como línea celular o subclon. Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen una vida limitada (19)

2.2.4. CEPA CELULAR

Si una subpoblación de una línea celular se selecciona positivamente del cultivo por clonación o algún otro método, esta línea celular se convierte en una cepa de células. Una cepa de células a menudo adquiere adicionales cambios genéticos posteriores a la iniciación de la línea parental. (19)

Las células normales por lo general sólo se dividen un número limitado de veces antes de perder su capacidad de proliferar, que es un evento genéticamente determinado conocido como senescencia; estas líneas celulares que se conoce como finito. Sin embargo, algunas líneas celulares se convierten en inmortales a través de un proceso llamado transformación, que puede ocurrir de forma espontánea o puede ser químicamente o inducida viralmente. (19)

2.3. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

Neuroblastomas son tumores malignos del sistema nervioso autónomo. Ellos crecen de células primitivas neuroectodérmicas derivados embriológicamente de la cresta neural. La elevación en la excreción de catecolamina urinaria indica que al menos 80 -85% de las neoplasias son originados del sistema nervioso simpático incluyendo la medula adrenal. (10, 35, 54)

La línea celular de neuroblastoma son células derivadas de la cresta neural transformadas, capaces de proliferación ilimitada in vitro, así como la capacidad de diferenciación en tipos de células neuronales en tratamiento con diversos agentes. Estas características hacen que las células de neuroblastoma sean un excelente sistema in vitro. (10, 47). Inicialmente las células de neuroblastoma fueron utilizadas como una herramienta de diagnóstico. (10, 30) Luego diversos estudios mostraron que estas células pueden ser ampliamente utilizados para los pruebas de neurotoxicidad, también para las relaciones entre la proliferación, diferenciación y la apoptosis; estas características han sido útiles para la comprensión del cáncer. (10, 47)

Para los estudios in vitro las células son extraídas del tejido tumoral las cuales pueden ser obtenidas de muestras de tumor primario y son colocados en un medio de cultivo que usualmente consiste en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), 10mM HEPES buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) o RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) conteniendo de 3-15 % de suero fetal, 100 IU/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina; son cultivadas a 37 °C y 5 % de CO₂. (52) El cultivo debe ser constantemente vigilado durante las primeras semanas en las que las células se pegan a las paredes del frasco de cultivo. (54)

2.3.1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Una de las características más resaltantes del cultivo de neuroblastoma es la elaboración de los procesos neuríticos. (52) Otros procesos neuronales incluyen la síntesis de enzimas biosintéticas de

neurotransmisión; expresión de neurofilamentos; expresión de receptores muscarínicos, opioides y de neutrofina; gránulos de núcleo denso presume sitios de almacenamiento de catecolaminas, inmunoreactividad para enolasa neuronal específica. (53)

Las líneas celulares de neuroblastoma tienden a tener un fenotipo adrenérgico produciendo relativamente valores altos de tirosina hidroxilasa y dopamina- β -hidroxilasa. (52, 53)

Subtipos morfológicos de las líneas celulares han sido clonados y también pueden ser distinguidos por marcadores bioquímicos. (52)

Muchas de ellas se pueden diferenciar por su morfología, debido a su heterogeneidad pueden liberar diferentes precursores. (53) Muchas de estas células contienen al menos 3 variantes morfológicas que contribuyen a la heterogeneidad de las líneas celulares (9, 53), estas son:

- Neuroblásticas (Tipo N)
- Planas o sustrato adherente (Tipo S)
- Intermedios (Tipo I)

Las células de tipo N y las del tipo I expresan proteínas de neurofilamento, mientras que los tipos I y S expresan para vimentina que los tipos N, las células de tipo S sintetizan colágeno y fibronectina similar a las células de Schwann. Muchas de la tipo S no sintetizan niveles detectables de tirosina hidroxilasa o dopamina- β -hidroxilasa, sin embargo muchas producen tirosinasa. (42)

2.3.2. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35

La línea celular B-35 deriva de tumores del sistema nervioso central de ratas neonatas. (18) Esta línea celular ofrece muchas ventajas sobre su uso como el fácil cultivo, gran densidad alta viabilidad y generaciones ilimitadas. Estas células son muy útiles en el estudio de las neuronas del sistema nervioso central como en el análisis de endocitosis y las vías de

señalización, crecimiento de los axones, movilidad celular y en estudios de muerte celular y apoptosis. (18)

2.3.3. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

La línea de células SH-SY5Y es una sublínea tres veces clonada de las células SK-N-SH que se establecieron inicialmente a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma origen ganglionar simpático adrenérgico a principios los años 70. (3, 9)

Células SH-SY5Y se derivaron de células de la cresta neural inmaduros neoplásicas que exhiben propiedades de las células madre y las células SH-SY5Y son inducidas a diferenciarse tras el tratamiento con una variedad de agentes, incluyendo ácido retinoico, forbol éster 12-O tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), cerebro-factor neurotrófico derivado (BDNF), dibutilil AMP cíclico (AMPcdb), purina, en consecuencia, la línea celular SH-SY5Y ha sido ampliamente utilizado en neurológica experimental estudios, incluido el análisis de la diferenciación neuronal, metabolismo y función relacionada con procesos neurodegenerativos y neuroadaptativos, neurotoxicidad, y neuroprotección. (3, 9, 19, 52)

3. MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso natural que se da desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar células inflamatorias, existen varias formas en la que las células mueren siendo las señales de muerte por estímulos externos o internos las que llevan al final al tipo de muerte celular. (7, 21)

El término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP.

Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular.

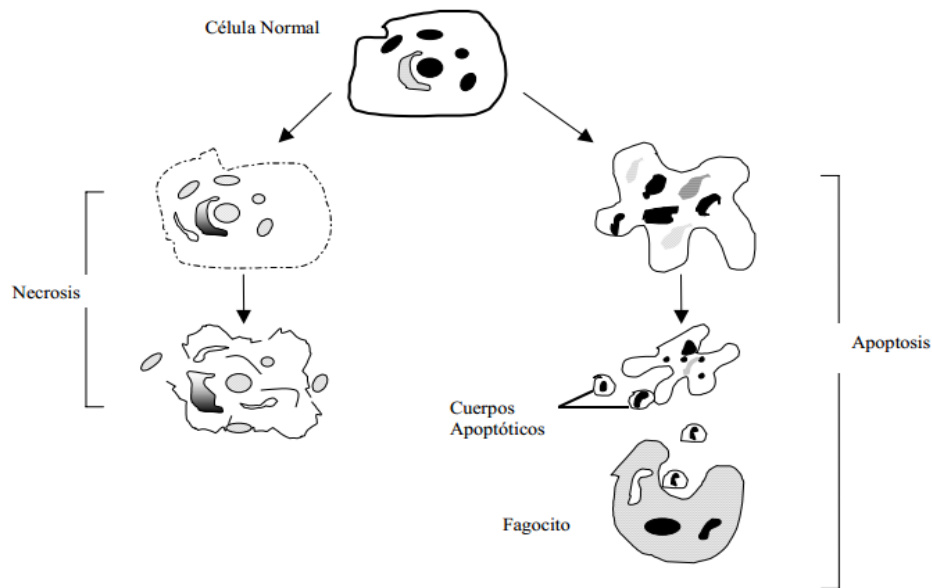
Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado. Siendo la necrosis causada por factores externos como toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere caída de ATP. (2)

El segundo tipo de muerte celular es conocido como apoptosis o muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Fig. 02). (2, 23, 31)

Hay diferencias entre la muerte celular por apoptosis y necrosis, en la necrosis no se encuentran las caspasas las responsables son otras proteasas como calpainas, catepsinas, enzimas lisosomales o PARP-1(14).

La forma de muerte celular depende del tipo de célula, el genotipo de célula, tipo de daño en el ADN y dosis del agente usado para la muerte celular. (14, 41, 45)

Figura 02: Muerte celular, diferencia entre necrosis y apoptosis.



Fuente: Revista Argentina de Anestesiología

4. APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso morfológico cuyas características incluyen con la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (piknosis), formación de ampollas en la membrana plasmática y contracción celular. (41) La apoptosis es un mecanismo natural para regular el número de células en que eventualmente las células se rompen en fragmentos (cuerpos apoptóticos) y son fagocitados iniciando un proceso de inflamación. (14, 41)

En la muerte por apoptosis, la serie de acontecimientos sucede de manera tan ordenada, que este proceso de suicidio celular se denomina muerte celular programada. Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis (7):

Fase efectora, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{++} intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular. (2, 7, 16)

Fase degradativa, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el ADN, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina. (2, 7)

Fase de eliminación, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas. (2, 7)

4.1. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende de la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladores de colonias), y la eliminación de ellos conduce irremediablemente a la apoptosis en lugar de a la cesación del crecimiento. (7, 23, 58)

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas, verdaderas guillotinas moleculares, son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteólisis. (44)

Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. (7, 23, 25, 58)

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión de ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNFR que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95, etc. (7, 23, 25)

4.2.CASPASAS

Diferentes tipos de eventos han sido reconocidos como importantes en la apoptosis, se puede tomar como el fundamental la participación de las caspasas una familia de proteasas. El nombre de caspasa proviene del término proteasa cisteína dependiente específica de aspartato, debido a sus propiedades enzimáticas las que son la especificidad por los sustratos conteniendo aspartato y el uso de cisteína para catalizar la unión de los péptidos. (12, 13, 22, 45, 58)

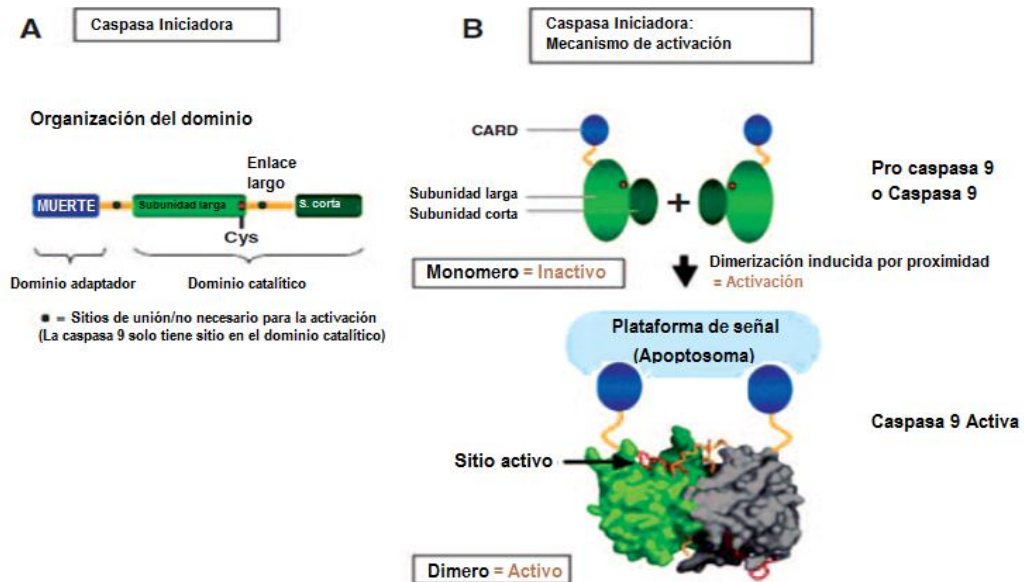
Las caspasas están presentes como zimógenos (proenzimas) la cual puede pasar a un estado activado por la proteólisis del residuo aspártico. (33, 41)

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. (7, 22, 31) Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteolisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. (7, 12, 13 31)

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto para la 14 que no lo tiene o lo tiene muy corto. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte (Fig. 03). Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores y juegan importantes papeles en la activación de las procaspasas. Por el contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es

probable que puedan mediar interacciones entre proteínas (Fig. 04). (7, 12, 13, 33, 36)

Figura 03: Activación de caspasa 9

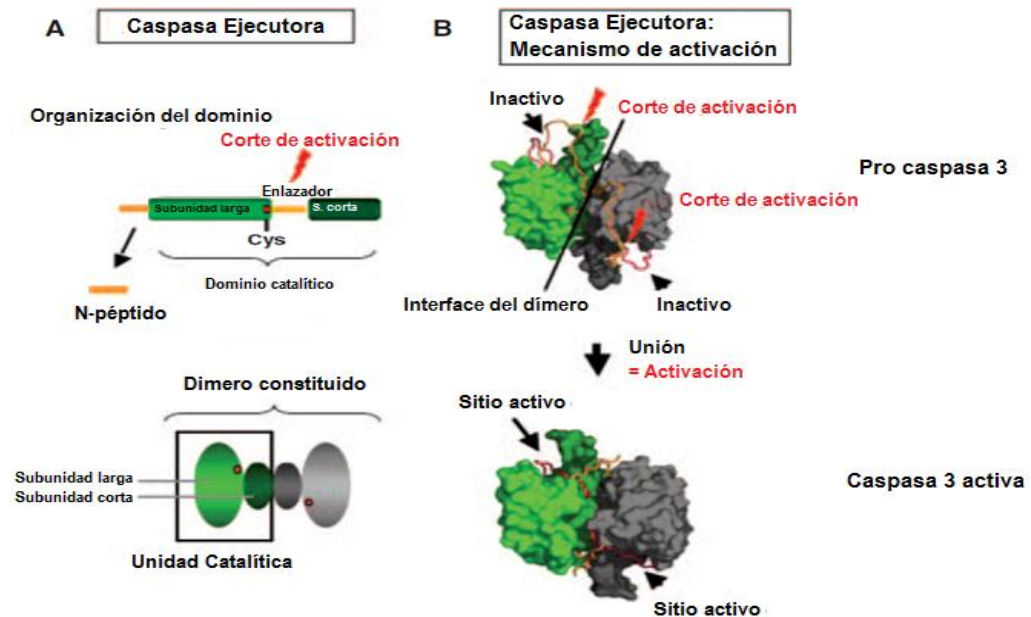


Fuente: Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy, 2008

En el citosol las caspasas 3 y 7 se encuentran como zimógenos y también en la forma de dímeros pero no están activas, es necesaria la unión de sus segmentos para su activación (Fig. 04). La caspasa 6 no ha sido estudiada profundamente pero también está clasificada como ejecutora. Las caspasas son expresadas como simples cadenas de proteínas, como las ejecutoras se encuentran como dímeros debe existir una doble unión para liberar un péptido n-terminal para su activación. (7, 12, 13, 33, 36)

No todas las caspasas están envueltas en la muerte celular un subgrupo de caspasas las caspasas 1, 4 y 5 están envueltas en los procesos de citoquinas pro inflamatorias como la pro-interleucina -1b y la pro-IL-18 estas enzimas no se unen a las dianas de las caspasas de muerte celular sino se unen a sitios de procitoquinas. (41)

Figura 04: Activación de caspasa 3

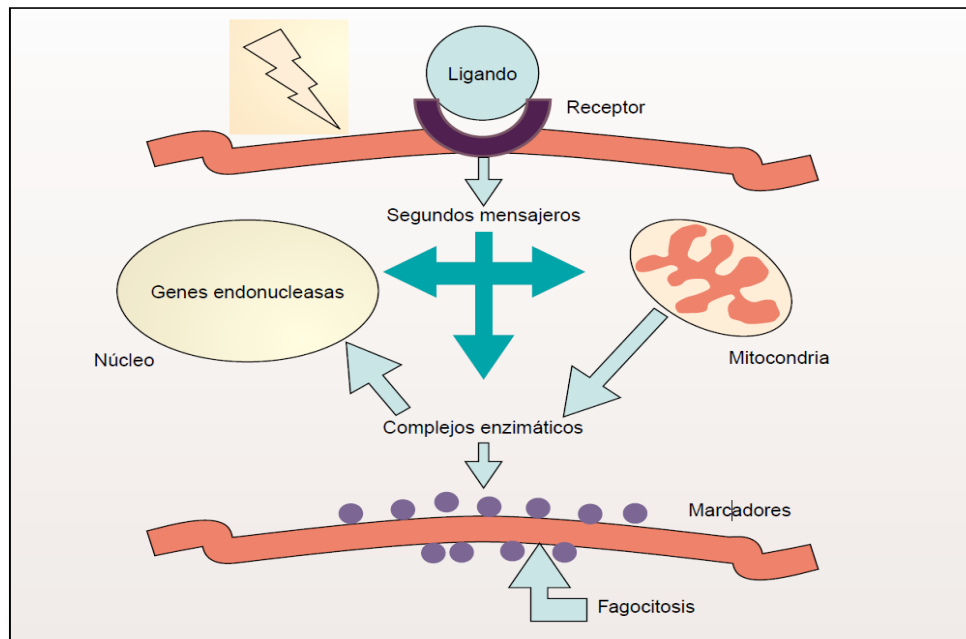


Fuente: Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy, 2008

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Uno consiste en los centros de los receptores de factor de necrosis tumoral que usa la activación de las caspasas como mecanismo de señal conectando un ligando desde la superficie celular para la inducción de la apoptosis y la otra envuelve la participación de la mitocondria que libera caspasas activando proteínas en el citosol luego iniciando la apoptosis (Fig. 05). Estas son conocidas como la vía extrínseca e intrínseca, en estas vías hay procesos comunes o cruzarse dependiendo de las proteínas expresadas. (7, 14, 41)

Estudios han demostrado que la caspasa 8 representa a la caspasa apical en la vía extrínseca, y la caspasa 9 en la intrínseca. (41)

Figura 05: Mecanismo de acción de la muerte celular.



Fuente: Ámbito Farmacéutico, Apoptosis: muerte celular programada, vol. 22, N° 6

4.3. APOPTOSIS VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca depende de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, que consiste en más de 20 proteínas. La vía extrínseca se relaciona con una serie de interacciones proteicas como la proteína Fadd que indirectamente se une a dominios citosólicos de TNF receptores como es Fas (Apo1/CD95), resultando en la activación de la procaspasa 8 cuando se une al receptor, liberando la caspasa 8 (41) Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las caspasas iniciadoras y a las ejecutoras. (7, 23, 30, 36, 41)

Después de la activación de un receptor de los denominados de muerte, la proteína adaptadora FADD media la inmediata activación de la caspasa-8 (caspasa iniciadora). La caspasa-8 una vez activada, desencadena su vez, la activación de otras caspasas, entre las que se incluye la caspasa-3 (caspasa ejecutora). Sin embargo, paralelamente, la caspasa-8 puede activar la vía apoptótica mitocondrial al activar la proteína Bid, la cual puede promover la

salida del citocromo c de la mitocondria y activar la caspasa-9. Al igual que la caspasa-8, la caspasa-9 iniciadora activa a las caspasas ejecutoras. (7, 23, 30, 56)

Los receptores de muerte más conocidos son Fas y el TNFR1 (receptor TNF). Son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula. (44) La unión de un activador complementario o ligando, FasL y TNF (factor de necrosis tumoral), respectivamente, transmite una señal al citoplasma que conduce a la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 al igual que la caspasa-9 inicia una cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamiento celular, a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula. (7, 23, 30, 41)

Son estos, por tanto, receptores de la superficie celular que transmiten las señales apoptóticas que se inician por unión del ligando específico. Estos receptores juegan un papel importante en la apoptosis ya que pueden activar la cascada de caspasas en pocos segundos después de la unión de ligando y receptor. Los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF) poseen generalmente otras funciones además de la de ser apoptogénicos. Los mejores caracterizados son el FAS o CD95, el TNFR-1 y los TRAIL DR4 y DR5. (7, 41)

La señalización por el TNFR-1 se produce en células T activadas por macrófagos en respuesta a infección. La unión de TNF α al TNFR-1 da lugar a la trimerización del receptor y a la agrupación de dominios intracelulares. Esto permite la unión de una molécula adaptadora denominada TRADD. (7, 33, 41)

El factor TNF se produce por las células T y por los macrófagos activos en respuesta a la infección. La unión del TNF al TNFR1 ejerce diversos efectos. El efecto señalizador conduce a la activación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1 lo que conlleva a la inducción de una serie de genes proinflamatorios e inmunomoduladores. En algunas células, sin embargo, el TNF puede inducir la apoptosis. La unión de TNF α a su receptor TNFR1

origina la trimerización del receptor y el agrupamiento de dominios de muerte intracelulares. Esto permite la unión de un adaptador intracelular denominado TRADD o dominio de muerte asociado al TNFR, vía interacciones entre los dominios de muerte. El dominio TRADD posee la capacidad de reclutar una serie de proteínas diferentes en el receptor activo. La unión de TRAF2 o factor asociado al TNF origina la activación de la vía NFkB y JNK/Ap1. (7, 41)

El dominio TRADD puede también asociarse con FADD y de esta manera se induce la apoptosis mediante el reclutamiento y rotura de la procaspasa-8. (7, 22, 41)

4.4.APOPTOSIS VÍA INTRÍNSECA

En la vía intrínseca la activación de las caspasas depende de la permeabilización de la membrana mitocondrial que es mediada por la familia de las proteínas bcl-2, lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el flujo de metabolitos bioenergéticos y componentes de permeabilidad en los poros de transición. En la activación es liberada una serie de componentes incluyendo citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y la endonucleasa G una vez en exterior estas proteínas promotoras de la apoptosis inducen a la ejecución de la apoptosis. (14, 45)

La liberación del citocromo c de la mitocondria induce directamente en el activación de la caspasa 3 formando un complejo apoptosómico conteniendo citocromo c/apaf-1/caspasa-9. Una vez en el citosol el citocromo c se une al Apaf -1 con un dominio CARD (caspase recruitment domain), la unión del citocromo c facilita la asociación de dATP con apaf-1 y expone su dominio CARD el cual forma una interacción con el iniciador caspasa- 9 formando una interacción CARD-CARD, consecutivamente ocurre el reclutamiento de la caspasa-3 al apoptosoma donde es activada por la caspasa 9. Caspasa 3 entonces une a los sustratos en la célula que produce muchos cambios en la célula. En ciertos casos la actividad de la caspasa instigada por el citocromo c contribuye a la caída de la metaloproteinasa de la matriz (MMP) generando la formación de especies reactivas de oxígeno. Eventos secundarios resultan de los

cambios citosólicos causados por la liberación de citocromo c y otras proteínas IMS pueden hacer un cambio feed back en la permeabilización de la mitocondria afectando sus funciones. (14)

Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 son otras proteínas liberadas por la mitocondria que facilitan la activación de las caspasas neutralizando los inhibidores endógenos de las caspasas IAPs, Omi/HtrA2 juega un papel importante en la regulación de la homeostasis. Una vez liberado las caspasas antagonizan a los IAPs que es dependiente de la caspasa e independientemente como proteasa al igual Smac/DIABLO es igual. (14, 45)

Los IAPs dependen de la concentración de citocromo c liberado el cual al tener mayor concentración de IAPs se puede inhibir las caspasas. AIF y endonucleasa G son liberadas de la mitocondria por permeabilización de la membrana y se transloca en el núcleo que contribuye en la condensación nuclear de la cromatina y la fragmentación del ADN, No es exacta la el tiempo en que se libera esta proteína antes o después del citocromo c. AIF no se conoce exactamente la función de DNasa ya que no tiene esta capacidad pero la administración de ciclofilina A peptidil-prolil cistrans isomerasa incrementa la acción de rompimiento de rompimiento de DNA. (2, 21, 45)



CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

La muestra de curcumina fue obtenida de distribuidores comerciales (Cayman Pharma), el ejemplar contenía una pureza de >90% de acuerdo a la descripción del producto.

Las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y se tomaron desde la primera generación las cuales fueron incubadas a 37°C bajo una atmosfera húmeda menor al 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas en DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium), 10% de FBS (suero bovino fetal), 50 UI/mL de penicilina, y 50 µg/mL de estreptomycin. Las células crecieron en medio conteniendo DMEM y 0.5% FBS. (19)

1.2.MATERIAL DE LABORATORIO

Material de vidrio

- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Matraces 50 y 100 mL
- Fiolas de 10, 25 y 50 mL
- Vaso de precipitado de 25 y 50 mL
- Viales
- Tubos de ensayo

Material descartable

- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Tubos de microcentrifuga (Eppendorf)
- Tubos de centrifuga de 45 mL
- Puntas desechables para micropipeta
- Frascos para cultivo celular
- Platos de incubación para crecimiento celular transparente
- Platos de incubación para crecimiento celular para fluorescencia

Equipos de laboratorio

- Sonicador de baño, VWR ®
- Camara de incubación, Memmert
- Campana de flujo laminar, ESCO
- Microscopio óptico ocular, PrimoStar Zeiss
- Cellometer Vision Image Cytometry (Nexcelom Bioscience)
- Centrifugadora de laboratorio, BD DYNAC III
- Microcentrifuga de laboratorio
- Lector de platos y UV, Sinergy HTX Multi-mode Reader
- Refrigeradora

Test de detección

- Equipo de detección de caspasas 3 y 9, ABCAM ®

1.3.REACTIVOS

- MTS (Solución acuosa preparada)
- Azul de tripan
- FBS (Suero Bovino Fetal al 10%)
- PBS (Buffer fosfato pH = 7.4)
- DMEM
- PEG (Polietilenglicol)
- DMSO (Dimetilsulfóxido)
- Penicilina (50 UI/mL)
- Estreptomicina (50 µg/mL)
- Peróxido de hidrógeno al 30% v/v

2. MÉTODOS

2.1.PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CURCUMINOIDES

La muestra conteniendo curcumina fue obtenida por Cayman Pharma la cual fue utilizada sin alguna modificación.

Para la preparación de la muestra se tomó como vehículos a PEG con 10 % de DMSO, se pesó 5.4 mg de curcumina para obtener una solución stock de 1000 µM teniendo un volumen final de 14.65 mL.

De la solución stock se tomó 1 mL y se diluyó con PEG y 10 % de DMSO hasta el volumen final de 10 mL obteniendo la concentración de 100 µM en el vial, en la utilización de los pozos tanto de fluorescencia como de absorbancia la concentración final será de 5 µM.

De la solución stock se tomó 2 mL y se diluyó con PEG y 10 % de DMSO hasta el volumen final de 10 mL obteniendo la concentración de 200 μM en el vial, en la utilización de los pozos tanto de fluorescencia como de absorbancia la concentración final será de 10 μM .

De la solución stock se tomó 4 mL y se diluyó con PEG y 10 % de DMSO hasta el volumen final de 10 mL obteniendo la concentración de 400 μM en el vial, en la utilización de los pozos tanto de fluorescencia como de absorbancia la concentración final será de 20 μM .

2.2.DETERMINACIÓN DE PUREZA DE CURCUMINOIDES

Para la determinación de la pureza del vial conteniendo curcumina se utilizó cromatografía en capa fina.

FUNDAMENTO

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. (45)

2.2.1. PROCEDIMIENTO

Para la determinación de pureza por Cromatografía en Capa Fina (TLC) la muestra fue tratada de la siguiente manera:

Del vial conteniendo curcumina se pesó 0.1 g el cual se transfirió a un vaso de precipitados añadiéndole 5 mL de metanol, la muestra fue sonicada por 10 minutos, siendo la muestra sembrada en placas de sílica gel por triplicado. Para la fase móvil se utilizó cloroformo: etanol: ácido acético en una proporción de 9.5: 0.5: 0.1 respectivamente.

Luego de 30 minutos se extrajo la placa de sílica gel, para la detección se utilizó UV a 254 nm y 365 nm mostrando los valores de Rf según los estándares bibliográficos, las cuales demuestran la los compuestos identificados como curcumina I (curcumina), curcumina II (dimetoxicurcumina), curcumina III (bis-dimetoxicurcumina). (56, 57)

2.3.CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

2.3.1. PROCEDIMIENTO

Las células de neuroblastoma se cultivaron desde la primera generación, se cultivaron dos líneas celulares, células de neuroblastoma de rata B-35 y células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, estas líneas celulares son tratadas de la misma manera sin alguna modificación, para la preparación de las muestras que fue tratada de la siguiente manera. (19)

Se tomó 1mL del vial original la cual contenía células en criogenización, se transfirió a un frasco para cultivo celular al cual se le añadió medio DMEM enriquecido con 10 % FBS hasta un volumen de 5 mL dejando incubar a 37 °C y 5 % de CO₂, la primera generación se obtiene a partir de los 5 a 7 días. (19)

Al tener las células listas para estudios correspondientes se procede a su extracción, para separar las células del frasco de cultivo se desecha el medio contenido en el frasco añadiendo 3 mL de tripsina y se deja en la incubadora por 15 minutos, moviéndola suavemente cada 5 minutos por 3 veces, al finalizar el tiempo de incubación se añade 6 mL de medio MDEM blanco. La suspensión se transfiere a un tubo para centrifuga, llevándola a centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. (19) Después de la centrifuga se obtiene un pellet de células, eliminando el medio se vuelve a resuspender en medio DMEM enriquecido con FBS y se homogeniza la suspensión tratando que sea uniforme.

La suspensión final es la que se utiliza para realizar la siguiente generación o para estudios específicos, pero antes de realizar una nueva generación o realizar el siguiente estudio se debe contabilizar la cantidad de células obtenidas y su porcentaje de viabilidad. (19)

Para el conteo de células se toma de la nueva suspensión 20 μL y se transfiere a un tubo de microcentrifuga y se añade 20 μL de trypan blue se agita hasta homogeneidad para luego tomar 20 μL y se añade a una placa para conteo celular, las cuales se ingresan al sistema para obtener el porcentaje de viabilidad y el conteo aproximado de células por mililitro. (19)

2.4. PREPARACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno se preparó a partir de una solución stock al 30 %, obteniendo la molaridad de 9.79 M.

Se prepara una solución madre al 0.1 M para la cual se toma 20 μL de la solución stock y se diluyen con PBS (Buffer fosfato salino) hasta el volumen de 2 mL.

De la solución madre se toman 20 μL y se diluye con PBS hasta el volumen final de 1 mL para obtener una concentración de 2 mM en el vial. Esta concentración finalmente se verá diluida en la preparación de los pozos que llega a la concentración de 100 μM por pozo.

De la solución madre se toman 60 μL y se diluye con PBS hasta el volumen final de 1 mL para obtener una concentración de 6 mM en el vial. Esta concentración finalmente se verá diluida en la preparación de los pozos que llega a la concentración de 300 μM por pozo.

De la solución madre se toman 100 μL y se diluye con PBS hasta el volumen final de 1 mL para obtener una concentración de 10 mM en el vial. Esta concentración finalmente se verá diluida en la preparación de los pozos que llega a la concentración de 500 μM por pozo.

De la solución madre se toman 200 μL y se diluye con PBS hasta el volumen final de 1 mL para obtener una concentración de 20 mM en el vial. Esta concentración finalmente se verá diluida en la preparación de los pozos que llega a la concentración de 1000 μM por pozo.

2.5. ENSAYOS DE VIABILIDAD

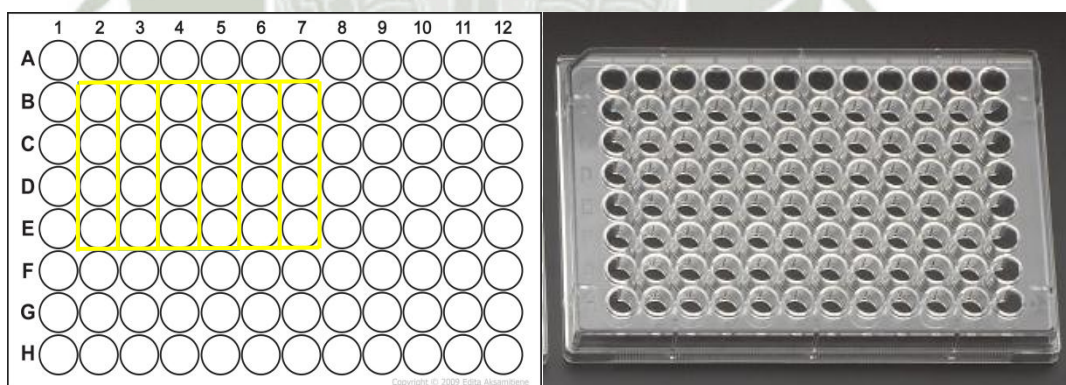
2.5.1. EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 Y SH-SY5Y

2.5.1.1. ENSAYO CON MTS

Para los ensayos de viabilidad se obtiene alrededor de 20000 células/pozo, esto se desarrolla a partir del número aproximado del conteo celular, los ensayos realizados son los mismos tanto para las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y.

Se preparó 6 columnas por 4 filas en pozos transparentes:

Figura 06: Esquema de plato transparente de 96 pozos



Fuente: Elaboración propia.

Siendo la primera columna, según la figura 06 corresponde de la 2B a 2E, el blanco que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al finalizar la incubación se añade 10 μL de PBS y se deja

incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de PBS.

La segunda columna según la figura 06 se ubica en la columna 3B a la 3E, siendo el 100 % de viabilidad al que se denomina grupo control que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO_2 , al finalizar la incubación se añade 10 μL de PBS y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS.

La tercera columna según la figura 06 se ubica en la columna 4B a la 4E, corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 2 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO_2 , al finalizar la incubación se añade 10 μL de peróxido de hidrógeno al 2 mM, y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS obteniendo la concentración final de peróxido de hidrógeno en el pozo de 100 μM .

La cuarta columna según la figura 06 se ubica en la columna 5B a la 5E, corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 6 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO_2 , al finalizar la incubación se añade 10 μL de peróxido de hidrógeno al 6 mM, y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS obteniendo la concentración final de peróxido de hidrógeno en el pozo de 300 μM .

La quinta columna según la figura 06 se ubica en la columna 6B a la 6E, corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 10 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1

hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al finalizar la incubación se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno al 10 mM, y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS obteniendo la concentración final de peróxido de hidrógeno en el pozo de 500 µM.

La sexta columna según la figura 06 se ubica en la columna 7B a la 7E, corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 20 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 µL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al finalizar la incubación se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno al 20 mM, y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS obteniendo la concentración final de peróxido de hidrógeno en el pozo de 1000 µM.

Al finalizar el tratamiento a todas las muestras en el pozo se deja incubando por 3 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ y se lleva al lector de pozos para la medición de la absorbancia.

FUNDAMENTO

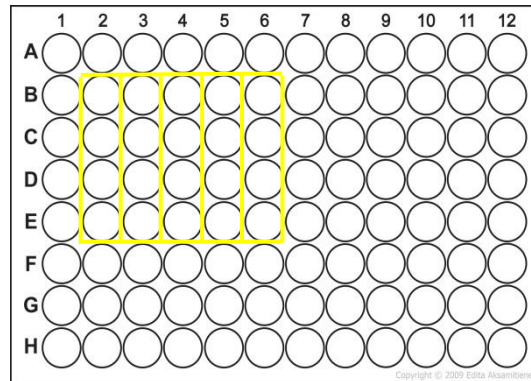
El ensayo de viabilidad de MTS es un método colorimétrico, que determina el número de células vivas, citotoxicidad o quimio sensibilidad, usando el reactivo MTS, el fundamento se basa en que la sal de MTS es reducido a Formazan por la enzima deshidrogenasa que se encuentra en células vivas, a las cuales se le mide la absorbancia que es proporcional al número de células vivas.

2.5.1.2. CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 Y SH-SY5Y SOMETIDAS CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN TIEMPOS DETERMINADOS

Para este ensayo se tomó en cuenta el tiempo que toma el peróxido de hidrógeno en dañar a las células para ello se realizó el siguiente procedimiento:

Para las células de neuroblastoma B-35 se preparó 5 columnas en pozos transparentes:

Figura 07: Esquema de plato transparente de 96 pozos



Fuente: Elaboración propia.

La primera columna según la figura 07 se ubica en la columna 2B a la 2E, corresponde al 100 % de viabilidad que contiene aproximadamente 20000 células por pozo el cual se enrazó a 180 μ L con medio enriquecido con FBS, al término de la adición del medio se registró la forma que las células tomaban al adicionar el medio, registrando la variación en su morfología a tiempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutos y luego a las 24 horas y 48 horas.

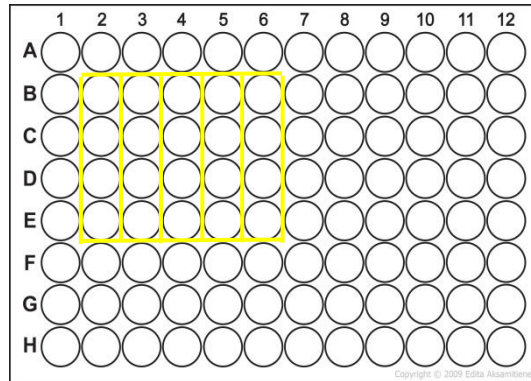
Las siguientes columnas según la figura 07 se ubican de la columna 3B a la 3E hasta la 6B a la 6E, corresponden al efecto que tienen las concentraciones de 2, 6, 10 y 20 mM de peróxido de hidrógeno sobre las células, las que contienen aproximadamente 20000 células por pozo el cual se enraza con medio enriquecido con FBS las que se dejaron incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al final de la incubación se añade 10 μ L de peróxido de hidrógeno. Al término de la adición del peróxido de hidrógeno se registró la forma que las células tomaban al añadir el peróxido de hidrógeno registrando los cambios a tiempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutos y luego a las 24 horas y 48 horas.

2.5.2. EFECTO DE LOS CURCUMINOIDES SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 Y SH-SY5Y

Para los ensayos de viabilidad se obtiene alrededor de 20000 células/pozo, esto se desarrolla a partir del número aproximado del conteo celular, los ensayos realizados son los mismos tanto para las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y.

Se preparó 5 columnas por 4 filas en los pozos:

Figura 08: Esquema de plato transparente de 96 pozos



Fuente: Elaboración propia.

Siendo la primera columna el blanco según la figura 08 se ubica en la columna 2B a la 2E que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 190 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂, al finalizar la incubación se añade 10 μ L del vehículo que contiene 10 % de DMSO y PEG, se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones.

La segunda columna corresponde al 100 % de viabilidad según la figura 08 se ubica en la columna 3B a la 3E al que se denomina grupo control que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂, al finalizar la incubación se añade 10 μ L del vehículo que contiene 10 % de DMSO y PEG, se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μ L de MTS.

La tercera columna corresponde a la concentración de curcumina de 100 μ M en el vial según la figura 08 se ubica en la columna 4B a la 4E, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂, al finalizar la incubación se añade 10 μ L de curcumina a 100 μ M, y se

deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS obteniendo la concentración final de curcumina en el pozo de 5 μM .

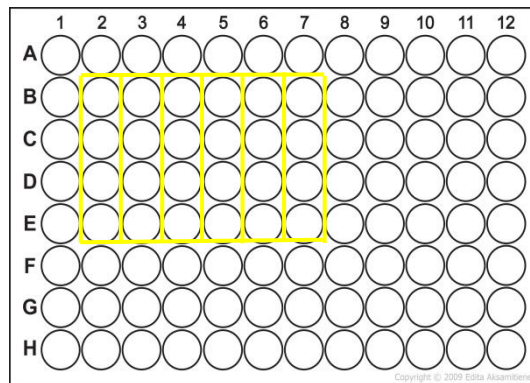
La cuarta columna corresponde a la concentración de curcumina de 200 μM en el vial según la figura 08 se ubica en la columna 5B a la 5E, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO_2 , al finalizar la incubación se añade 10 μL de curcumina a 200 μM , y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS obteniendo la concentración final de curcumina en el pozo de 10 μM .

La quinta columna corresponde a la concentración de curcumina de 400 μM en el vial según la figura 08 se ubica en la columna 6B a la 6E, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO_2 , al finalizar la incubación se añade 10 μL de curcumina a 400 μM , y se deja incubando por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones; después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS obteniendo la concentración final de curcumina en el pozo de 20 μM .

2.5.3. EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 Y SH-SY5Y PRETRATADAS CON CURCUMINOIDES SEGUIDO POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Para los ensayos de viabilidad se obtiene alrededor de 20000 células/pozo, esto se desarrolla a partir del número aproximado del conteo celular, los ensayos realizados son los mismos tanto para las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y.

Se preparó 6 columnas por 4 filas en los pozos por cada concentración de curcuminoides:

Figura 09: Esquema de plato transparente de 96 pozos

Fuente: Elaboración propia.

Concentración de 5 μM de curcuminoides

Siendo la primera columna el blanco según la figura 09 se ubica en la columna 2B a la 2E, que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enraizando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vehículo de curcuminoides que contiene 10 % de DMSO y PEG, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vehículo de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones.

La segunda columna corresponde al grupo control según la figura 09 se ubica en la columna 3B a la 3E que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enraizando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 100 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vehículo de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 5 μM en el pozo.

La tercera columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 2 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 4B a la 4E esta columna

contiene aproximadamente 20000 células/pozo enraizando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 100 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vial de 2 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 5 μM y 100 μM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La cuarta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 6 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 5B a la 5E esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enraizando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 100 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vial de 6 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 5 μM y 300 μM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La quinta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 10 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 6B a la 6E esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enraizando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 100 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vial de 10 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 5 μM y 500 μM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La sexta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 20 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 7B a la 7E esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 μ L del vial que contiene 100 μ M de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μ L del vial de 20 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μ L de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 5 μ M y 1000 μ M de peróxido de hidrógeno en el pozo.

Concentración de 10 μ M de curcuminoides

Siendo la primera columna el blanco que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 μ L del vehículo de curcuminoides que contiene 10 % de DMSO y PEG, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μ L del vehículo de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones.

La segunda columna corresponde al grupo control que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 μ L del vial que contiene 200 μ M de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μ L del vehículo de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μ L de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 10 μ M en el pozo.

La tercera columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 2 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μ L por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el

medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 µL del vial que contiene 200 µM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 µL del vial de 2 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 10 µM y 100 µM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La cuarta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 6 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 µL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 µL del vial que contiene 200 µM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 µL del vial de 6 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 10 µM y 300 µM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La quinta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 10 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 µL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 µL del vial que contiene 200 µM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 µL del vial de 10 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 10 µM y 500 µM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La sexta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 20 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo

enrazando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 200 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vial de 20 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 10 μM y 1000 μM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

Concentración de 20 μM de curcuminoides

Siendo la primera columna el blanco según la figura 09 se ubica en la columna 2B a la 2E que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vehículo de curcuminoides que contiene 10 % de DMSO y PEG, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vehículo de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones.

La segunda columna corresponde al grupo control según la figura 09 se ubica en la columna 3B a la 3E que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 400 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vehículo de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 20 μM en el pozo.

La tercera columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 2 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 4B a la 4E esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 μL por pozo de

medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 µL del vial que contiene 400 µM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 µL del vial de 2 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 20 µM y 100 µM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La cuarta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 6 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 5B a la 5E esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 µL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 µL del vial que contiene 400 µM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 µL del vial de 6 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 20 µM y 300 µM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La quinta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 10 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 6B a la 6E esta columna contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 170 µL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂, al término de la incubación se añade 10 µL del vial que contiene 400 µM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 µL del vial de 10 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 µL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 20 µM y 500 µM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

La sexta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 20 mM en el vial, según la figura 09 se ubica en la columna 7B a la 7E esta columna

contiene aproximadamente 20000 células/pozo enraizando a 170 μL por pozo de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 , al término de la incubación se añade 10 μL del vial que contiene 400 μM de curcuminoides, dejando incubar por 1 hora, al finalizar la incubación se añade 10 μL del vial de 20 mM de peróxido de hidrógeno y se deja incubar por segunda vez por 24 horas a las mismas condiciones, después de las 24 horas se añade 10 μL de MTS, siendo la concentración final de los curcuminoides de 20 μM y 1000 μM de peróxido de hidrógeno en el pozo.

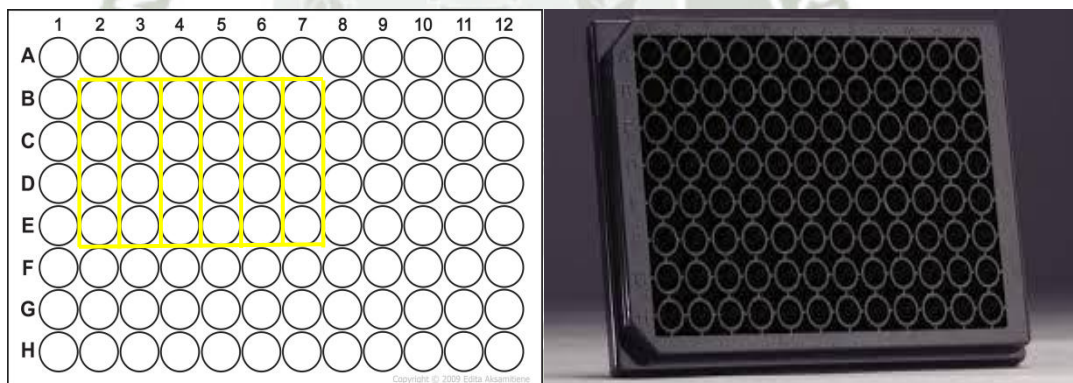
2.6. TEST DE INHIBICIÓN DE CASPASAS 3 Y 9

Para los ensayos de inhibición de caspasas 3 y 9 se utilizaron diversos kits de detección.

2.6.1. DETECCIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CASPASA 3 ABCAM®

Para la utilización del kit es necesaria la utilización de platos de fluorescencia.

Figura 10: Esquema de plato de fluorescencia de 96 pozos



Fuente: Elaboración propia.

Se preparó 6 columnas por 4 filas:

La primera columna corresponde al blanco, según la figura 10 se ubica en la columna 2B a la 2E, que contiene 50 μL /pozo de agua desionizada, al que se le adiciona 50 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT finalmente se añade 5 μL del vehículo (PEG y DMSO) de los curcuminoides.

La segunda columna corresponde al 100 % de actividad, según la figura 10 se ubica en la columna 3B a la 3E, que contiene 50 μL /pozo de agua desionizada, luego 45 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT, al que se le adiciona 5 μL de la caspasa 3 activa y 5 μM de sustrato específico, finalmente se añade 5 μL del vehículo (PEG y DMSO) de los curcuminoides.

La tercera columna es la que tiene inhibición de la caspasa a la que se denomina control positivo, según la figura 10 se ubica en la columna 4B a la 4E, se prepara 50 μL /pozo de agua desionizada, se añade 50 μL la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas DEVD-AFC al que se adiciona 5 μM de caspasa 3 y 10 μL del inhibidor específico de caspasa proporcionado por el kit.

La cuarta columna corresponde a la concentración de curcuminoides de 100 μM en el vial, según la figura 10 se ubica en la columna 5B a la 5E, se prepara 50 μL de agua desionizada, a la muestra se le añade 50 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y se añade 10 μL del vial que contiene 100 μM de curcuminoides, mezclar suavemente para que empiece la reacción, obteniendo la concentración final de curcuminodes de 5 μM .

La quinta columna corresponde a la concentración de curcuminoides de 200 μM en el vial, según la figura 10 se ubica en la columna 6B a la 6E, se prepara 50 μL de agua desionizada, a la muestra se le añade 50 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas DEVD-AFC y se añade 10 μL del vial que contiene 200 μM de curcuminoides, mezclar suavemente para que empiece la reacción, obteniendo la concentración final de curcuminodes de 10 μM .

La sexta columna corresponde a la concentración de curcuminoides de 400 μM en el vial, según la figura 10 se ubica en la columna 7B a la 7E, se prepara 50 μL de agua desionizada, a la muestra se le añade 50 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas DEVD-AFC y se añade 10 μL del vial que contiene 400 μM de curcuminoides, mezclar suavemente para que empiece la reacción, obteniendo la concentración final de curcuminodes de 20 μM .

Incubar el pozo a 37 °C y 5 % de CO₂ por una hora, las muestras se ponen al lector de pozos para fluorescencia a filtros de 400 nm de excitación y 505 nm de emisión.

2.6.2. DETECCIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CASPASA 9 ABCAM®

Para la utilización del kit es necesaria la utilización de pozos de fluorescencia.

Se preparó 6 columnas por 4 filas:

La primera columna corresponde al blanco, según la figura 10 se ubica en la columna 2B a la 2E, que contiene 50 µL/pozo de agua desionizada, al que se le adiciona 50 µL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT finalmente se añade 5 µL del vehículo (PEG y DMSO) de los curcuminoides.

La segunda columna corresponde al 100 % de actividad, según la figura 10 se ubica en la columna 3B a la 3E, que contiene 50 µL/pozo de agua desionizada, luego 45 µL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT, al que se le adiciona 5 µL de la caspasa 9 activa y 5 µM de sustrato específico, finalmente se añade 5 µL del vehículo (PEG y DMSO) de los curcuminoides..

La tercera columna es la que tiene inhibición de la caspasa a la que se denomina control positivo, según la figura 10 se ubica en la columna 4B a la 4E, se prepara 50 µL/pozo de agua desionizada, se añade 50 µL la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas LEHD-AFC al que se adiciona 5 µM de caspasa 9 y 10 µL del inhibidor específico de caspasa proporcionado por el kit.

La cuarta columna corresponde a la concentración de curcuminoides de 100µM en el vial, según la figura 10 se ubica en la columna 5B a la 5E, se prepara 50 µL de agua desionizada, a la muestra se le añade 50µL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas LEHD-AFC y se añade 10 µL del vial que contiene 100 µM de curcuminoides, mezclar suavemente para que empiece la reacción, obteniendo la concentración final de curcuminodes de 5 µM.

La quinta columna corresponde a la concentración de curcuminoides de 200 µM en el vial, según la figura 10 se ubica en la columna 6B a la 6E, se prepara 50 µL de

agua desionizada, a la muestra se le añade 50 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas LEHD-AFC y se añade 10 μL del vial que contiene 200 μM de curcuminoides, mezclar suavemente para que empiece la reacción, obteniendo la concentración final de curcuminoides de 10 μM .

La sexta columna corresponde a la concentración de curcuminoides de 400 μM en el vial, según la figura 10 se ubica en la columna 7B a la 7E, se prepara 50 μL de agua desionizada, a la muestra se le añade 50 μL de la mezcla matriz que contiene 10 mM de MTT y 1 mM del sustrato específico de las caspasas LEHD-AFC y se añade 10 μL del vial que contiene 400 μM de curcuminoides, mezclar suavemente para que empiece la reacción, obteniendo la concentración final de curcuminoides de 20 μM .

Incubar el pozo a 37 °C y 5 % de CO_2 por una hora, las muestras se ponen al lector de pozos para fluorescencia a filtros de 400 nm de excitación y 505 nm de emisión.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de cada muestra se utilizó el análisis de varianza ANOVA seguido por el test de Dunnett

A) Análisis de varianza ANOVA

Cuando se pretende comprobar si hay diferencia entre dos o más grupos, el análisis de varianza ANOVA es el indicado ya que indica si hay o no diferencia significativa entre dos o varios grupos.

B) Test de Dunnett

Para interpretar los resultados del análisis de varianza ANOVA es probable que sea necesario utilizar test de Dunnett ya que al obtener una diferencia significativa en los resultados por ANOVA se compara el grupo control con los demás grupos para interpretar cuáles grupos son los que tienen diferencia significativa con respecto al grupo control.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

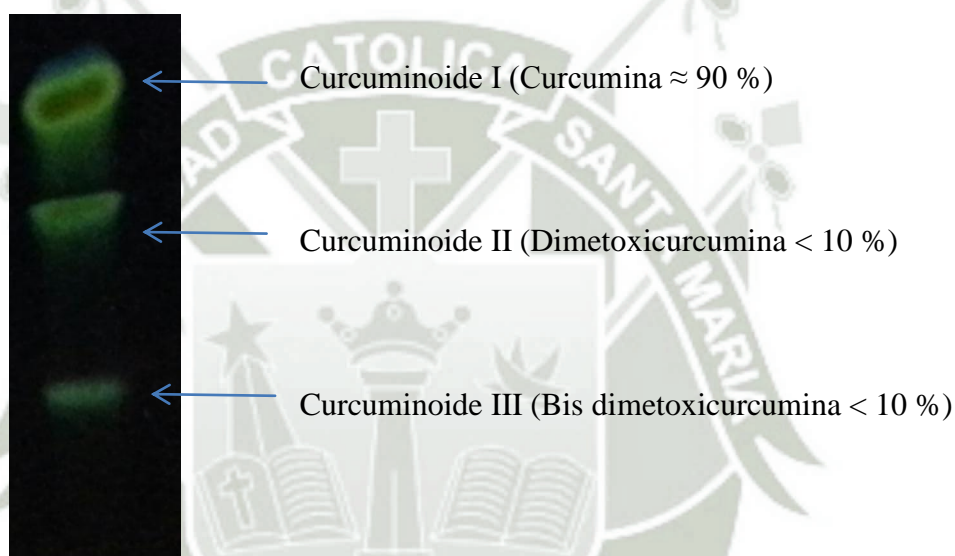
1. ANÁLISIS DE LA DETERMINACIÓN DE PUREZA DE LOS CURCUMINOIDES

La finalidad del análisis fue de identificar a los curcuminoides presentes en la muestra, para ello se procedió a la identificación por cromatografía en capa fina a partir de la muestra existente, las placas cromatográficas que fueron reveladas con luz UV a 254 y 366 nm como se muestra en la figura N° 11.

El cromatograma reveló que la muestra contenía los 3 tipos de curcuminoides ya que las manchas concuerdan con la distancia recorrida según estándares bibliográficos las cuales son: Curcumina $R_f \approx 0.6$, Dimetoxicurcumina $R_f \approx 0.5-0.55$ y Bis-dimetoxicurcumina $R_f \approx 0.3$ (56), las manchas mostraron diferentes intensidades que corresponden a las diferentes concentraciones que contiene los

curcuminoides siendo la de menor intensidad la primera comenzando de abajo hacia arriba corresponde al Rf de 0.3 que indica la presencia de Bis dimetoxicurcumina (Curcuminoide III), la segunda de mediana intensidad corresponde al Rf de 0.52 que indica la presencia de Dimetoxicurcumina (Curcuminoide II) y la tercera de mayor intensidad corresponde al Rf de 0.62 que indica la presencia de Curcumina (Curcuminoide I). En las placas no hubo evidencia de otras manchas que indicarían la presencia de otros compuestos en la muestra.

Figura 11: Placa cromatográfica de curcuminoides observada bajo 254 nm



Fuente: Elaboración propia.

2. CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

Las células de neuroblastoma fueron cultivadas e incubadas en condiciones controladas de temperatura (37 °C) y CO₂ (5 %).

2.1. VIABILIDAD Y CONTEO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35

En la tabla N° 1 se muestra la viabilidad de las células que presentaron desde la primera generación hasta la quinceava generación, debido a la rapidez en el crecimiento celular se pudo trabajar hasta la quinceava generación.

Tabla 01: Conteo celular y porcentaje de viabilidad de las células de neuroblastoma B-35 (rata)

CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35		
Generación	Células/mL	% Viabilidad
1	2860000	81.50 %
2	917000	93.80 %
3	2780000	91.20 %
4	3700000	92.50 %
5	2350000	92.20 %
6	2790000	94.00 %
7	1000000	86.00 %
8	2950000	90.00 %
9	2300000	92.00 %
10	2350000	96.20 %
11	2250000	88.00 %
12	1570000	91.30 %
13	1940000	97.50 %
14	1910000	97.20 %
15	2060000	95.90 %

Fuente: Elaboración propia.

La tabla muestra la cantidad aproximada de células que se produce por generación. Según estos resultados tanto la viabilidad y el número de células producidas no tuvieron diferencia significativa desde la primera generación a la quinceava, lo que indicaría que al pasar las generaciones se garantiza la homogeneidad de los resultados.

A fin de conocer el desarrollo de las células de neuroblastoma B-35 se observó las células desde el inicio de la incubación que se muestra en la figura 12 que muestra el inicio desarrollo de las células a 1 hora después del inicio de la

incubación, tiempo en el que las células se adaptaron a su nuevo medio y comienzo de desarrollo.

En la figura 13 se observa desarrollo de las células a las 12 horas a esta hora se observa cambios morfológicos pero las células aún no se encuentran con la forma y el número necesario para estudios posteriores. Estas condiciones se observan a las 48 horas que se observa en la figura 14 con forma definida y un volumen de células óptima para el desarrollo de estudios posteriores.

Figura 12: Desarrollo de las células a 60 minutos de iniciada la incubación .

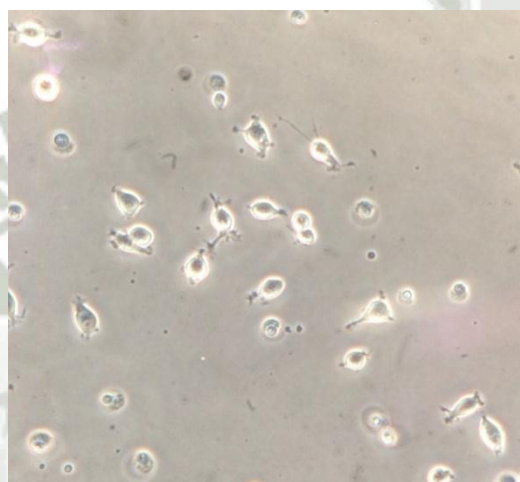


Figura 13: Desarrollo de las células a 12 horas de iniciada la incubación.

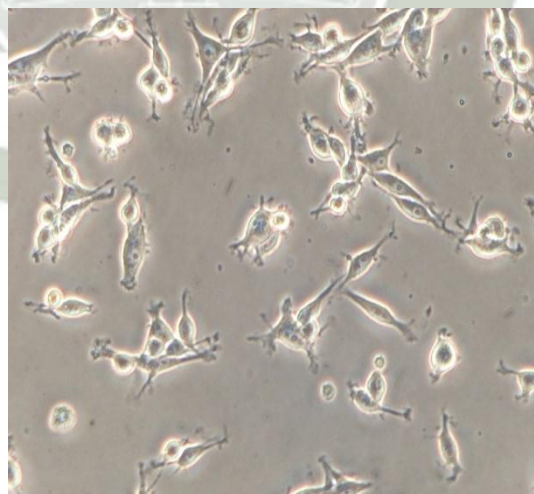
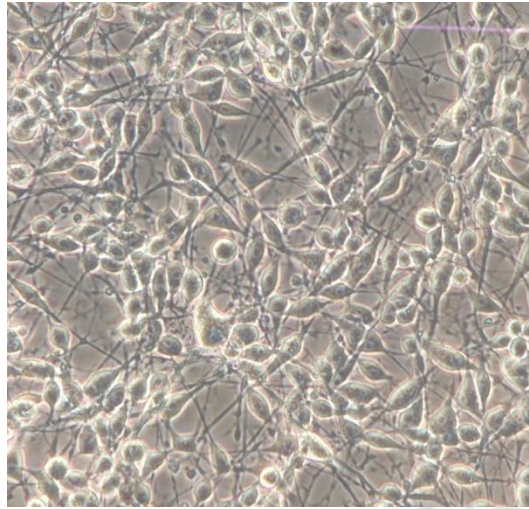


Figura 14: Desarrollo de las células a 48 horas de iniciada la incubación.



Según las imágenes las células al momento de inicio de la incubación se encuentran en una fase latente la cual tiene un periodo de adaptabilidad al nuevo medio que cuenta con un promedio de 1-2 horas a partir de esta hora el crecimiento celular comienza multiplicándose exponencialmente durante los siguientes días teniendo las células su mayor desarrollo al segundo y tercer día, la velocidad de crecimiento se ve afectada según la cantidad de células, a mayor cantidad de células incubadas al inicio de las incubación más rápido es el crecimiento celular.

2.2.VIABILIDAD Y CONTEO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y (humano) son similares en muchos aspectos que las células de neuroblastoma B-35, tanto en morfología como en su actividad biológica.

En la tabla 02 se muestra la viabilidad de las células que presentaron desde la primera generación hasta la séptima generación. Las células de neuroblastoma SH-SY5Y (humano) tienen un mayor tiempo de incubación las que pueden tomar de 72 horas a más para obtener el desarrollo óptimo para posteriores estudios, las cuales pueden variar según el número de células que se emplearon para cada generación.

Tabla 02: Conteo celular y porcentaje de viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y (humano).

CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y		
Generación	Células/mL	% Viabilidad
1	1890000	96.40 %
2	1770000	99.40 %
3	2060000	95.90 %
4	2020000	94.30 %
5	1950000	97.00 %
6	2400000	96.90 %
7	2080000	86.90 %

Fuente: Elaboración propia.

La tabla muestra la cantidad aproximada de células que se produce por generación. Todas las generaciones tienen un porcentaje de viabilidad y conteo celular semejante.

Se observó el desarrollo de las células desde el inicio de la incubación hasta las 72 horas de incubación. Siendo a los 60 minutos tiempo en el que se observa los primeros cambios morfológicos como se muestra en la figura 15, tiempo que tomaron las células para adaptarse al nuevo medio.

A las 24 horas las células comienzan a tener forma definida tal como se muestra en la figura 16 pero su volumen y características morfológicas no son los adecuados para estudios posteriores.

Las células muestran desarrollo óptimo a las 72 horas de iniciada la incubación como se muestra en la figura 17, este tiempo se ve afectado por el número de células que se utilizaron al inicio de la incubación ya que a mayor número de células más rápido las células se adaptan a su medio y el tiempo para su desarrollo óptimo es menor.

Figura 15: Desarrollo de las células a los 60 minutos de incubación

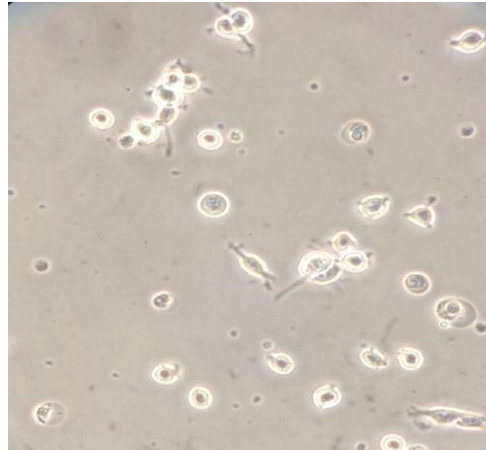


Figura 16: Desarrollo de las células a las 12 horas de incubación

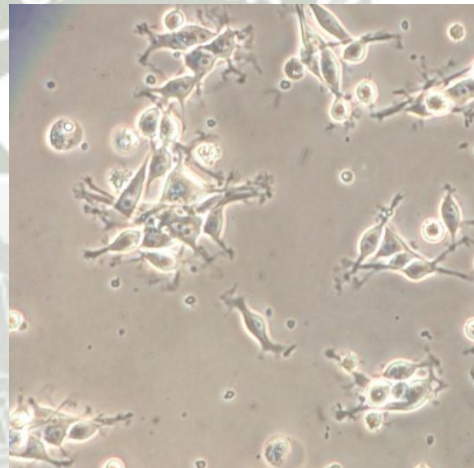
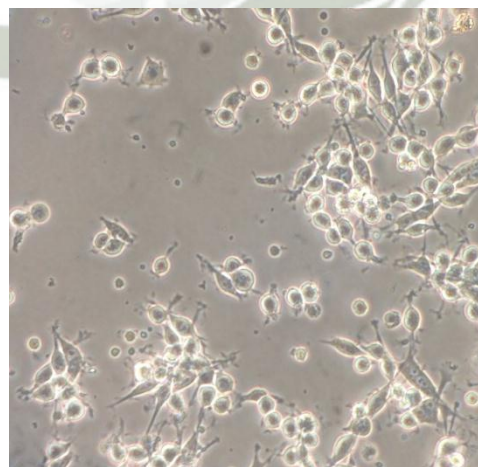


Figura 17: Desarrollo de las células a las 48 horas de incubación



Al igual que a las células B-35 se realizó un seguimiento del crecimiento celular, según el desarrollo de las células de neuroblastoma de rata B-35 tienen una velocidad de crecimiento mayor que las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en la cual se pudo observar que las células SH-SY5Y tienen un mayor tiempo de adaptabilidad al nuevo medio y un tiempo mayor de crecimiento, es por ello que el número de generaciones de las células SH-SY5Y es menor que las células B-35.

2.3.EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35

Una vez realizado los estudios de viabilidad de las células de neuroblastoma se procedió al análisis del efecto que causa el peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células cuyos resultados se muestran en la tabla 03 y en la figura 18, el ensayo de viabilidad se comparó con el grupo control siendo este grupo el 100 % de actividad.

Las condiciones para el desarrollo de las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂, y el almacenamiento del peróxido de hidrógeno se mantuvo a una temperatura de 5 °C y protegiéndola de la luz forrándola con papel aluminio.

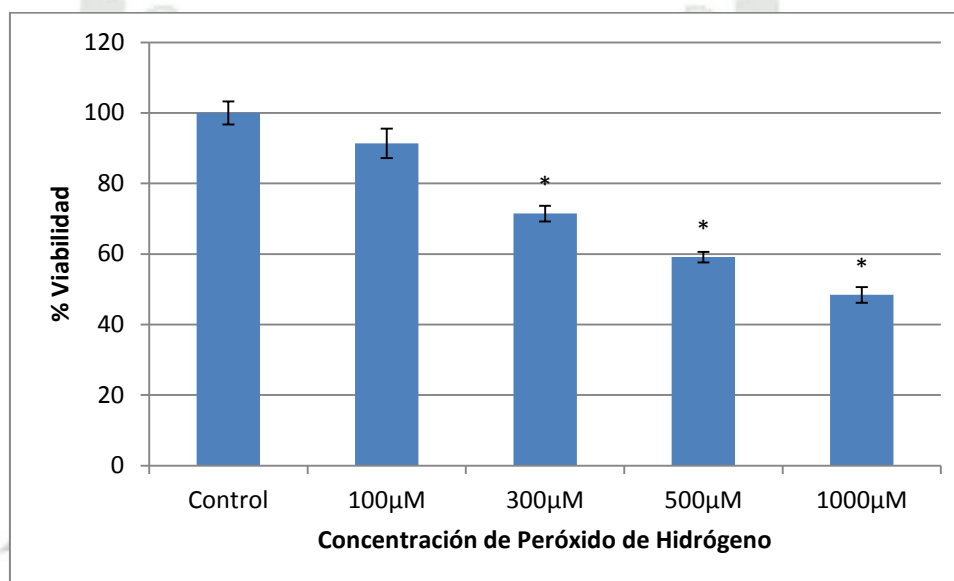
Estos resultados demuestran que el peróxido de hidrógeno afecta la viabilidad de las células, siendo la concentración de 100 µM no significativa para el daño celular ya que se observa que las células tienen un porcentaje de viabilidad de 91 %, pero a partir de la concentración de 300 µM de peróxido de hidrógeno muestra un daño significativo ya que las células muestran una viabilidad de 71 % y mayor daño a concentraciones de 500 µM y menor del 50 % de viabilidad a partir de 1000 µM, se puede afirmar que el daño celular es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno.

Tabla 03: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Control	100 μ M	300 μ M	500 μ M	1000 μ M
100.00 %	91.37 %	71.45 %	59.09 %	48.39 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 18: Efecto de la administración de peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de neuroblastoma de rata B-35.



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett para todos los grupos versus el grupo control. (* Representa diferencia entre el grupo control y la concentración de peróxido de hidrógeno)

El daño a las células de neuroblastoma B-35 también se puede evidenciar en las siguientes figuras, tomando como referencia al grupo control (Fig. 19) al que no se observa daño celular. A concentraciones de 300 μ M se observó cambios morfológicos en las células (Fig. 20) y finalmente a concentraciones de 1000 μ M el desarrollo de las células disminuyó drásticamente (Fig. 21).

Figura 19: Desarrollo del grupo control a las 24 horas.

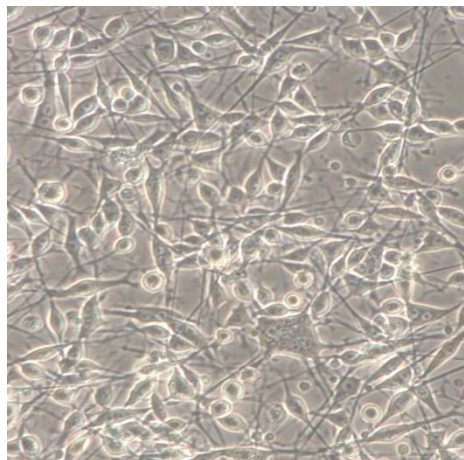


Figura 20: Efecto del peróxido de hidrógeno a 300 μM sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35.

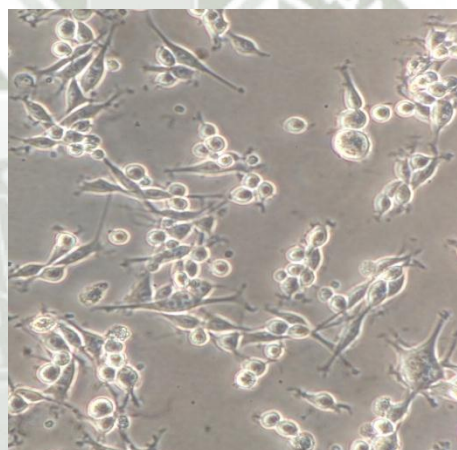
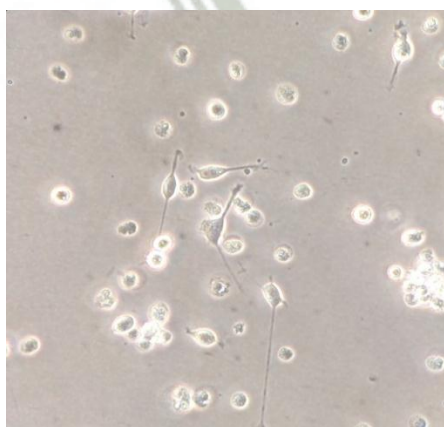


Figura 21: Efecto del peróxido de hidrógeno a 1000 μM sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35.



Como se muestran en las figuras las células se ven afectadas al encontrarse el peróxido de hidrógeno en el medio ya que las células adoptan una forma circular, algunas se aglomeran pero no se desarrollan, se evidencia que a mayor concentración de peróxido de hidrógeno mayor es el daño confirmando los resultados obtenidos por la figura 21 en que a concentraciones de 1000 μM se obtiene un porcentaje de viabilidad menor al 50 % que se evidencia en la figura 16 mostrando células no desarrolladas en forma circular.

2.4.EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

Al igual que el estudio del efecto del peróxido sobre la viabilidad de células de neuroblastoma B-35 se quiso demostrar el efecto que causaba el peróxido de hidrógeno frente a las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y cuyos resultados se muestran en la figura 22 y en la tabla 04, el ensayo de viabilidad se comparó con grupo control siendo este grupo el 100 % de actividad.

Las condiciones para el desarrollo de las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO_2 , y el peróxido de hidrógeno a una temperatura de 5 °C y protegiéndola de la luz forrándola con papel aluminio.

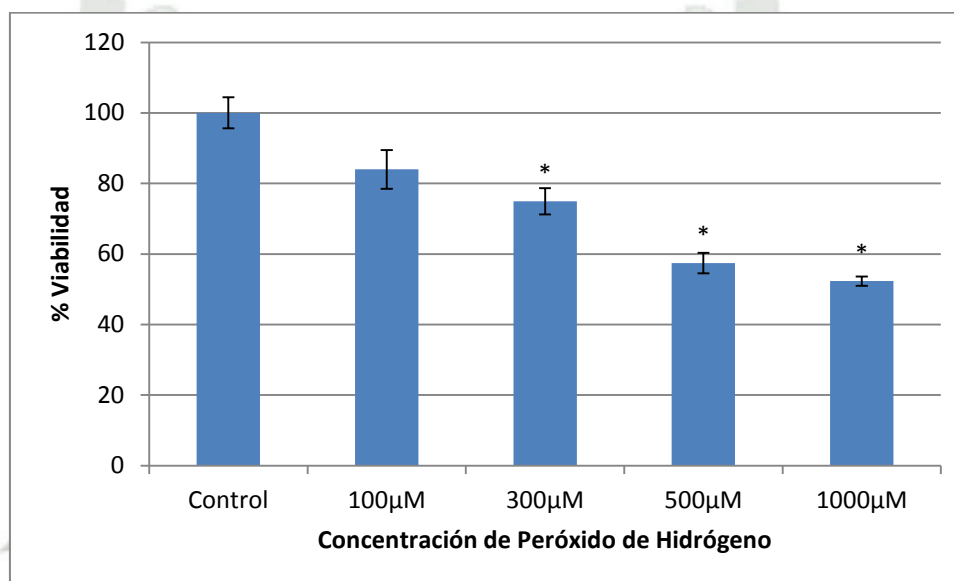
Estos resultados demuestran que el peróxido de hidrógeno afecta la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y teniendo daño significativo a partir de las concentraciones de 300 μM , observando que el daño es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno teniendo el máximo daño a la concentración de 1000 μM .

Tabla 04: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Control	100 μ M	300 μ M	500 μ M	1000 μ M
100.00 %	83.97 %	74.95 %	57.41 %	52.30 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 22: Efecto de la administración de peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de neuroblastoma SH-SY5Y.



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett para todos los grupos versus el grupo control. (* Representa diferencia entre el grupo control y la concentración de peróxido de hidrógeno).

El daño se evidencia en los cambios morfológicos que sufren las células cuando se compara con el grupo control que no evidencia cambio alguno (Fig. 23), teniendo cambios significativos en cuanto a sus características morfológicas a 300 μ M de peróxido de hidrógeno (Fig. 24), a 1000 μ M de peróxido de hidrógeno el daño es irreversible ya que según se observa en la figura 25 el 52% de las células sufrieron muerte celular o no pudieron desarrollarse por completo.

Figura 23: Desarrollo del grupo control a las 24 horas.

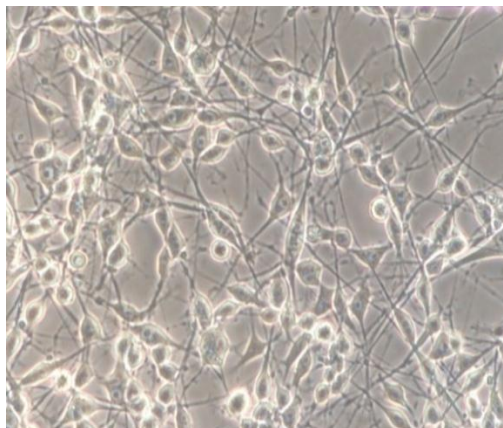


Figura 24: Efecto del peróxido de hidrógeno a 300 μM sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y.

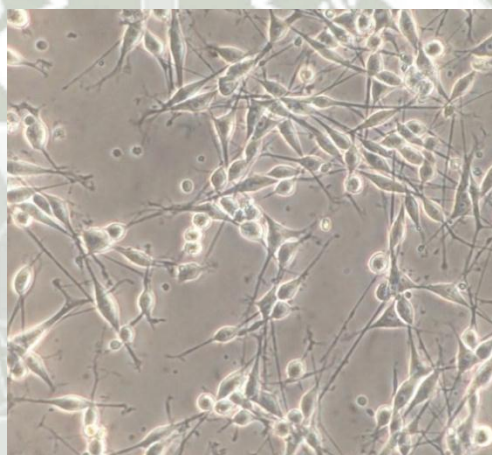
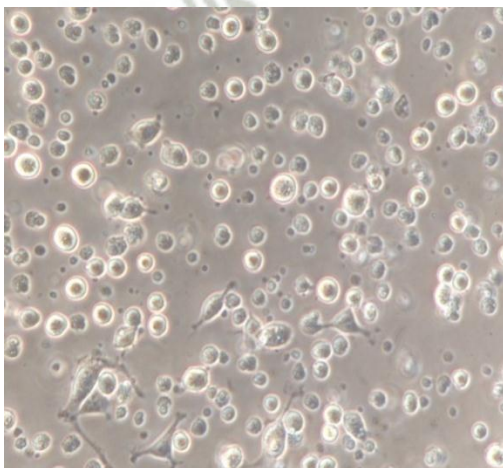


Figura 25: Efecto del peróxido de hidrógeno a 1000 μM sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y.



2.5.EFECTO DE LOS CURCUMINOIDES SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35

Se evaluó la posibilidad en que los curcuminoides podrían afectar la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35, para descartar esta opción se realizó los ensayos de viabilidad con curcuminoides cuyos resultados se muestran en la tabla 05 y en la figura 26, teniendo en cuenta que las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂

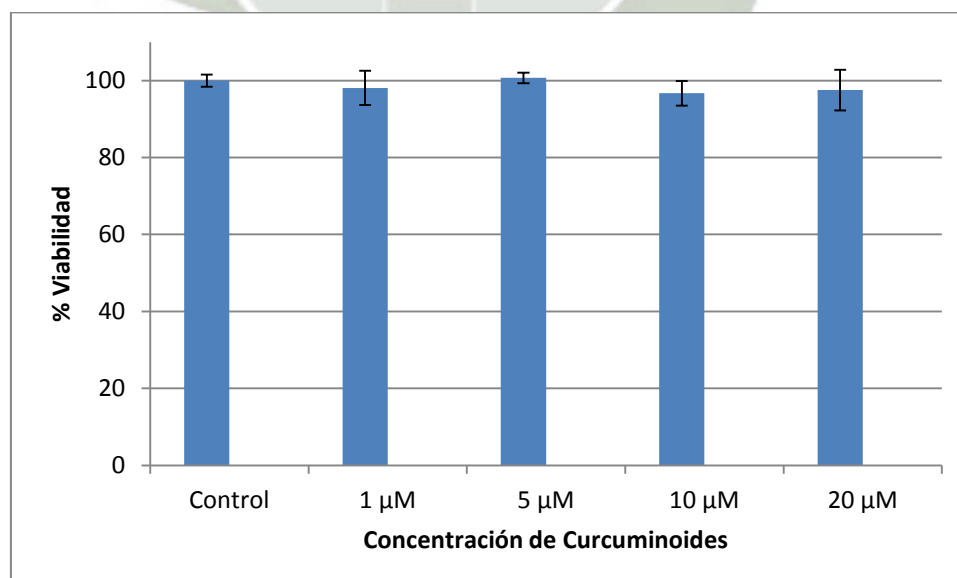
La gráfica muestra que los curcuminoides no afectan la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35 ya que según el análisis estadístico no hay diferencia significativa entre el grupo control y las diferentes concentraciones de curcuminoides.

Tabla 05: Porcentaje de viabilidad frente al tratamiento con curcuminoides

Control	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
100.00 %	98.10 %	100.71 %	96.69 %	97.53 %

Fuente: Elaboración propia.

Figura 26: Efecto de curcuminoides sobre células de neuroblastoma B-35.



Fuente: Elaboración propia.

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$.

2.6.EFECTO DE LOS CURCUMINOIDES SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

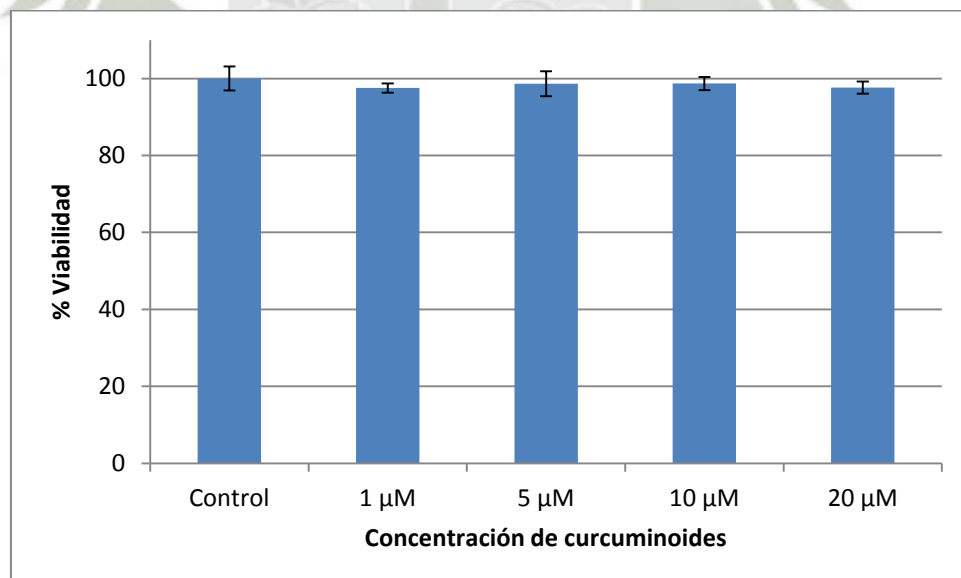
Al igual que las células de neuroblastoma B-35 se evaluó la posibilidad en que los curcuminoides podrían afectar la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y, para descartar esta opción se realizó los ensayos de viabilidad con curcuminoides, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 06 y en la figura 27, teniendo en cuenta que las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂.

Tabla 06: Porcentaje de viabilidad frente al tratamiento con curcuminoides

Control	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM
100.00 %	97.53 %	98.65 %	98.70 %	97.63 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 27: Efecto de curcuminoides sobre células de neuroblastoma SH-SY5Y.



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$.

La gráfica muestra que los curcuminoides no afectan la viabilidad de células de neuroblastoma SH-SY5Y ya que según el análisis estadístico no se evidencia diferencia significativa entre el grupo control y las diferentes concentraciones de curcuminoides.

2.7.EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 PRETRATADAS CON CURCUMINOIDES SEGUIDO POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Células de neuroblastoma pretratadas con curcuminoides 5 μ M

Se evaluó el efecto neuroprotector de los curcuminoides sometiendo a las células a concentraciones de peróxido de hidrógeno 100, 300, 500 y 1000 μ M; el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35 se muestra en la tabla 07, luego estos resultados se comparan cuando las células son pretratadas con curcuminoides a 5 μ M seguido por peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones que se muestra en la tabla 08, la comparación de ambos resultados se muestran en la figura 28.

Según la gráfica se observa como el peróxido de hidrógeno afecta la viabilidad de las células de neuroblastoma B-35 obteniendo valores de viabilidad de las células hasta en un 50 %, pero con el tratamiento de curcuminoides a concentración de 5 μ M la viabilidad de las células mejoró notablemente teniendo un porcentaje de viabilidad no menor al 90 %, según el análisis estadístico hay diferencia significativa cuando las células son pretratadas con curcuminoides a 5 μ M y concentraciones de 300, 500 y 1000 μ M de peróxido de hidrógeno.

Tabla 07: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	91.37 %	71.45 %	59.09 %	48.39 %

Fuente: *Elaboración propia.*

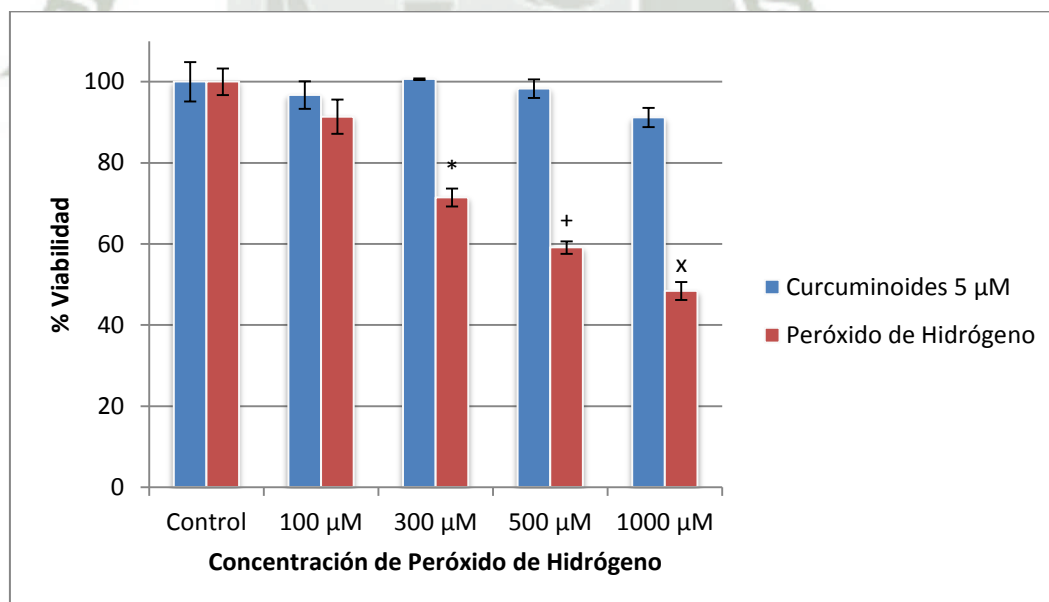
Tabla 08: Porcentaje de viabilidad de las células B-35 pretratadas con curcuminoides 5 μM luego peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

Curcuminoides 5 μM

Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	96.71 %	100.62 %	98.29 %	91.16 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 28: Células de neuroblastoma B-35 pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno 5 μM .



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett.

* Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 5 μM y peróxido de hidrógeno 300 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 300 μM .

+ Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 5 μM y peróxido de hidrógeno 500 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 500 μM .

x Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 5 μM y peróxido de hidrógeno 1000 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 1000 μM .

Células de neuroblastoma pretratadas con curcuminoides 10 μM

Se evaluó el efecto neuroprotector de los curcuminoides sometiendo previamente a las células concentraciones de peróxido de hidrógeno 100, 300, 500 y 1000 μM ; este efecto sobre el porcentaje de viabilidad de las células de neuroblastoma B-35 se muestra en la tabla 09, luego estos resultados se comparan cuando las células son tratadas primero con curcuminoides a 10 μM seguido por peróxido de hidrógeno a las concentraciones antes mencionadas cuyos resultados se muestran en la tabla 10, ambos resultados se comparan en la figura 29, en todos los casos los porcentajes de viabilidad son comparados con el grupo control que tiene el 100 % de viabilidad.

Según los resultados obtenidos se observa como las células pretratadas con curcuminoides de 10 μM mejoran la viabilidad al ser tratadas con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones, se puede observar que a concentraciones de 300 y 500 μM la viabilidad de las células no tenían diferencia significativa con el grupo control, pero a 1000 μM de peróxido de hidrógeno la viabilidad se encuentra afectada ya que a pesar del tratamiento con curcuminodes la viabilidad se ve afectada al tener viabilidad menor al 80 %.

Tabla 09: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	91.37 %	71.45 %	59.09 %	48.39 %

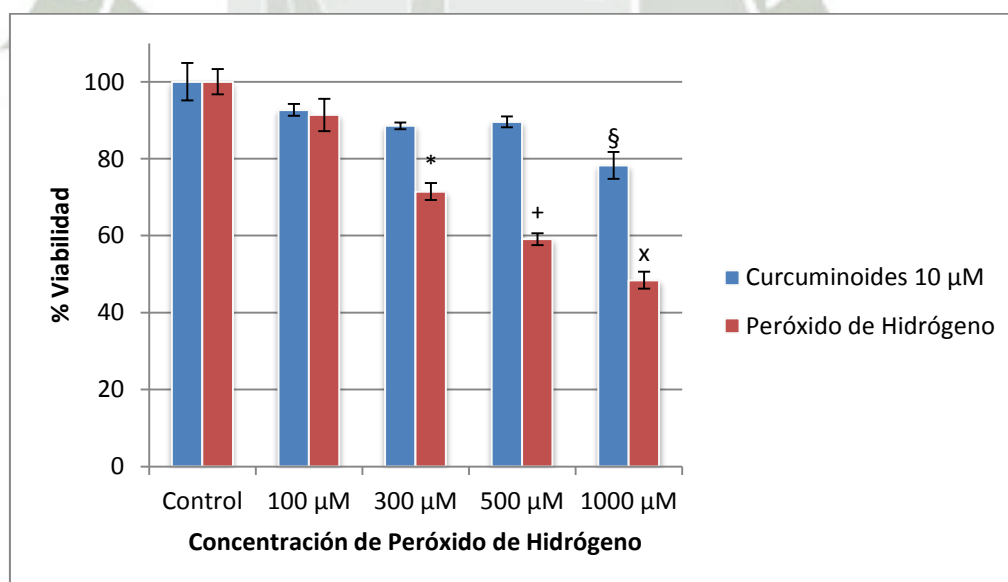
Fuente: *Elaboración propia.*

Tabla 10: Porcentaje de viabilidad de las células B-35 pretratadas con curcuminoides 10 μM luego peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

Curcuminoides 10 μM				
Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	96.71 %	100.62 %	98.29 %	91.16 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 29: Células de neuroblastoma B-35 pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno 10 μM .



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett.

§ Representa diferencia entre el grupo control de curcumina.

* Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 10 μM y peróxido de hidrógeno 300 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 300 μM .

+ Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 10 μM y peróxido de hidrógeno 500 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 500 μM .

x Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 10 μM y peróxido de hidrógeno 1000 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 1000 μM .

Células de neuroblastoma pretratadas con curcuminoides 20 μM

Se evaluó el efecto neuroprotector de los curcuminoides sometiendo previamente a las células concentraciones de peróxido de hidrógeno 100, 300, 500 y 1000 μM ; este efecto sobre el porcentaje de viabilidad de las células de neuroblastoma B-35 se muestra en la tabla 11, luego estos resultados se comparan cuando las células son tratadas primero con curcuminoides a 20 μM seguido por peróxido de hidrógeno a las concentraciones antes mencionadas cuyos resultados se muestran en la tabla 12, ambos resultados se comparan en la figura 30, en todos los casos los porcentajes de viabilidad son comparados con el grupo control que tiene el 100 % de viabilidad.

Estos resultados muestran que la viabilidad mejora al pretratar las células con curcuminoides 20 μM , según el análisis estadístico hay diferencia significativa al ser tratadas con concentraciones de 300, 500 y 1000 μM al obtener viabilidad mayor al 80 %.

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que los curcuminoides mejoran la viabilidad de las células de neuroblastoma al encontrarse en el medio peróxido de hidrógeno, obteniendo mejores resultados a concentraciones de 5 μM de curcuminoides confirmando los datos bibliográficos (estudios realizados en ratas y células de rata) que indican que la concentración de 5 μM es la de

mayor actividad farmacológica, también se puede afirmar que el efecto neuroprotector no es dependiente de la concentración de los curcuminoides.

Tabla 11: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	91.37 %	71.45 %	59.09 %	48.39 %

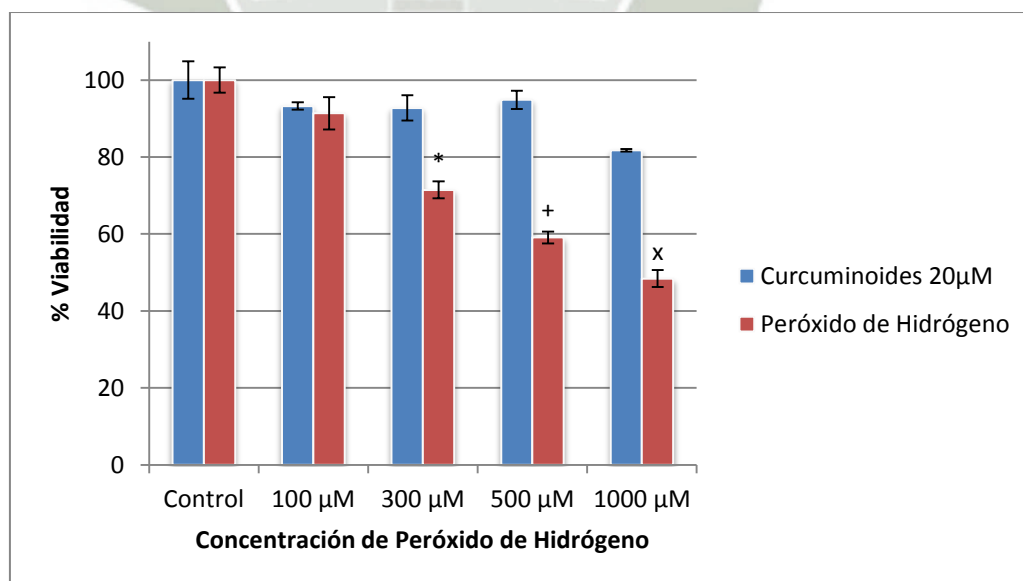
Fuente: *Elaboración propia.*

Tabla 12: Porcentaje de viabilidad de las células B-35 pretratadas con curcuminoides 20 μM luego peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

Curcuminoides 20 μM				
Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	96.71 %	100.62 %	98.29 %	91.16 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 30: Células de neuroblastoma B-35 pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno 20 μM .



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett.

* Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides $20 \mu\text{M}$ y peróxido de hidrógeno $300 \mu\text{M}$ versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno $300 \mu\text{M}$.

+ Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides $20 \mu\text{M}$ y peróxido de hidrógeno $500 \mu\text{M}$ versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno $500 \mu\text{M}$.

x Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides $20 \mu\text{M}$ y peróxido de hidrógeno $1000 \mu\text{M}$ versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno $1000 \mu\text{M}$.

2.8.EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRETRATADAS CON CURCUMINOIDES SEGUIDO POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Células de neuroblastoma pretratadas con curcuminoides $5 \mu\text{M}$

Se evaluó el efecto neuroprotector de los curcuminoides sometiendo a las células a concentraciones de peróxido de hidrógeno 100 , 300 , 500 y $1000 \mu\text{M}$; el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y se muestra en la tabla 13, luego estos resultados se comparan cuando las células son pretratadas con curcuminoides a $5 \mu\text{M}$ seguido por peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones que se muestra en la tabla 14, la comparación de ambos resultados se muestran en la figura 31.

Según los resultados obtenidos, las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno afectan la viabilidad de las células obteniendo daño significativo a concentraciones de 500 y $1000 \mu\text{M}$ de peróxido de hidrógeno, siendo el grupo de $100 \mu\text{M}$ de peróxido de hidrógeno la que no se presenta una diferencia significativa en la viabilidad de las células.

El grupo de 300 μM de peróxido de hidrógeno se observa una ligera mejoría en la viabilidad de las células pero a su vez la viabilidad fue afectada por el peróxido de hidrógeno si se compara con el grupo control pero esta no es suficiente para un daño significativo, el grupo de 500 μM de peróxido de hidrógeno la viabilidad mejora ya que existe una diferencia significativa en el grupo tratado solo con peróxido de hidrógeno se puede afirmar que la viabilidad mejoró pero también se encuentra afectada ya que hay diferencia significativa si se compara con el grupo control de curcuminoides, finalmente el grupo de 1000 μM de peróxido de hidrógeno la viabilidad mejora al ser tratada con curcuminoides pero si se compara el grupo de curcuminoides con el grupo control la viabilidad se encuentra afectada.

Estos resultados muestran que la viabilidad de las células mejora al ser tratada previamente con curcuminoides pero a su vez la viabilidad se ve afectada por el peróxido de hidrógeno obteniéndose un daño significativo a concentraciones de 300, 500 y 1000 μM de peróxido de hidrógeno.

Tabla 13: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	83.97 %	74.95 %	57.41 %	52.30 %

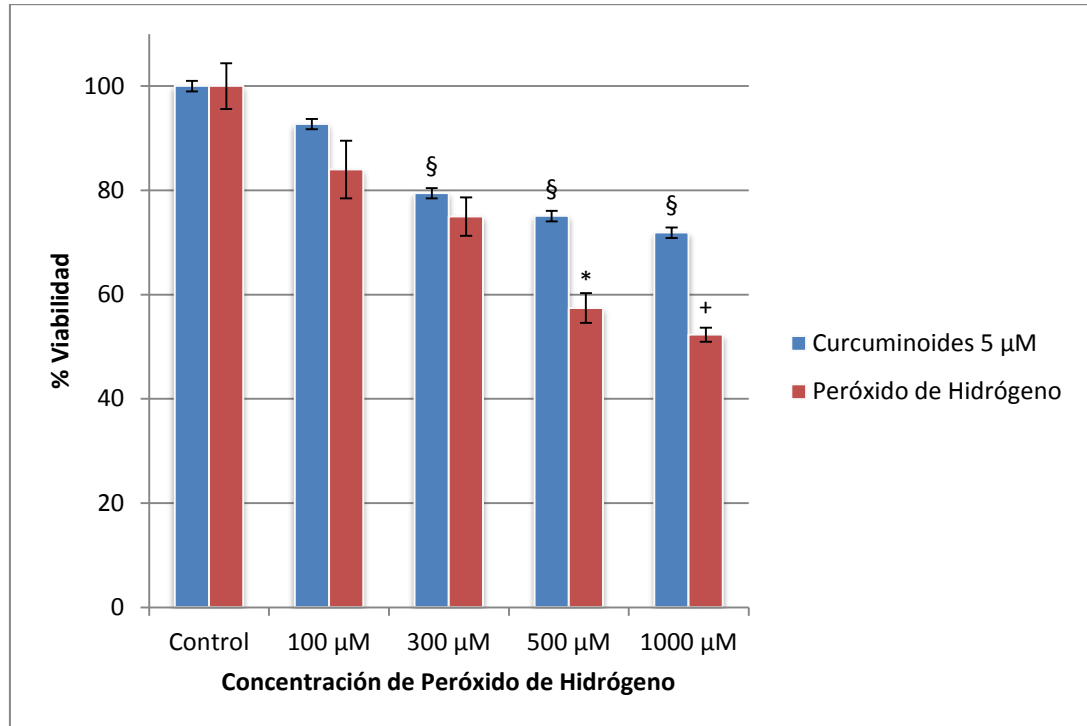
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14: Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides 5 μM luego peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

Curcuminoides 5 μM				
Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	92.71 %	79.46 %	75.07 %	71.86 %

Fuente: Elaboración propia.

Figura 31: Células de neuroblastoma SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno 5 μM .



Fuente: Elaboración propia.

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett.

§ Representa diferencia entre el grupo control de curcuminoides.

* Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 5 μM y peróxido de hidrógeno 500 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 500 μM .

+ Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 5 μM y peróxido de hidrógeno 1000 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 1000 μM .

Células de neuroblastoma pretratadas con curcuminoides 10 μM

Se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y se muestra en la tabla 15, luego estos resultados se comparan cuando las células son pretratadas con curcuminoides a 5 μM seguido por peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones que se muestra en la tabla 16, la comparación de ambos resultados se muestran en la figura 32.

Estos resultados muestran que la viabilidad se ve afectada por el peróxido de hidrógeno tomando el grupo de 100 μM de peróxido de hidrógeno la viabilidad se ve afectada pero el daño no es significativo según el análisis estadístico, en el grupo de 300 μM se ve que la viabilidad no mejora al ser tratada con curcuminoides teniendo en cuenta que hay daño significativo incluso con el tratamiento con curcuminoides, los datos en los grupos de 500 y 1000 μM son relativamente similares lo que indica que e incluso con el tratamiento con curcuminodes la viabilidad de las células se ve afectada.

Tabla 15: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	83.97 %	74.95 %	57.41 %	52.30 %

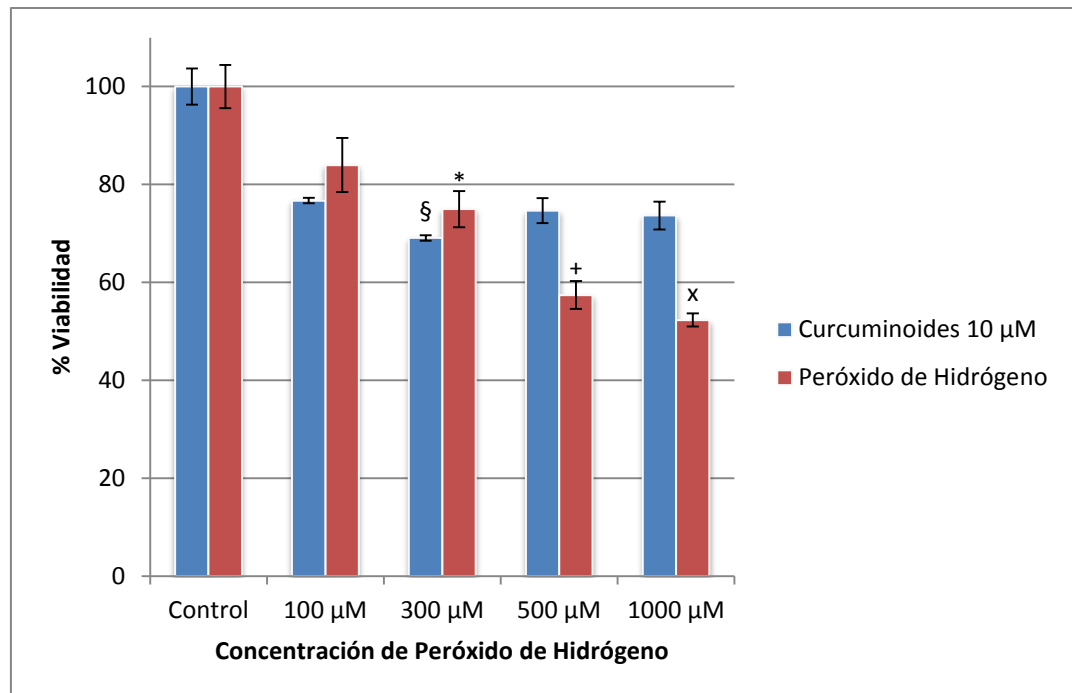
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 16: Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides 10 μM luego peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

Curcuminoides 10 μM				
Control	100 μM	300 μM	500 μM	1000 μM
100.00 %	92.71 %	79.46 %	75.07 %	71.86 %

Fuente: Elaboración propia.

Figura 32: Células de neuroblastoma SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno 10 μM .



Fuente: Elaboración propia.

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett.

§ Representa diferencia entre el grupo control de curcumina.

* Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 10 μM y peróxido de hidrógeno 300 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 300 μM .

+ Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 10 μM y peróxido de hidrógeno 500 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 500 μM .

x Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 10 μM y peróxido de hidrógeno 1000 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 1000 μM .

Células de neuroblastoma pretratadas con curcuminoides 20 μ M

Se evaluó el efecto neuroprotector de los curcuminoides sometiendo a las células a concentraciones de peróxido de hidrógeno 100, 300, 500 y 1000 μ M; el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y como se muestra en la tabla 17, luego estos resultados se comparan cuando las células son tratadas previamente con curcuminoides a 5 μ M seguido por peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones que se muestra en la tabla 18, la comparación de ambos resultados se muestran en la figura 33.

Estos resultados muestran que el peróxido de hidrógeno afecta la viabilidad de las células pero al tratamiento con curcuminoides de 20 μ M la viabilidad se encuentra casi constante en los diferentes grupos de concentración de peróxido de hidrógeno habiendo diferencia significativa en los grupos de 500 y 1000 μ M.

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que los grupos tratados con curcuminoides presentaron mejoría pero a su vez este incremento en la viabilidad se encuentra afectado ya que en la mayoría de los casos la viabilidad no mejora a más del 80 % siendo la de mayor actividad neuroprotectora la concentración de 5 μ M de curcuminoides.

Si se compara el efecto que produjo el peróxido de hidrógeno en las células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y se puede afirmar que las células SH-SY5Y son más susceptibles al efecto que produce el peróxido de hidrógeno.

Tabla 17: Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Control	100 μ M	300 μ M	500 μ M	1000 μ M
100.00 %	83.97 %	74.95 %	57.41 %	52.30 %

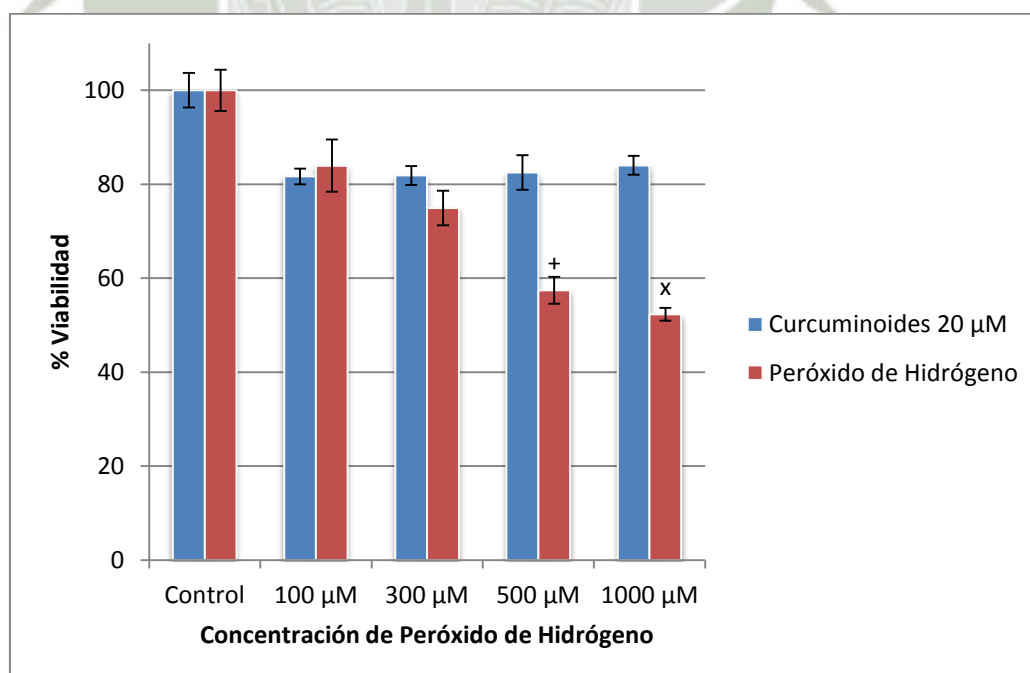
Fuente: *Elaboración propia.*

Tabla 18: Porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides 20 μ M luego peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

Curcuminoides 20 μ M				
Control	100 μ M	300 μ M	500 μ M	1000 μ M
100.00 %	92.71 %	79.46 %	75.07 %	71.86 %

Fuente: *Elaboración propia.*

Figura 33: Células de neuroblastoma SH-SY5Y pretratadas con curcuminoides seguido por peróxido de hidrógeno 20 μ M.



Fuente: *Elaboración propia.*

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett.

+ Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 20 μM y peróxido de hidrógeno 500 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 500 μM .

x Representa diferencia entre el grupo de curcuminoides 20 μM y peróxido de hidrógeno 1000 μM versus el grupo tratado con peróxido de hidrógeno 1000 μM .

3. INHIBICIÓN DE CASPASAS

Se evaluó la capacidad de los curcuminoides de inhibir a las caspasas 3 y 9 para ello se usó kits de detección específica de caspasas 3 y 9.

Inhibición de caspasa 3

La capacidad de los curcuminoides de inhibir la caspasa 3 se evaluó tomando en cuenta tres grupos, el control positivo el cual contiene el inhibidor de la caspasa (Z-VAD-FMK), el 100% de actividad que no contiene inhibidor mostrando la actividad de la caspasa libre y el último siendo esta para los curcuminoides que reemplazarian en el ensayo al inhibidor. Los resultados muestran el porcentaje de actividad (tabla 19) el que muestra la actividad de la caspasa 3 libre frente a los demás grupos.

El porcentaje de inhibición de caspasa 3 se muestra en la tabla 20, muestra el grupo control que contenía el inhibidor y se compara con las diferentes concentraciones de curcuminoides, de estos resultados se muestran en la figura 34.

Los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición de las caspasa 3 muestra que cuando los curcuminoides se añadieron a la caspasa 3 activa y sus sustratos, los valores de fluorescencia disminuyeron comparando con el control indicando la inhibición en la actividad de la caspasa 3.

La disminución de la fluorescencia fue inversamente relacionada con las concentraciones de curcuminoides a medida que aumentó la concentración de curcuminoides la fluorescencia disminuía, en la concentración de 20 μ M de curcuminoides mostró la mayor inhibición de caspasa 3 comparada con las otras concentraciones de curcuminoides.

Porcentaje de actividad

Tabla 19: Porcentaje de actividad de las caspasa 3

Control positivo	100 % de Actividad	Curcuminoides 5 μ M	Curcuminoides 10 μ M	Curcuminoides 20 μ M
56.10	96.62	96.62	89.87	92.12
66.60	101.88	94.37	93.62	86.87
65.85	102.63	98.12	92.12	86.87
59.10	98.87	95.12	92.87	85.37

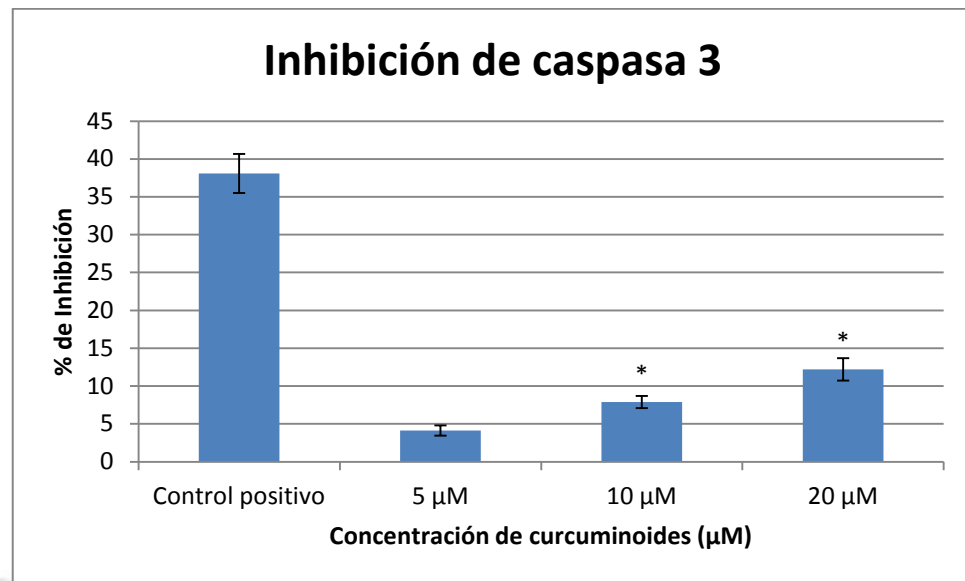
Fuente: Elaboración propia.

Porcentaje de inhibición

Tabla 20: Porcentaje de inhibición de las caspasa 3

Control positivo	Curcuminoides 5 μ M	Curcuminoides 10 μ M	Curcuminoides 20 μ M
43.90	3.38	10.13	7.88
33.40	5.63	6.38	13.13
34.15	2.63	7.88	13.13
40.90	4.88	7.13	14.63

Fuente: Elaboración propia.

Figura 34: Test de inhibición de caspasa 3 tratado con curcuminoides.

Fuente: Elaboración propia.

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett para todos los grupos versus el grupo control. (* Representa diferencia entre el grupo control y concentraciones de curcuminoides)

Inhibición de caspasa 9

La capacidad de los curcuminoides de inhibir la caspasa 9 se evaluó tomando en cuenta tres grupos, el control positivo el cual contiene el inhibidor de la caspasa (Z-VAD-FMK), el 100% de actividad que no contiene inhibidor mostrando la actividad de la caspasa libre y el último siendo esta para los curcuminoides que reemplazarían en el ensayo al inhibidor. Los resultados muestran el porcentaje de actividad (tabla 21) el que muestra la actividad de la caspasa 9 libre frente a los demás grupos.

El porcentaje de inhibición de caspasa 9 se muestra en la tabla 22, muestra el grupo control que contenía el inhibidor y se compara con las diferentes concentraciones de curcuminoides, de estos resultados se muestran en la figura 35.

Según los resultados obtenidos cuando los curcuminoides se añadieron a la caspasa 9 y su sustrato los valores de fluorescencia disminuyeron si se compara con el grupo control.

En el caso de la caspasa 9 la inhibición no fue dependiente de la concentración

Porcentaje de actividad

Tabla 21: Porcentaje de actividad de las caspasa 9

Control Positivo	100 % de Actividad	Curcuminoides 5 μM	Curcuminoides 10 μM	Curcuminoides 20 μM
127.37	97.89	81.05	85.26	93.68
131.58	102.11	89.47	93.68	97.89
140.00	102.11	106.32	93.68	85.26
135.79	97.89	102.11	102.11	89.47

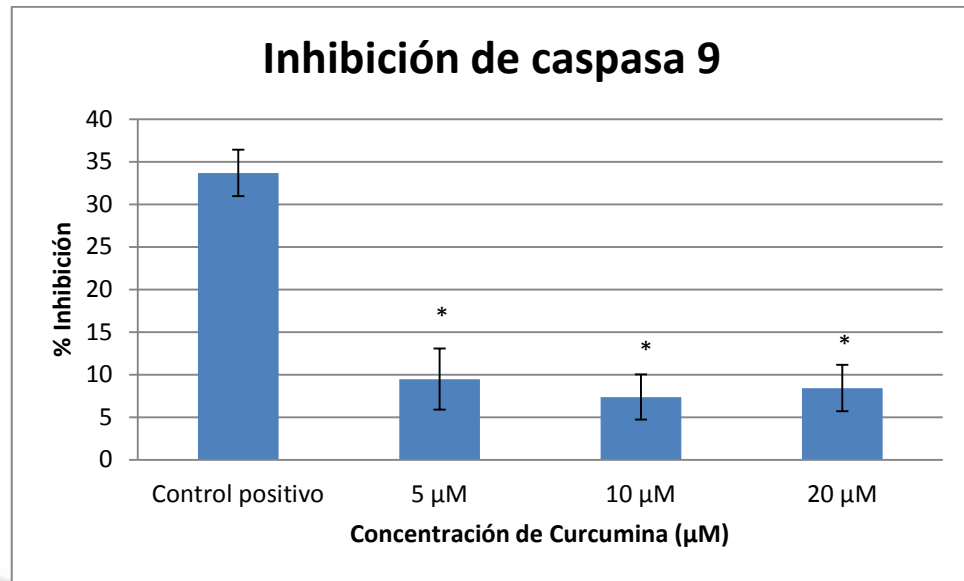
Fuente: Elaboración propia.

Porcentaje de inhibición

Tabla 22: Porcentaje de actividad de las caspasa 9

Control Positivo	Curcuminoides 5 μM	Curcuminoides 10 μM	Curcuminoides 20 μM
27.37	18.95	14.74	6.32
31.58	10.53	6.32	2.11
40.00	6.32	6.32	14.74
35.79	2.11	2.11	10.53

Fuente: Elaboración propia.

Figura 35: Test de inhibición de caspasa 9 tratado con curcuminoides.

Fuente: Elaboración propia.

Los datos fueron comparados mediante prueba de ANOVA de una vía, $p < 0.05$, seguido por el test de Dunnett para todos los grupos versus el grupo control. (* Representa diferencia entre el grupo control y concentraciones de curcuminoides)

Los resultados mostrados en las gráficas muestran que los curcuminoides inhiben parcialmente a las caspasas 3 y 9, estos valores se compararon con el grupo control el cual consta del inhibidor específico de caspasas, que mostro un porcentaje de inhibición mayor al 30% porque inhibe a la enzima irreversiblemente.

Estos resultados introducen a una nueva vía de tratamiento para las enfermedades neurodegenerativas utilizando los recursos naturales como la curcumina que según los estudios *in vitro* muestran efecto neuroprotector y su probable mecanismo de neuroproteccion sea el de la inhibición de caspasas 3 y 9.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos y analizados estadísticamente se puede concluir:

1. Se logró cultivar células de neuroblastoma B-35 (rata) y SH-SY5Y (humano) llegando a obtener 15 generaciones de las células de neuroblastoma B-35 y 7 generaciones en el caso de las células de neuroblastoma SH-SY5Y a condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂.
2. El peróxido de hidrógeno afecta la viabilidad tanto de las células de neuroblastoma B-35 (rata) y SH-SY5Y (humano), el daño es significativo a partir de 300 µM de peróxido de hidrógeno.
3. Al someter solamente las células de neuroblastoma con curcuminoides no se evidencia daño significativo, también se comprobó si los curcuminoides por si solos emiten fluorescencia y absorbancia, pero los resultados demuestran que la emisión no es suficiente como para alterar los resultados obtenidos.
4. Los curcuminoides inhiben parcialmente a las caspasas 3 y 9, esta inhibición no es dependiente de la concentración obteniendo mejores resultados a 5µM de curcuminoides comparándolo de acuerdo al inhibidor estándar.
5. Los resultados demuestran que los curcuminoides a concentraciones de 5 µM, 10 µM y 20 µM mejoran la viabilidad de las células tanto B-35 y SH-SY5Y al ser tratadas con peróxido de hidrógeno un agente inductor de daño celular lo que demostraría el probable efecto neuroprotector ya que el cultivo celular es un estudio inicial que luego debe ampliarse en organismos complejos.

SUGERENCIAS

- Dentro de este trabajo de tesis se desea incentivar la investigación sobre la curcumina para la mejora continua en los aspectos de investigación y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, ya que ha mostrado ser un producto natural con una amplia gama efectos terapéuticos como lo demuestran en los diversos trabajos de investigación.
- Otra sugerencia es ampliar estos estudios a organismos *in vivo* ya que se podría incluir modelos de investigación y se pueda adaptarse a las necesidades en el tratamiento de diversas enfermedades. También es recomendable realizar pruebas específicas en los organismos para la detección de caspasas teniendo como ejemplo la prueba por Western Blot.
- La curcumina es actualmente usada en diversas áreas tanto en investigación, cosmética, gastronomía, etc. Esta última no es muy conocida ya que diversos productos de uso en la alimentación contienen curcumina como colorante natural o alimento, es recomendable colocar programas para incentivar el uso y mostrar las cualidades de este producto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aavindan N, Veeraraghavan J, Madhusoodhanan R, Herman T, Natarajan M. Curcumin regulates low-LET γ -radiation induced NF κ B dependent telomerase activity in human neuroblastoma cells, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011; 79(4): 1206-1215.
2. Adolfo G, Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis, *Rev. Arg. Anest*, 2002; 60(6): 391-401.
3. Agholme L, Lindström T, Kagedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons, *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010; 4(20): 1069-1082.
4. Anto R, George J, Babu K, Rayasekhara K, Kuttan R. Antimutagenic and carcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutat Res*, 1996; 370(2): 127-131.
5. Benavides A, Hernández R, Ramírez H, Sandoval A. Tratado de botánica moderna, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro 2010; 332(4) : 217.
6. Buhmann C, Mobasher A, Busch F, Aldinger C, Stahlmann R, Montaseri A, Shakibaei M. Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *J. Biol. Chem*, 2011; 286: 28556–28566.
7. Cascales M. Bases moleculares de la apoptosis, *Anal. Real Acad Nal Farm*, 2003; 69: 36-64.
8. Castleman M. *The New Healing Herbs*. United States of America: Ed. Rodale; 2001.
9. Constantinescu R, Constantinescu A, Reichmann H, Janetzky B, Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y, Springer-Verlag. 2007; 72: 17-28.
10. Ciccarone V, Spengler B, Meyers M. B., Biedler J, Ross R. Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages, *Cancer Research* 1989; 49: 219-225.

11. Dinesha R, Srinivas L. Antioxidant effects of 28kda antioxidant protein from turmeric (*curcuma longa* l.). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2011; 4(3): 119-123.
12. Feldman T, Kabalesswaran V, Jang S.B, Antczak C, Djaballah H, Wu H, Jiang X. A class of allosteric, caspase inhibitors identified by high-throughput screening, *Mol Cell*. 2012; 47(4): 585-595.
13. Florentin A, Arama E. Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell, *J Cell Biol*. 2012; 196(4): 513-527.
14. Fulda S, Debatin K-M, Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798-4811.
15. Goel A, Kunnumakkara A, Aggarwal B. Curcumin as 'Curecumin' From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75(4): 787-809.
16. Hardman J, Limbird L. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México D.F: Ed. McGraw-Hill; 2006
17. Holder G, Plummer J, Ryan A, The metabolism and excretion of curcumin (1,7-Bis-(-4-hydroxy-3-methoxyphenyl-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica* 1978; 8: 806-814.
18. Hollenbeck P, Bamberg J. *Methods in Cell Biology*. United States of America: Ed. Elsevier; 2003
19. Invitrogen, GIBCO®, *Cell Culture Basics Handbook*.
20. Jang, H, Chang K, Huang Y, Hsu C, Lee S, Su M. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry* 2007; 103 (3): 749-756.
21. Jordán J, Apoptosis: Muerte celular programada. *OFFARM*, 2003; 22 (6): 100-106.
22. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in death grip, *Cell*. 2009; 138(5): 838-854.
23. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, *Biología celular y molecular*. Nueva York: Ed. Panamericana; 2005
24. Mesa M; Ramirez-Tortosa M, Aguilera C, Ramírez-Boscá A, Gil A. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de cúrcuma *longa* L. y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica* 2000; 41(3): 307-321.

25. Miura M. Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4.
26. Molina-Jijon E, Tapia E, Zazueta C, El Hafidi M, Zatarain-Barron Z, Hernandez-Pando R, Medina-Campos O, Zarco-Marquez G, Torres I, Pedraza-Chaverri J. Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway, *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 51: 1543–1557.
27. Montalbo A. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Interamericana de ciencias agrícolas de IICA – OEA Lima – Perú 1972; 257-258.
28. Montaña C; Montes, L. Evaluación sistémica de las potencialidades empresariales a partir de cúrcuma longa en el departamento de caldas. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias y administración. 2004.
29. Mullassery D, Horton C, Wood C, White M. Single live cell imaging for systems biology, *Essays Biochem.* 2008; 45: 121-133.
30. Murray M, Stout A. Distinctive Characteristics of THE Sympathicoblastoma Cultivated in vitro. Method for Prompt Diagnosis. *American Journal of Anatomy* 1947; 23: 429-441.
31. Murray R, Mayes P, Granner D, Rodwell V, Harper *Bioquímica Ilustrada*. México D.F: Ed. Manual Moderno; 2004
32. Oetari S, Sudibyo M. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacology* 1996; 51 (1): 39-45.
33. Olsson M, Zhivotovsky B. *Caspases and cáncer*, Macmillan Publishers Limited. 2011; 18: 1441-1449.
34. Pisano M, Pagnan G, Dettori M, Cossu S, Caffa I, Sassu I, Emionite L, Fabbri D, Cilli M, Pastorino F, Palmieri G, Delogu G, Ponzoni M, Rozzo C. Enhanced anti-tumor activity of a new curcumin-related compound against melanoma and neuroblastoma cells, *Molecular Cancer*. 2010; 9: 1-12.
35. Pochedly C, *Neuroblastoma Tumor Biology and Therapy*. United States of America: Ed. CRC Press; 1990.
36. Poreba M, Strózyk A, Salvensen G, Drag M. Caspases substrates and inhibitors, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 5(8): 1-33.
37. Rajiv T, Yadav P, *Cell Culture*. Delhi: Ed. Educa Books; 2008

38. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal B. Curcumin and cáncer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively, *The AAPS Journal*. 2009; 11(3): 495-510.
39. Ravindranath P, Nirmal K, Sivaraman K. *Turmeric The genus Curcuma*. First Edition. United States of America: CRC Press; 2007.
40. Ravindranath V, Chandrasekhara N. *In vitro studies on the intestinal absorption of curcumin in rats 1981*; 20(3): 251-257.
41. Reed J. Mechanisms of Apoptosis, Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. *American Journal of Pathology* 2000; 157 (5): 1415-1430.
42. Ross R, Spengler B., Domenech C., Porubcin M., Rettig W, Biedler J. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells, *Cell Growth & Differentiation* 1995; 6: 449-456.
43. Ross R, Spengler B, Rettig W, Biedler J. Differentiation-Inducing Agents Stably Convert Human Neuroblastoma I-Type Cells to Neuroblastic (N) or Nonneuronal (S) Neural Crest Cells, *Advances in Neuroblastoma Research* 1994; 4: 253-259.
44. Sadettin O, Wei-Shou H, *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. United States of America: Ed. CRC Press; 2006
45. Salvensen G, Riedl S. Caspase Mechanisms, Program of apoptosis and cell death, Burnham Institute for Medical Research. Springer, 2008; 615: 13-23.
46. Schnee L. *Plantas comunes de Venezuela*. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la biblioteca: Colección de ciencias biológicas. VIII 1984; 256-257.
47. Shastry P, Basu A, Rajadhyaksha M. Neuroblastoma Cell Lines a Versatile *in vitro* Model in Neurology. *International Journal of Neuroscience* 2001; 108 (1-2): 109-126.
48. Shukla P, Khanna V, Ali M, Khan M, Srimal R, Anti-ischemic effect of curcumin in rat brain, *Neurochem. Res.* 2008; 33: 1036–1043.
49. Sousa S, Vetter I, Ragnarsson L, Lewis R. Expression and pharmacology of endogenous Ca channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Plos one*. 2013; 3: 1-11.
50. Stargrove M, Treasure J, Mckee D. *Herb, Nutrient, and Drug Interactions, Clinical Implications and Therapeutic Strategies*. United States of America: Ed. MOSBY Elsevier; 2008.

51. Subash G, Sridevi P, Wonil k, Bharat A. Discovery of curcumin, a component of the Golden spice, and its miraculous biological activities, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39(3): 283-299.
52. Thiele C. *Neuroblastoma Cell Lines.* Kluwer Academic Publishers 1998; 1: 21-53.
53. Thiele C, McKeon C, Triche T, Ross R, Reynolds C, Israel M. Differential proto-oncogene expression characterizes histopathologically indistinguishable tumors of the peripheral nervous system. *The American Society for Clinical Investigation* 1987; 80: 804-811.
54. Toninelli-Ferrari G, Bonini S, Uberti D, Buizza L, Bettinsoli P, Poliani P, Facchetti F, Memo M. Targeting Notch pathway induces growth inhibition and differentiation of neuroblastoma cells, *Advance Access Publication.* 2010; 12(12): 1231-1243.
55. Tonnesen y Karlsen, *Studies on curcumin and curcuminoids* Hanne Hjorth Tonnesen, Jan Karlsen 1985; 180(5): 402-404.
56. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis. A thin layer Chromotography Atlas.* Germany: Springer; 1996.
57. Walton H, Reyes J. *Análisis Químico e Instrumental Moderno.* Barcelona: Ed. Reverté; 1983
58. Watson J, Baker T, Stephen B, Gann A, Levine M, Losick R. *Biología Molecular del Gen.* Madrid: Ed. Panamericana; 2006
59. Wang H, Zhao Y, Zhang S, Liu G, Kang W, Tang H, Ding J, Chen S. PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes, *J. Alzheimers Dis.* 2010; 20: 1189–1199.
60. Yallapu M, Meena J, Chauhan S. Curcumin Nanomedicine: A road to cáncer therapeutics. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(11): 1994-2010.
61. Zhou H, Beever C, Huang S. Targets of curcumin, *Curr Drug Targets.* 2011, 12(3): 332-347.