

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Máster en Investigación en Neurociencias

2018/2019

**Cambios redox en modelos neuronales de privación de glucosa
y en pacientes con ictus isquémico.**

Papel neuroprotector de la melatonina.

Claudia Isabel Jove Cifras

Oviedo, julio 2019

Resumen

Un exceso en la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se ha visto implicado en la patogenia del ictus isquémico. En este estudio se examina la respuesta a la privación de nutrientes en un modelo celular *in vitro* que nos permite recrear una situación de isquemia, así como el papel del neuroindol pineal melatonina en la reversibilidad del efecto desencadenado. Para ello, se empleó la línea neuronal de ratón HT22 cultivada en ausencia de glucosa. Tras la privación de glucosa y el tratamiento con melatonina, se evaluaron los niveles de estrés oxidativo, así como el daño producido en términos de lipoperoxidación y muerte celular, y la producción de enzimas antioxidantes. Los resultados obtenidos demuestran que el tiempo es un factor clave en la recuperación de las neuronas potencialmente salvables, y que la aplicación de melatonina facilita esta recuperación, protegiendo a las células y reduciendo la muerte celular. Asimismo, a modo de comparación con el modelo, se cuantificó el estrés oxidativo en muestras de sangre de pacientes de ictus isquémico. Gracias a ello se confirmó la relevancia del estrés oxidativo en la patología y con ello, su interés como diana terapéutica.

Palabras clave: estrés oxidativo, ictus isquémico, privación de glucosa, melatonina.

Abstract

An excessive production of reactive oxygen and nitrogen species has been implicated in the pathogenesis of ischemic stroke. In this study, we examined the response to nutrient deprivation in an *in vitro* cell model that mimics an ischemic situation, as well as the role of the pineal neuroindol melatonin in the prevention of this effect. For this purpose, HT22 cell line was cultured in the absence of glucose. After glucose deprivation and melatonin treatment, oxidative stress levels were evaluated, as well as lipoperoxidation, cell death, and antioxidant enzymes production. Our results show that time is a key factor for the recovery of neurons, and that melatonin facilitates this recovery by protecting cells and reducing cell death. Likewise, to confirm this in an *in vivo* model, oxidative stress was quantified in blood samples of ischemic stroke patients. Our results confirmed the relevance of oxidative stress in the pathology of stroke and its potential interest as a therapeutic target.

Key words: oxidative stress, ischemic stroke, glucose deprivation, melatonin

Índice

1	Introducción	1
1.1	Privación de glucosa como modelo de estudio de ictus isquémico	2
1.2	Estrategias antioxidantes. Papel de la melatonina	2
2	Objetivos	3
3	Material y métodos	3
3.1	Metodología	3
3.1.1	Cultivo celular	3
3.1.2	Estudio de morfología celular	4
3.1.3	Estimación de la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán.....	4
3.1.4	Análisis <i>Western blot</i>	4
3.1.5	Citometría de flujo	5
3.1.6	Evaluación de lipoperoxidación	5
3.1.7	Determinación de la capacidad antioxidante total.....	6
3.1.8	Determinación de concentración de peróxido de hidrógeno	6
3.1.9	Análisis estadístico.....	6
3.2	Diseño experimental	7
4	Resultados	8
4.1	Estudio tiempo respuesta del efecto de la privación de glucosa en las células HT22.....	8
4.1.1	Viabilidad celular	8
4.1.2	Producción de enzimas antioxidantes	9
4.1.3	Concentración de H ₂ O ₂	10
4.1.4	Medida de lipoperóxidos.....	11

4.2	Efecto protector de la melatonina en la citotoxicidad causada por la privación de glucosa	11
4.2.1	Estudio morfológico	11
4.2.2	Viabilidad celular	13
4.2.3	Ciclo celular	14
4.2.4	Producción de enzimas antioxidantes	14
4.2.5	Concentración de H ₂ O ₂	15
4.2.6	Medida de lipoperóxidos	16
4.3	Estudio de los niveles de estrés oxidativo en sangre de pacientes de ictus isquémico	16
4.3.1	Medida de lipoperóxidos	17
4.3.2	Capacidad antioxidante total	18
5	Discusión	19
6	Conclusiones	22
7	Bibliografía	23

1 Introducción

El ictus isquémico constituye un problema cada vez más frecuente en la actualidad. Supone un agotamiento energético, consecuencia directa del bloqueo del aporte sanguíneo en el cerebro¹. La ausencia de oxígeno y nutrientes interfiere sobre la actividad celular normal a través de una progresiva cascada de eventos que conduce a una alteración del balance redox que deriva hacia una situación de estrés oxidativo^{2,3}.

Esta cascada de eventos incluye una excitotoxicidad inicial⁴ que favorece la entrada de calcio y su acumulación intracelular. Las altas concentraciones de calcio estimulan la actividad de enzimas prooxidantes y, por ende, la producción de especies reactivas, tanto derivadas de oxígeno (EROs), como de nitrógeno (ERNs)⁵. La sobreproducción de oxidantes en ictus isquémico incluye un incremento en la producción de: anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁵ y especies derivadas de óxido nítrico ($NO\bullet$)⁶. Dada la elevada reactividad de estas especies, al verse sus niveles aumentados resultan tóxicas y promueven el daño oxidativo sobre las principales macromoléculas celulares⁷ y la permeabilización de la barrera hematoencefálica^{5,7}.

El balance redox está determinado por la tasa de producción de especies reactivas y su depuración por mecanismos antioxidantes⁸. Entre ellos, los enzimas con acción antioxidante más importante como son las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, tienen un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis redox^{9,10}, y en situaciones graves de estrés en activar la respuesta apoptótica¹¹. Sin embargo, el sistema nervioso central (SNC) tiene unos niveles relativamente bajos de estos enzimas, lo que facilita en mayor medida el desplazamiento del equilibrio¹². Este hecho, junto con la continua exposición a oxígeno convierten al SNC en un entorno clave para favorecer el estrés oxidativo.

Además, el SNC presenta unos niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados, potenciales dianas de lipoperoxidación¹³, principal consecuencia del estrés oxidativo en el tejido nervioso. Los productos generados, denominados de forma genérica como lipoperóxidos, repercuten sobre la integridad de las membranas de las células, facilitando la lesión y muerte celular¹⁴.

Dadas estas características el estudio del estrés oxidativo resulta especialmente relevante para la comprensión de la patogenia del ictus isquémico¹⁵, así como, para la valoración de tratamientos terapéuticos preventivos.

1.1 Privación de glucosa como modelo de estudio de ictus isquémico

La privación de glucosa en cultivos celulares constituye una buena estrategia para imitar un ambiente isquémico localizado¹⁶. La retirada de un nutriente esencial en el metabolismo de las neuronas tiene importantes consecuencias en su fisiología y supervivencia. Para mantener el elevado aporte energético que requiere el mantenimiento de su correcto funcionamiento, las neuronas necesitan elevadas cantidades de energía, que obtienen de la glucosa¹⁷, y dada su fácil aplicación, se ha propuesto como modelo de estudio *in vitro* del contexto de lesión isquémica cerebral.

1.2 Estrategias antioxidantes. Papel de la melatonina

Ante una situación grave de estrés, como ocurre en ictus isquémico, la supervivencia celular depende de la capacidad de la célula de resistir y/o adaptarse al estrés^{8,11}. Por esta razón, el desarrollo de estrategias que frenen la producción oxidante, tales como la administración de antioxidantes¹⁸, resulta especialmente relevante.

Desde hace más de 20 años, la melatonina, principal neuroindol producido por la glándula pineal, se ha presentado como un excelente agente neuroprotector dado su papel antioxidante de amplio espectro y su escasa o nula toxicidad¹⁹. La melatonina tiene la capacidad de neutralizar especies reactivas de forma directa, y también de actuar como antioxidante indirecto, estimulando la expresión génica, producción y actividad de enzimas antioxidantes, e inhibiendo algunas enzimas prooxidantes^{20,21}. Una ventaja adicional con respecto a otros antioxidantes es el hecho de que los metabolitos generados durante su cascada antioxidante también presentan esta propiedad, potenciando su función²². Dadas estas características, son varios los estudios que han contemplado la utilización de melatonina para prevenir la generación de estrés oxidativo y muerte celular en condiciones isquémicas²¹.

2 Objetivos

El objetivo principal del presente estudio es evaluar la respuesta de células tipo neuronal ante la privación de glucosa, imitando una situación de isquemia, así como, estudiar el efecto de la melatonina en la supervivencia celular.

Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos particulares:

-Analizar los efectos de la privación de glucosa en células de hipocampo de ratón (HT22) en términos de supervivencia neuronal.

-Evaluar el potencial de la melatonina, como tratamiento preventivo, sobre la muerte neuronal causada por la privación de glucosa.

-Analizar parámetros de estrés oxidativo en muestras de eritrocitos y plasma de pacientes que han sufrido un ictus isquémico.

3 Material y métodos

3.1 Metodología

3.1.1 Cultivo celular

Se han escogido las células hipocampales de ratón, HT22 consideradas un excelente modelo para estudiar la muerte celular *in vitro* causada por excitotoxicidad y estrés oxidativo¹⁵. Las células fueron amablemente cedidas por el Dr. David Shubert (Scripts Institute, CA, EE. UU.)²³. Las HT22 se mantuvieron en DMEM alto en glucosa suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de cóctel antibiótico-antimicótico como se detalla en el **Anexo I**, a 37°C en el incubador bajo una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

El medio de cultivo se cambió cada 2 días. Las células se pasaron cuando se alcanzó una confluencia superior al 80%. Los subcultivos se realizaron por suave tripsinización, basado en la utilización de una solución de tripsina al 0,05 % y EDTA 0,53 mM.

3.1.2 Estudio de morfología celular

Transcurrido el tiempo indicado en cada aproximación experimental, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 y se fijaron con paraformaldehído al 4% 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la permeabilización celular con una solución de tween-20 al 0,15% y seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5% durante 30 min. A continuación, las células se incubaron con una dilución de faloidina (1 mg/mL) 1:500 a 4 °C en condiciones de oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBS pH 7,4. Los núcleos se tiñeron con DAPI (10 mg/mL) durante 10 min de incubación en condiciones de oscuridad. Se realizó un último lavado, y las muestras se montaron en un medio hidrófilo Fluoromont, (Sigma-Aldrich, F4680) para la observación microscópica. Las muestras se fotografiaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i.

3.1.3 Estimación de la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán

Una vez finalizado el tiempo de incubación indicado en cada aproximación experimental, se recogieron tanto las células flotantes en el medio de cultivo, como las células adheridas a la placa. Estas se despegaron mediante suave tripsinización. Una vez recogidas, se centrifugaron 5 min a 500 \times g, y se resuspendieron en 1 mL de PBS pH 7,4. Esta suspensión se tiñó con azul de tripán al 0,4% en una relación 1:1 justo en el momento en que se procedió al recuento en el hemocitómetro.

3.1.4 Análisis *Western blot*

Para la extracción de proteínas y análisis de las principales enzimas antioxidantes, las células se cultivaron a una densidad de 10⁶ células en una placa de 100 mm. Las células se recogieron por tripsinización y se resuspendieron en 200 μ L de tampón de lisis RIPA. Las muestras se incubaron en hielo 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 4 °C a 10000 \times g durante 10 min, y el sobrenadante se recuperó a un tubo nuevo. Los sobrenadantes fueron congelados a -80 °C hasta su uso. El procesamiento por análisis “*western blot*” fue realizado siguiendo el protocolo detallado en el **Anexo I**. Los anticuerpos utilizados en este TFM y sus especificaciones principales se detallan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el TFM.

Ac 1° contra	Tamaño del Ag	Casa comercial	Dilución	Hospedador	Ac 2°	Dilución
SOD-1	16 kDa	Calbiochem (574597)	1:1000	Oveja	Calbiochem	1:8000
SOD-2	24 kDa	Milipore (#06-948)	1:5000	Conejo	Calbiochem	1:10000
Catalasa	60 kDa	Calbiochem (219010)	1:1000	Conejo		1:10000
β-actina	43 kDa	Santa Cruz (sc69879)	1:8000	Ratón	Santa Cruz	1:12000

La concentración total de proteína de cada muestra se determinó utilizando el ensayo colorimétrico de Bradford, que valora la cantidad de proteína de la muestra a través de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, leída en el espectrofotómetro Varian Cary 50-UV-Vis 50 Miroplate Reader Chemolabor (348988). Como control de carga se utilizó la proteína de expresión constitutiva β -actina. Para el análisis densitométrico de las bandas se utilizó el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov>).

3.1.5 Citometría de flujo

Para evaluar la muerte celular se utilizó el ensayo de detección de apoptosis de AnexinaV-FITC con yoduro de propidio (IP) (Immunostep, Salamanca, España). Para medir el ciclo celular, se tiñeron las células con una solución IP/ARNasa (Immunostep, Salamanca, España). En ambos casos, los protocolos se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (**Anexo I**).

3.1.6 Evaluación de lipoperoxidación

Para valorar los niveles de lipoperoxidación se empleó la sonda de difenil-1-pirenil-fosfina (DPPP). El DPPP reacciona específicamente con lipoperoxidos generando un producto fluorescente²⁴. La relación estequiométrica de la reacción permite el análisis cuantitativo con respecto a otros métodos.

Para el tratamiento, la sonda de DPPP se añadió a una concentración 50 μ M disuelta en DMSO 0,1 % en el mismo momento que los tratamientos experimentales. Se recogieron las células en suspensión del medio, y aquellas que permanecían adheridas por tripsinización. Se centrifugaron a 500xg durante 5 min. Se resuspendieron en 250 μ L de PBS pH 7,4 para medir la fluorescencia en el fluorímetro Synergy H4 hybrid reader (Bio-Tek, Vermont, EE. UU.) a una luz de excitación de 351 nm, y luz de emisión de 380 nm.

Para analizar las muestras de eritrocitos y suero de pacientes se siguió el protocolo descrito por Santas²⁵ (**Anexo I**). Para el calibrado se utilizaron concentraciones decrecientes de agua oxigenada 1 M (100, 80, 60, 40 y 20 μ M).

3.1.7 Determinación de la capacidad antioxidante total

Para la determinación de capacidad antioxidante total se utilizó el ensayo colorimétrico del 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) (ABTS). Se basa en la generación del radical $ABTS^{\bullet+}$, de color turquesa oscuro, que reacciona con los antioxidantes presentes en la muestra, produciéndose la decoloración del mismo²⁷. La decoloración es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra. Se siguió el protocolo de Tan²⁸ (**Anexo I**). Para la calibración se utilizaron diluciones seriadas de ácido ascórbico (1 mM, 800, 600, 400, 200 y 100 μ M).

3.1.8 Determinación de concentración de peróxido de hidrógeno

Para la medida de H_2O_2 del medio de cultivo se recogieron 500 μ L de medio completo. Se utilizó el ensayo Amplex Red/HRP²⁹ que se basa en la reacción de la sonda Amplex Red con el H_2O_2 presente en la muestra en presencia de peroxidasa de rábano (HRP), generando un producto fluorescente y cuantificable. La fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de H_2O_2 .

Se mezclaron 50 μ L de la suspensión celular y 50 μ L de la mezcla ya preparada de solución de Amplex Red 10 mM y HRP 1 U/mL. Se dejó incubar a temperatura ambiente 30 min, en condiciones de oscuridad. Finalmente se midió la fluorescencia a una longitud de onda de 560 nm de excitación, y 590 nm de emisión.

3.1.9 Análisis estadístico

Los datos se representan como media \pm desviación estándar. Para el análisis de diferencias entre grupos experimentales se aplicó análisis de la varianza (ANOVA). Cuando se compararon solo dos grupos experimentales se aplicó un t-test bilateral. Un p-valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SigmaPlot 12.0.

3.2 Diseño experimental

Con la finalidad de responder a los objetivos propuestos, el estudio se basó en dos tipos de condiciones experimentales en las células: la evolución de la respuesta celular a la privación de glucosa respecto al tiempo, y el efecto de la melatonina en la privación durante 18 y 24 h.

Para los experimentos de privación, las células una vez subcultivadas se dejaron adherir durante 48h a la placa de cultivo. Una vez adheridas, se retiró el medio de cultivo en las placas de los grupos controles y experimentales. Las células se lavaron al menos 2 veces con PBS pH7,4 y se reemplazó el medio por medio completo en las placas de los grupos controles y por medio sin glucosa en los grupos experimentales.

En el caso de los experimentos con melatonina, se utilizó una concentración de melatonina 1 mM, añadida justo en el momento de la incubación con medio sin glucosa. La melatonina se preparó en un *stock* 1M en dimetil-sulfóxido (DMSO). El DMSO (0,1%) se añadió a todos los grupos experimentales, incubados o no con melatonina. La **Fig. 1** resume el diseño experimental:

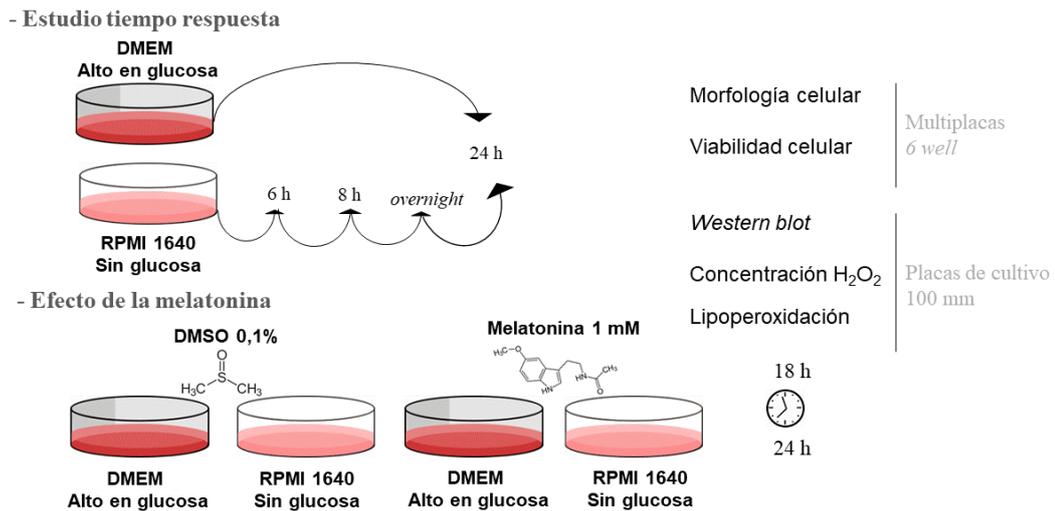


Figura 1. Diseño experimental del presente estudio.

En lo que respecta a los pacientes, se utilizaron dos tipos de muestra, plasma y eritrocitos, de un total de 10 pacientes: 5 pacientes sanos, tomados como controles, y 6 pacientes que sufrieron un ictus isquémico en un máximo de 24 h antes de la recogida de la muestra. Las muestras que se tomaron en cuenta fueron recogidas 1 h tras el ingreso

por episodio isquémico. De dos de estos sujetos se consiguieron también muestras 3 meses después del ictus, de utilidad para analizar parámetros de estrés oxidativo.

Todas las muestras fueron evaluadas y autorizadas por el comité de ética del HUCA, y los pacientes firmaron su consentimiento explícito. Las muestras se mantuvieron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

4 Resultados

4.1 Estudio tiempo respuesta del efecto de la privación de glucosa en las células HT22

4.1.1 Viabilidad celular

A través del contaje con azul de tripán se evaluó el efecto de la privación de glucosa en la supervivencia de las células HT22 a lo largo del tiempo. La observación microscópica de la morfología celular nos indicó que los cambios más notables se observaban tras 24 h de privación (**Fig. 2A**), periodo en que se advierte una disminución considerable del volumen citoplásmico, la pérdida de la integridad celular, la aparición de pequeños cuerpos apoptóticos y un gran contenido en restos celulares en la placa.

En primer lugar, se observó una caída del número de células que ya es significativa a las 8 h (**Fig. 2B**). En cuanto a la viabilidad celular, se observó que el efecto de la privación fue creciente a lo largo del tiempo, siendo ya significativo a las 8 h ($P < 0,05$) (**Fig. 2C**).



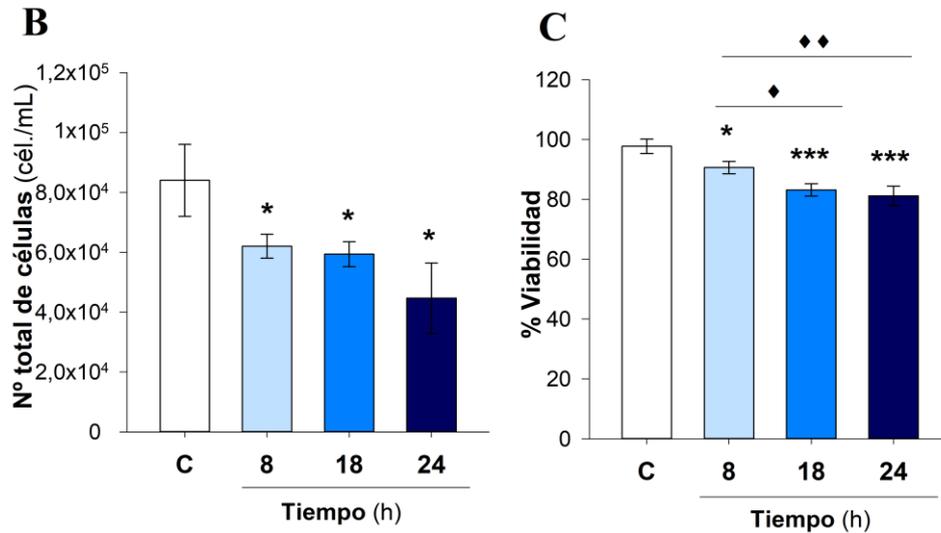


Figura 2. (A) Ejemplos representativos de la observación microscópica de la respuesta en presencia y ausencia de glucosa durante 24 h. (B) Recuento celular en la privación de glucosa y (C) porcentaje de viabilidad de la privación de glucosa a lo largo del tiempo. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar ($n=3$); * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs control (C); $\blacklozenge P < 0,05$, $\blacklozenge\blacklozenge P < 0,01$ vs 8 h.

La viabilidad celular también mediante citometría después de la tinción de las células con Anexina V (marcador de apoptosis) y de IP (marcador de necrosis). En la **Fig. 3** se muestra un experimento representativo donde se analizan las células HT22 en presencia y en ausencia de glucosa durante 18 h. Tras la retirada de glucosa, el número de células apoptóticas incrementa considerablemente, así como también las necróticas.

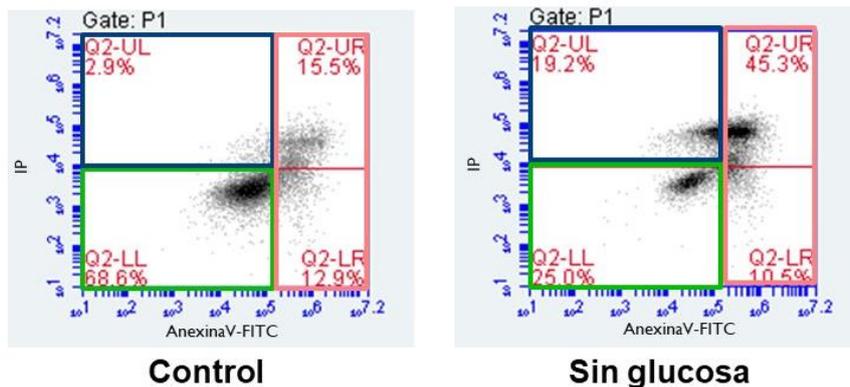


Figura 3. Niveles de células apoptóticas, teñidas con AnexinaV y yoduro de propidio de las células HT22 después de una privación de glucosa de 18 h. Q2-LL representa la población de células vivas, Q2-LR/UR la suma de células apoptóticas y Q2-UL las células necróticas

4.1.2 Producción de enzimas antioxidantes

Se evaluó la producción de las enzimas antioxidantes más importantes en el control de la concentración celular de EROs en neuronas: la catalasa y las superóxido dismutasas citosólica (SOD1) y mitocondrial (SOD2) (**Fig. 4**). Se observó un incremento notable de SOD1 en todos los tiempos, con respecto al control, especialmente a las 14 h.

De igual manera, la producción de SOD2 también se incrementó con el tiempo a todos los tiempos estudiados. Por el contrario, la producción de catalasa disminuyó significativamente con el transcurso del tiempo.

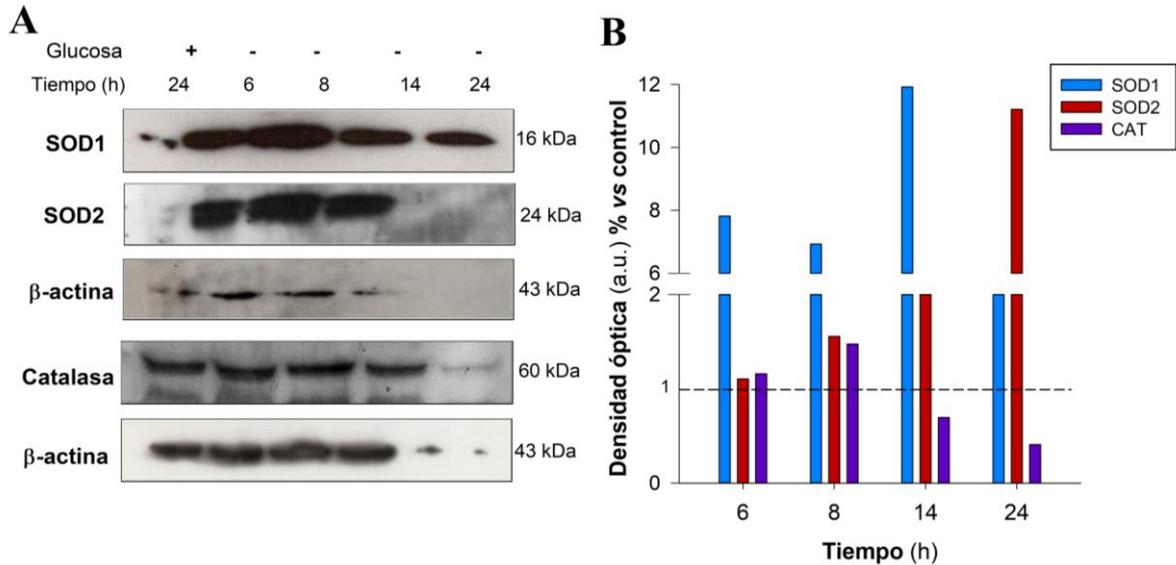


Figura 4. (A) Niveles de SOD1, SOD2, catalasa de las células HT22 tras la privación de glucosa a lo largo del tiempo. (B) Cuantificación de las señales obtenidas en los niveles de SOD1, SOD2 y catalasa (CAT).

4.1.3 Concentración de H_2O_2

Dado que se observó a las 24 h de cultivo sin glucosa un incremento importante de SOD y una caída de catalasa, se cuantificó la concentración de H_2O_2 como medida directa del nivel de estrés oxidativo en cada condición.

De acuerdo con lo esperable, la privación de glucosa causó un aumento significativo de H_2O_2 en comparación al control en el medio de cultivo de las células HT22 cultivadas en ausencia de glucosa (**Fig. 5**).

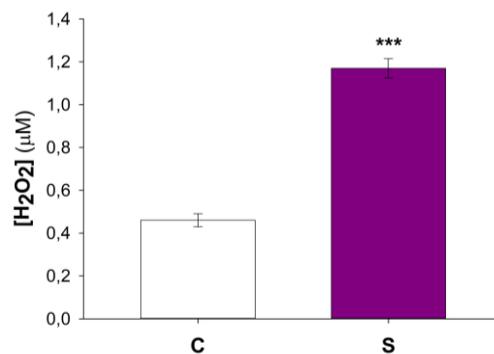


Figura 5. Concentración de H_2O_2 en las células HT22 en su medio normal (C), y tras la privación de glucosa 24 h (S). Cada valor está representado por la media \pm desviación estándar (n=3); *** $P < 0,001$ vs C.

4.1.4 Medida de lipoperóxidos

Una vez comprobado que se producía un desbalance en la producción de enzimas antioxidantes tras la privación de glucosa en las células HT22, decidimos analizar el daño oxidativo posiblemente derivado.

Se analizó la cantidad de lipoperóxidos tras la incorporación de DPPP a las células controles y privadas de glucosa. Para evaluar el grado de lipoperoxidación en ambas condiciones y compararlas, se normalizó la producción de fluorescencia por número de células (**Fig. 6A**) y por la concentración de proteína presente en la muestra (**Fig. 6B**). Se observó un incremento estadísticamente significativo de la cantidad de lipoperóxidos producidos cuando las células eran cultivadas en ausencia de glucosa.

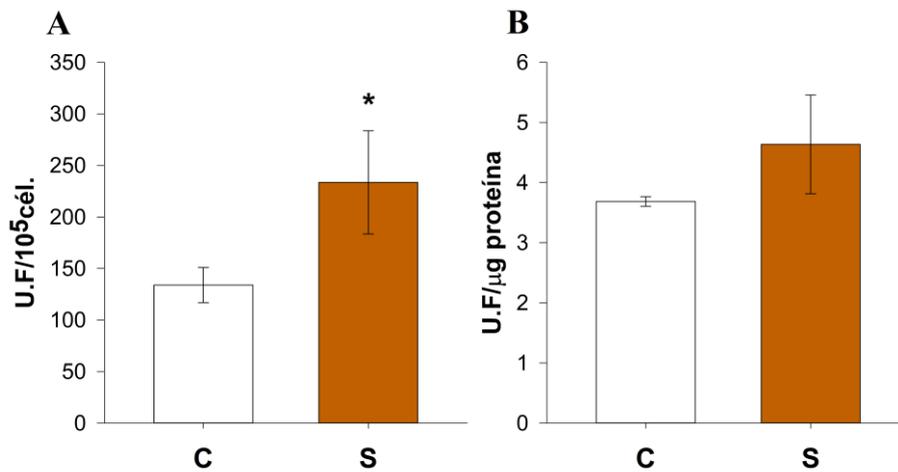


Figura 6. Niveles de lipoperóxidos en las células HT22 tras la privación de glucosa. (A) Unidades relativas de fluorescencia de DPPP por 10⁵ células. (B) Unidades relativas de fluorescencia por μg de proteína. Células sin tratar (C), células privadas de glucosa de 24 h (S). Cada valor está representado por la media ± desviación estándar (n=3); * P < 0,05 vs C.

4.2 Efecto protector de la melatonina en la citotoxicidad causada por la privación de glucosa

4.2.1 Estudio morfológico

El efecto de la melatonina se estudió en primer lugar mediante el análisis de la morfología celular de las células HT22 tras la privación de glucosa durante 24 h. La adición de melatonina al medio de cultivo previno los cambios morfológicos causados por la privación de glucosa, en términos de número de células y volumen celular (**Fig.7**).

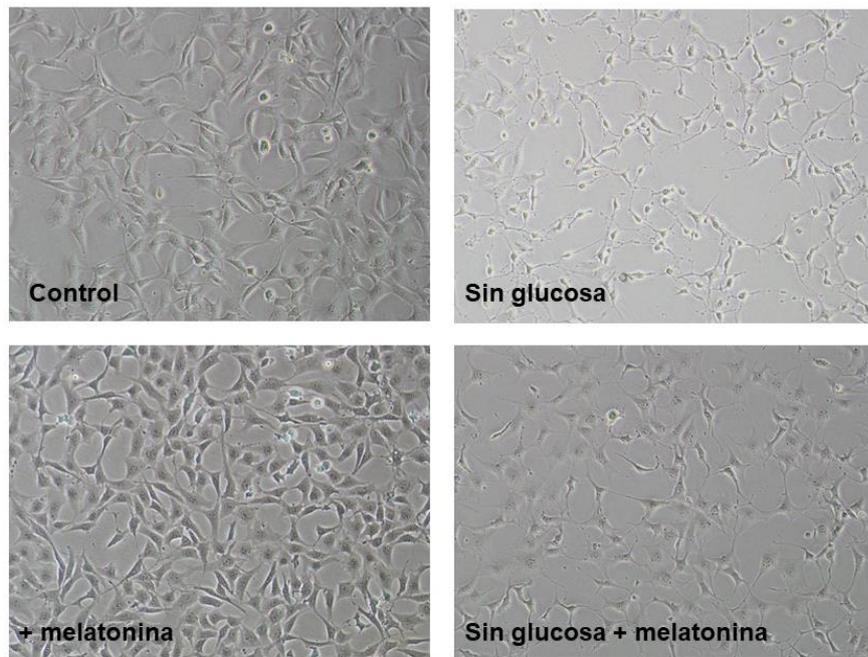


Figura 7. Observación microscópica del efecto del tratamiento con melatonina durante 24 h.

Para comprobar los posibles cambios que la melatonina podría causar en el reordenamiento del citoesqueleto celular, y con el fin de explicar los cambios morfológicos causados por el indol, las células se marcaron con faloidina y DAPI (**Fig. 8**).

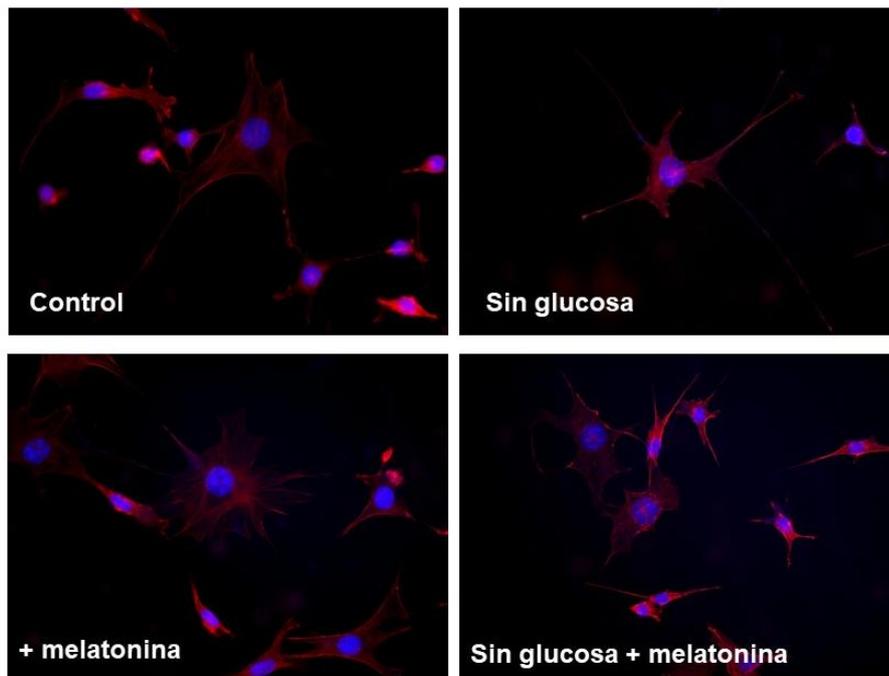


Figura 8. Morfología celular por tinción de faloidina (rojo) y DAPI (azul) después de tres días de cultivo y 24 h de tratamiento.

Tras la privación de glucosa se observaron cuerpos celulares menos voluminosos y un mayor número de prolongaciones citoplásmicas. El tratamiento con melatonina evitó los cambios producidos por la privación de glucosa, observándose células con características morfológicas intermedias entre el control y la privación.

4.2.2 Viabilidad celular

Se estudió el efecto de la melatonina tras 18 h y 24 h de la retirada de glucosa, en las cuales se produce una caída de la proliferación y la viabilidad muy significativa de las células HT22. En este modelo, la melatonina no causó una recuperación significativa ni de los niveles de inhibición de la proliferación ni de la viabilidad tras la privación de glucosa. (**Fig. 9 A, B, C y D**).

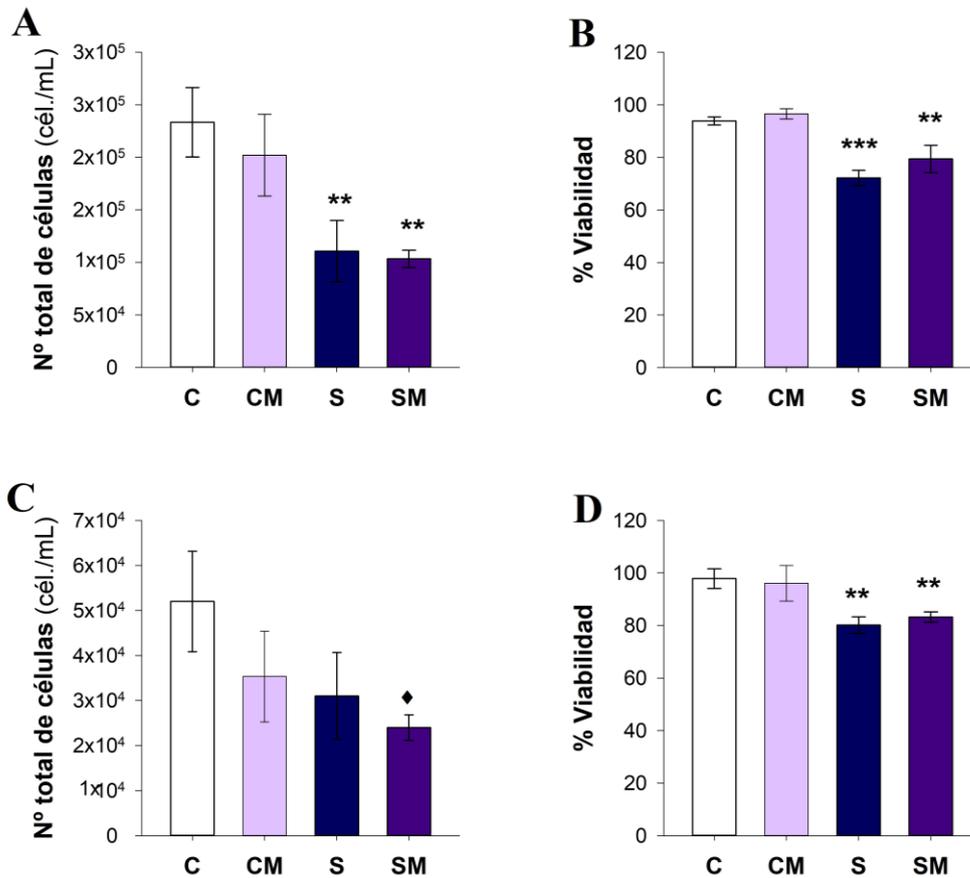


Figura 9. (A) Recuento celular y (B) porcentaje de viabilidad de las células HT22 privadas de glucosa y tratadas con melatonina tras 18 h. (C) Recuento de células HT22 y (D) viabilidad tras una privación de glucosa y tratamiento de melatonina de 24 h de duración. Células sin tratar (C), privación de glucosa por 18 h (S), pretatamiento con melatonina 1 mM (CM y SM). Cada valor está representado por la media \pm desviación estándar (n=3); ** P< 0,05 vs C, ** P<0,01 vs C, *** P< 0,001 vs C, ♦P<0,05 vs CM.

4.2.3 Ciclo celular

Dado que el tratamiento con melatonina disminuyó por sí mismo el número de células HT22 tras 18 h de la retirada de glucosa, pero no alteró los mecanismos de muerte celular inducidos por la privación, se analizó la distribución de las células HT22 en el ciclo celular (**Fig. 10**). Tras la privación se produce una disminución estadísticamente significativa de células en fase G0/G1, (**Fig. 10B**). La melatonina no muestra cambios significativos en la distribución del ciclo de las HT22 privadas de glucosa.

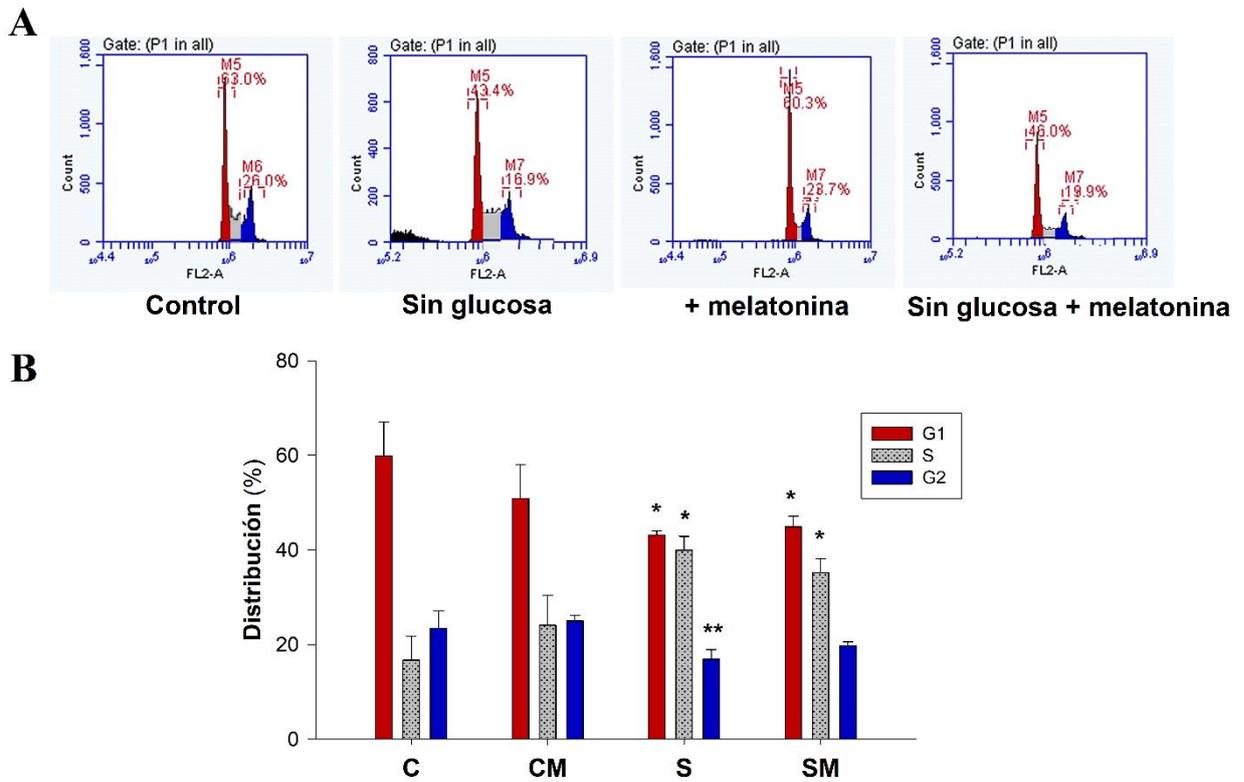


Figura 10. (A) Ejemplos representativos de la distribución de células a través del ciclo celular. M5 equivale a fase G0/G1, y M6 a la fase G2 del ciclo celular. (B) Porcentaje de células acumuladas en las distintas fases del ciclo celular en cada condición experimental: células sin tratar (C), privación de glucosa por 18h (S), pretratamiento con melatonina 1mM (CM y SM). Cada valor está representado por la media \pm desviación estándar (n=3); * P<0,05 vs C.

4.2.4 Producción de enzimas antioxidantes

Dado el papel de la melatonina en la producción de las enzimas antioxidantes en otros sistemas celulares, se evaluaron los niveles de SOD1, SOD2 y catalasa en células HT22 tras la privación de glucosa cultivadas en presencia o ausencia de melatonina a las 18 h (**Fig. 11B**).

En líneas generales, no se observaron diferencias entre grupos. La melatonina incrementó la producción de SOD1 tras la privación de glucosa de forma notable, pero esto no pareció suficiente para prevenir la muerte celular.

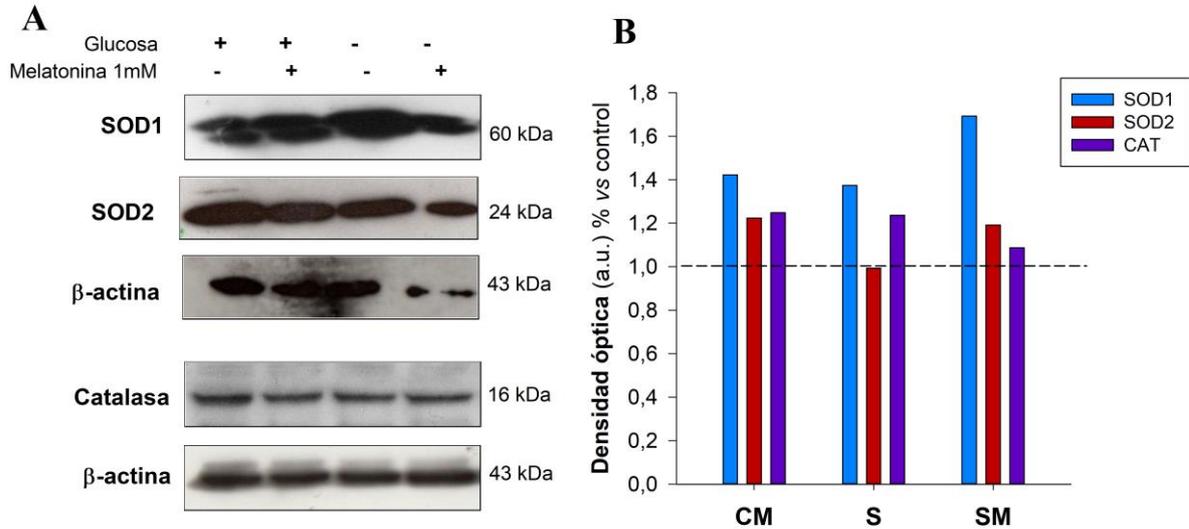


Figura 11. (A) Niveles de SOD1, SOD2, catalasa y β -actina en células HT22 tras la privación de glucosa y el tratamiento con melatonina a las 18 h. (B) Cuantificación de las señales obtenidas en los niveles de SOD1, SOD2 y catalasa (CAT). Células sin tratar (C), privación de glucosa por 18h (S), pretratamiento con melatonina 1 mM (CM y CS).

4.2.5 Concentración de H_2O_2

Basándonos en los resultados de producción de enzimas antioxidantes, en los que la adición de melatonina no supuso cambios significativos con respecto a la privación sin melatonina, decidimos cuantificar los niveles de H_2O_2 en las células HT22. De la misma manera, la melatonina no disminuye de forma significativa la producción de H_2O_2 en células HT22 privadas de glucosa (**Fig. 12**).

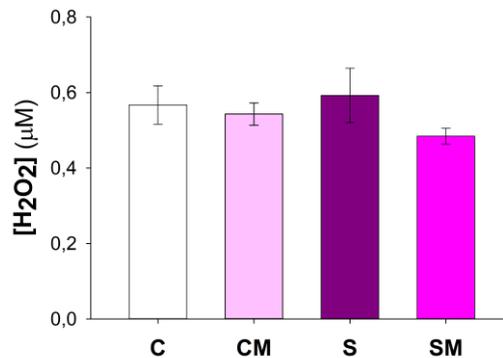


Figura 12. Concentración de H_2O_2 de cada condición experimental: células sin tratar (C), privación de glucosa de 24 h (S), pretratamiento con melatonina 1 mM (CM y SM). Cada valor está representado por la media \pm desviación estándar (n=3).

4.2.6 Medida de lipoperóxidos

Asimismo, se estudió el efecto de la melatonina sobre la lipoperoxidación en las células cultivadas en presencia y ausencia de glucosa (**Fig. 13**). La retirada de glucosa del medio de cultivo provocó un aumento significativo de la producción de lipoperóxidos aunque la preincubación con melatonina no previno el aumento de los niveles de DPPP ($P=0,166$).

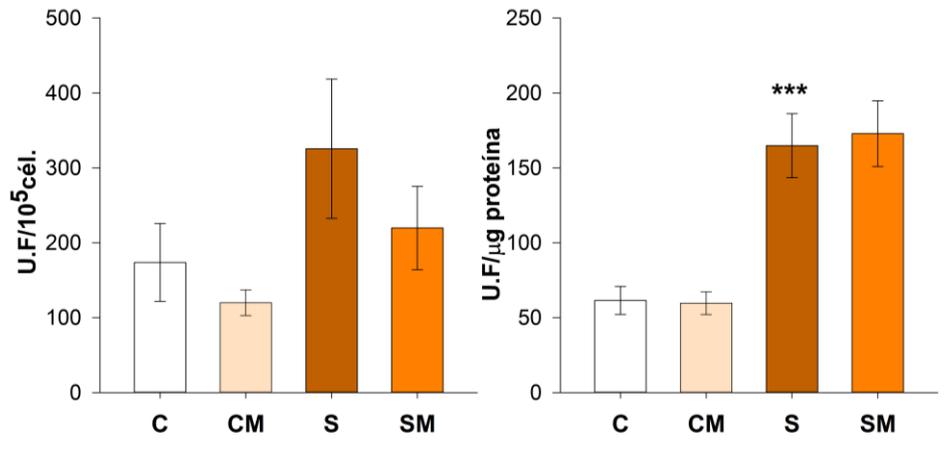


Figura 13. Niveles de lipoperóxidos en las células HT22 tras la privación de glucosa y tratamiento con melatonina durante 24 h. (A) Unidades relativas de fluorescencia de DPPP por 10^5 células. (B) Unidades relativas de fluorescencia por μg de proteína. Células sin tratar (C) y privación de glucosa de 24 h (S), pretratamiento con melatonina 1 mM (CM y SM). Cada valor está representado por la media \pm desviación estándar ($n=3$); * $P < 0,05$ vs C.

4.3 Estudio de los niveles de estrés oxidativo en sangre de pacientes de ictus isquémico

Una vez demostrado que la privación de nutrientes altera el balance redox de neuronas de hipocampo de ratón *in vitro*, se valoraron parámetros de estrés oxidativo en muestras de eritrocitos y de plasma procedentes de pacientes que sufrieron un ictus isquémico, mediante la medida de lipoperóxidos y la capacidad antioxidante total. Se observó también en los pacientes la evolución de estos parámetros 3 meses más tarde de la primera recogida de muestra del paciente diagnosticado.

4.3.1 Medida de lipoperóxidos

Comparando la concentración de H_2O_2 equivalente a la intensidad de fluorescencia medida a través del ensayo con DPPP, de controles y pacientes no se observan diferencias significativas entre grupos en las muestras de eritrocitos, pero sí en el plasma ($P < 0,05$) (Fig. 14C).

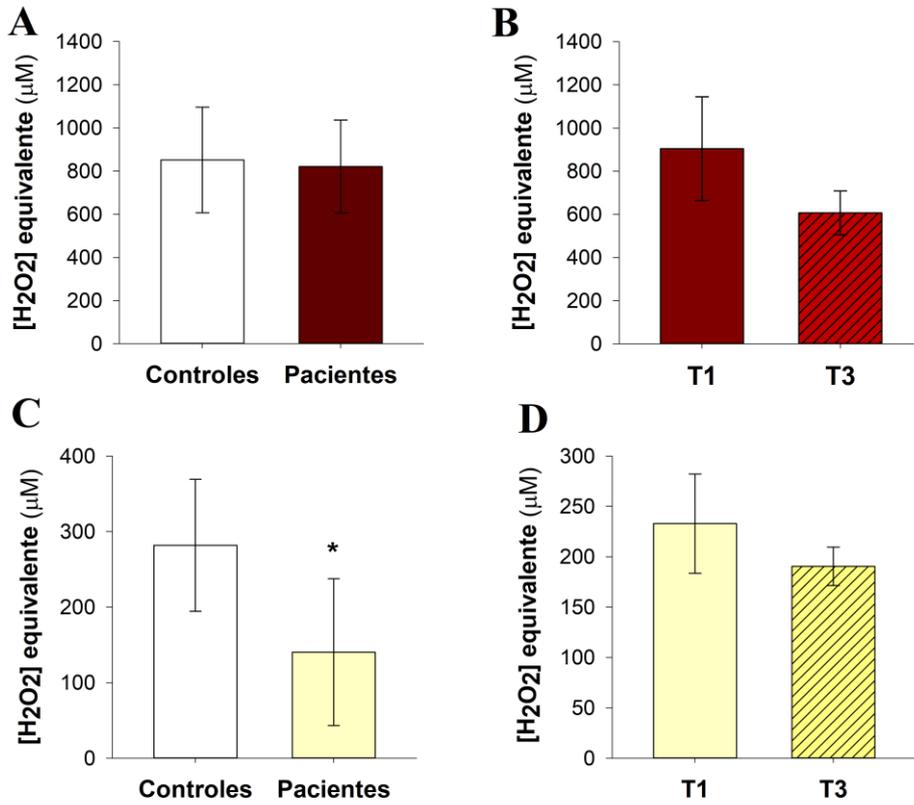


Figura 14. Concentración de H_2O_2 a la que equivalen las unidades de fluorescencia de los lipoperóxidos presentes en las muestras de eritrocitos. (A) y de plasma. (C). (B) Comparación de la concentración equivalente de H_2O_2 después del diagnóstico (T1) y 3 meses después del episodio (T3) ($n=2$) en muestras de eritrocitos (B) y plasma (D). * $P < 0,05$ vs Controles.

Los resultados del estudio de seguimiento (Fig. 14 B y D) apuntan a que, desde que se produce el evento isquémico la concentración de H_2O_2 va disminuyendo progresivamente con el tiempo, aunque la diferencia no llega a ser significativa.

4.3.2 Capacidad antioxidante total

Puesto que contrario a lo esperado, se produce una caída de los niveles de H_2O_2 en la sangre de los pacientes con respecto a los individuos sanos, se valoró la capacidad antioxidante total y se determinó en función de la concentración del estándar, ácido ascórbico. Se observó que las muestras de plasma de pacientes tienen una capacidad antioxidante significativamente menor ($P < 0,01$) que los sujetos control (**Fig. 16C**).

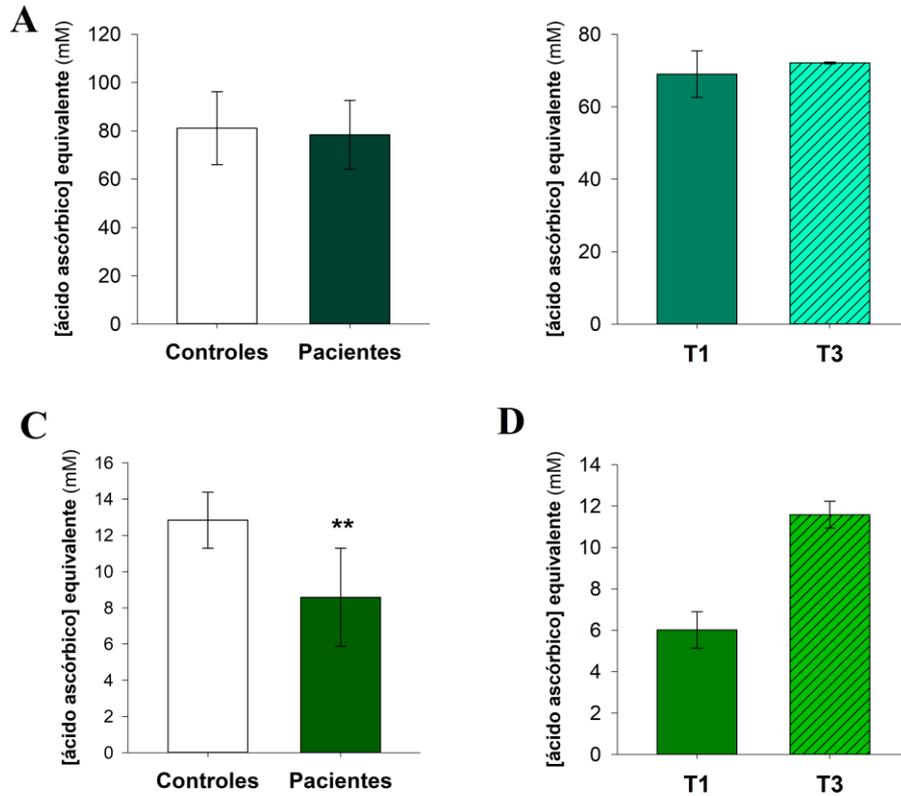


Figura 16. Concentración en equivalentes de ácido ascórbico presente en la muestra de: (A) eritrocitos (B) plasma. Comparación de capacidad antioxidante 1 h después del diagnóstico (T1) frente a 3 meses después (T3). ** $P < 0,01$ vs Controles.

La evolución con respecto al momento inicial del episodio isquémico, a pesar de no mostrar diferencias significativas, apunta hacia una recuperación de la capacidad antioxidante hasta niveles similares a los sujetos controles.

5 Discusión

En este trabajo fin de máster se han estudiado los efectos de la privación de glucosa en las células de hipocampo de ratón HT22 en la supervivencia y en los niveles de estrés oxidativo. Al igual que ocurre en el contexto de ictus isquémico, la retirada de glucosa del medio tuvo un efecto directo sobre su viabilidad. La duración y la magnitud de la condición repercute sobre lo que en ictus se denomina penumbra isquémica³¹, neuronas potencialmente recuperables si se restaurase el flujo sanguíneo, o en este caso, si se devolvieran las condiciones de normalidad.

Se comprobó una clara progresión descendente de la viabilidad a medida que aumentaba el tiempo del tratamiento. Cuanto mayor era el tiempo, mayor caída de viabilidad y mayor la afectación a nivel morfológico. Según estos resultados, se puede establecer la existencia de una correlación directa entre la mortalidad y la duración del tiempo en el que las neuronas permanecen en ausencia de nutrientes y posiblemente oxígeno. El incremento de número de células en apoptosis y necrosis, principales mecanismos de muerte celular en lesiones isquémicas³² confirma que en un periodo de 18 h ya hay repercusiones sobre la viabilidad celular.

En modelos de ictus isquémico se ha observado un aumento de SOD2, que posiblemente se produce en respuesta a un aumento de la formación de $O_2\bullet$ ⁻³⁴. De hecho, sobreexpresando este enzima, se ha conseguido un efecto de protección frente a la isquemia y la reperfusión^{2,35}. Los resultados obtenidos en nuestro modelo celular muestran un aumento temprano de SOD1 y SOD2, que a medida que se prolonga la exposición, llegan a un máximo de producción y comienzan a disminuir. Estos resultados apoyan los expuestos por Žitňanová³⁶ que interpreta como respuesta de precondicionamiento al evento isquémico. Sin embargo, en el caso de la producción de catalasa, uno de los enzimas que depura H_2O_2 , su papel en el ictus isquémico no está claro, ya que hay estudios con ambos resultados posibles: un incremento de su producción y una disminución³⁷.

Al igual que en modelos de privación de suero¹⁶, la privación de glucosa induce estrés oxidativo incrementando la lipoperoxidación de las células. Los lipoperóxidos se detectaron con DPPP dadas sus propiedades: su estructura es biológicamente inerte lo cual aumenta su vida media, a la par que no provoca ninguna perturbación en la célula²⁶.

En nuestro modelo, el incremento de fluorescencia de la sonda tras 24 h en ausencia de glucosa refleja que la privación de glucosa supone un aumento en el daño oxidativo a lípidos. De hecho, se confirma un aumento en la concentración de H_2O_2 tras la privación, que puede explicar los efectos deletéreos³⁸. Al añadir a este modelo DMSO, este aumento en la concentración de H_2O_2 no es evidente. El tratamiento con DMSO supuso una reducción de la concentración de H_2O_2 en comparación, pero no repercutió sobre las medidas de otros parámetros, ni supuso una disminución de lipoperoxidación.

En base a estudios previos en modelos animales de ictus isquémico, el tratamiento con melatonina consigue reducir el daño cerebral provocado³⁹. La observación microscópica de las células en privación de glucosa y tratamiento con melatonina por un periodo de 24 h resultó destacable: las células mantenían mucho mejor su morfología al ser tratadas con melatonina.

La melatonina como neuroindol con capacidad antioxidante que es, se esperaba que tuviera un efecto protector en la eliminación de parte de los radicales producidos. Sin embargo, el recuento y la viabilidad celular bajo estas condiciones no han sido positivos.

Atendiendo a la distribución del ciclo celular, el aumento de células en la privación de glucosa en fase S durante la duplicación sugiere que han quedado retenidas en el momento. Existe una detención del crecimiento que, podría ser debida a alteraciones en la producción de ATP o en la síntesis proteica, relacionados con los niveles intracelulares de EROs¹¹. El recuento de células sin glucosa es inferior al de células sin tratar y las células presentan defectos morfológicos como una disminución considerable del volumen total citoplásmico con mayor número de proyecciones.

En líneas generales se puede decir que la adición de melatonina no supuso cambios especialmente significativos en los niveles de los enzimas. Sí que potenció la actividad de SOD1 a las 18 h, pero a partir de ese momento, y al igual que con SOD2, desaparece el efecto. De acuerdo a la capacidad protectora de la melatonina a través de la estimulación de la actividad de enzimas antioxidantes²⁰, los presentes resultados sugieren un efecto neuroprotector puntual, hasta llegado un tiempo en el que este efecto desaparece o no es suficiente.

La melatonina tampoco demostró un papel como depurador directo de radicales libres ya que no redujo de manera significativa ni la lipoperoxidación ni los niveles de H₂O₂. Pei y Cheung⁴⁰ demostraron una neuroprotección por parte de la melatonina, en un modelo de privación de glucosa y oxígeno, dosis dependiente tras 1 h de isquemia. La mayor concentración probada fue de 1 mM, la utilizada en este estudio, lo que nos sugiere que el papel antioxidante probablemente en este contexto tenga un margen de actuación estrecho.

Por último, se midió la intensidad de fluorescencia de lipoperóxidos, así como la capacidad antioxidante total, en muestras de eritrocitos y plasma de pacientes que han sufrido un ictus isquémico. Varios estudios han demostrado un incremento en los niveles de marcadores de lipoperoxidación en muestras de pacientes con ictus isquémico, así como caídas en los niveles de sistemas antioxidantes endógenos⁴¹. En este caso, a diferencia de lo esperado, las muestras de plasma de los controles tienen mayores niveles de lipoperoxidación que las de los pacientes con ictus isquémico. Sin embargo, esto puede ser a causa de diversos factores relacionados fundamentalmente con el estilo de vida de estos pacientes³². En pacientes con ictus isquémico la menor capacidad antioxidante respecto a los controles, indica una menor capacidad de frenar el estrés y el daño oxidativo. De hecho, Leinonen² observó una disminución de la capacidad antioxidante de muestras de pacientes con ictus isquémico que sirvió para establecer una correlación entre la actividad antioxidante y el área infartada de los mismos. En este estudio, debido al pequeño tamaño de la muestra (n=2) no se puede establecer una confirmación clara de la evolución, los resultados apuntan a que con el tiempo la situación isquémica se normaliza, y la capacidad antioxidante se recupera. Por esta razón, la determinación de marcadores de estrés oxidativo se presenta como un método interesante para el seguimiento de la evolución de los pacientes.

6 Conclusiones

1) En este estudio se han corroborado los efectos negativos que produce la retirada de un nutriente esencial, como resulta la glucosa en las células tipo neuronal HT22. Simulando una isquemia cerebral focal, se ha establecido que el tiempo tiene un efecto directo sobre el daño generado.

2) La privación de glucosa afecta al estado redox, tanto a nivel de producción de enzimas antioxidantes como de producción de daño oxidativo por aumento de especies reactivas.

3) En este modelo neuronal HT22 la melatonina no previene la muerte celular ni el daño oxidativo a largo plazo derivado de la privación de glucosa.

4) Las medidas en pacientes con ictus isquémico sugieren que el estrés oxidativo podría ser un evento importante en la patología, pero el tamaño de muestra ha sido limitante en el estudio.

7 Bibliografía

1. Andrabi SS, Parvez S, Tabassum H. Melatonin and Ischemic Stroke: Mechanistic Roles and Action. *Adv Pharmacol Sci*. 2015;48:384750. doi: 10.1155/2015/384750.
2. Leinonen JS, Ahonen JP, Lönnrot K, Jehkonen M, Dastidar P, Molnár G, Alho H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke*, 2000;31:33-39. doi: 10.1161/01.STR.31.1.33.
3. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019;21:2-14. doi:10.1097/00004647-200101000-00002.
4. Goux E, Buisson A, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L, Tauskela JS *et al*. Oxygen glucose deprivation-induced astrocyte dysfunction provokes neuronal death through oxidative stress. *Pharmacol Res*, 2014;87:8-17, 87, 8-17. doi: 10.1016/j.phrs.2014.06.002.
5. Ramos E, Patino P, Reiter RJ, Gil-Martin E, Marco-Contelles J, Parada E *et al*. Ischemic brain injury: new insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med*, 2017;104:32-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.005.
6. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*, 2017;9:119-131. doi: 10.1111/j.1750-3639.1999.tb00214.x.
7. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003;3:276-285. doi: 10.1038/nrc1046.
8. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 2015;4:180-183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
9. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002;82:47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
10. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, 2003;15:247-254. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00002-4.
11. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000;408:239-247. doi: 10.1038/35041687.
12. Watson N, Diamandis T, Gonzales-Portillo C, Reyes S, Borlongan CV. Melatonin as an antioxidant for stroke neuroprotection. *Cell transplant*, 2016;25:883-891. doi: 10.3727/096368915X689749.

13. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017;482:419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
14. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med*, 2005;39:841-852. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.025.
15. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransonhoff J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 1978;9:445-447. doi: 10.1161/01.STR.9.5.445.
16. Cesarini E, Cerioni L, Canonico B, Di Sario G, Guidarelli A, Lattanzi D, *et al*. Melatonin protects hippocampal HT22 cells from the effects of serum deprivation specifically targeting mitochondria. *PLoS One*, 2018;13:e0203001. doi: 10.1371/journal.pone.0203001.
17. Sobieski C, Warikoo N, Shu HJ, Mennerick S. Ambient but not local lactate underlies neuronal tolerance to prolonged deprivation. *PLoS One*, 2018;13:e0195520. doi: 10.1371/journal.pone.0195520.
18. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*, 2000;355:1179-1180. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02075-4.
19. Quiros I, Mayo JC, Garcia-Suarez O, Hevia D, Martin V, Rodriguez C, Sainz RM. Melatonin prevents glucocorticoid inhibition of cell proliferation and toxicity in hippocampal cells by reducing glucocorticoid receptor nuclear translocation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008;110:116-124. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.02.009.
20. Wu HJ, Wu C, Niu NH, Wang K, Mo LJ, Shao AW, *et al*. Neuroprotective mechanisms of melatonin in hemorrhagic stroke. *Cell Mol Neurobiol*, 2017;37:1173-1185. doi: 10.1007/s10571-017-0461-9.
21. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*, 2016;61:253-278. doi: 10.1111/jpi.12360.
22. Alghamdi BS. The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders. *J Neuro Res*, 2018;96:1136-1149.
23. Morimoto BH, Koshland DE. Induction and expression of long- and short- term neurosecretory potentiation in a neural cell line. *Neuron*, 1989;5:181-198. doi: 10.1016/0896-6273(90)90347-I.

24. Okimoto Y, Watanabe A, Niki E, Yamashita T, Noguchi N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett*, 2000;474:137-140. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01587-8.
25. Santas J, Guardiola F, Rafecas M, y Bou, R. Determination of total plasma hydroperoxides using a diphenyl-1-pyrenylphosphine fluorescent probe. *Anal Biochem*, 2013;434:172-177. doi: 10.1016/j.ab.2012.11.021.
26. Takahashi M, Shibata M, Niki E. Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. *Free Radic Biol Med*, 2001;31:164-174. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00575-5.
27. Fischer MA, Gransier TJ, Beckers LM, Bekers O, Bast A, Haenen GR. Determination of the antioxidant capacity in blood. *Clin Chem Lab Med*, 2005;43:735-740. doi: 10.1515/CCLM.2005.125.
28. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S *et al*. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res*, 2003;34:249-259. doi: 10.1034/j.1600-079X.2003.00037.x.
29. Grivennikova VG, Kareyeva AV, Vinogradov AD. Oxygen-dependence of mitochondrial ROS production as detected by Amplex Red assay. *Redox Biol*, 2018;17:192-199. doi: 10.1016/j.redox.2018.04.014.
30. Wang N, Miller CJ, Wang P, Waite TD. Quantitative determination of trace hydrogen peroxide in the presence of sulfide using the Amplex Red/horseradish peroxidase assay. *Anal Chim Acta*, 2017;963:61-67. doi: 10.1016/j.aca.2017.02.033.
31. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2010;1802:80-91. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.003.
32. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 2010;67:181-198. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.002.
33. Nagakannan P, Islam MI, Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E. Inhibition of VDAC1 protects against glutamate-Induced oxytosis and mitochondrial fragmentation in hippocampal HT22 cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2019;39:73-85. doi: 10.1007/s10571-018-0634-1.
34. Davis SM, Pennypacker KR. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochem Int*, 2017;107:23-32. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.007.

35. Lee JC, Won MH. Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils. *Anat Cell Biol*, 2014;47:149-156. doi: 10.5115/acb.2014.47.3.149.
36. Žitňanová I, Šiarnik P, Kollár B, Chomová M, Pazderová P, Andrežalová L, *et al.* Oxidative stress markers and their dynamic changes in patients after acute ischemic stroke. *Oxid Med Cell Longev*, 2016;9761697. doi: 10.1155/2016/9761697.
37. Homi HM, Freitas JJ, Curi R, Velasco IT, Junior BA. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. *Neurosci Lett*, 2002;333:37-40. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00983-7.
38. Armogida M, Nisticò R, Mercuri NB. Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ichtaemia. *Br J Clin Pharmacol*, 2012;166:1211-1224. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01912.x.
39. Lin YW, Chen TY, Hung CY, Tai SH, Huang SY, Chang CC, *et al.* Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Int J Mol Med*, 2018;42:182-192.
40. Pei Z, Cheung RTF. Melatonin protects SHSY5Y neuronal cells but not cultures astrocytes from ischemia due to oxygen and glucose deprivation. *J Pineal Res*, 2003;34:194-201. doi: 10.1034/j.1600-079X.2003.00026.x.
41. Margail L, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med*, 2005;39:429-443. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.003.

Anexo I

Material

A continuación se describen los medios de cultivo utilizados en el presente estudio, con su composición.

Medios de cultivo

-*Dulbecco's modified Eagle's medium high glucosa* (DMEM Alto en glucosa) (Biowest). Contiene L-glutamina (0,584 g/L). Suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de cóctel antibiótico-antimicótico (ATB/ATM) (Gibco), constituido por penicilina (10^4 U/mL), estreptomycin (10^4 µg/mL) y 25 µg/mL de antimicótico Fungizone.

-*Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1640) sin glucosa (Biowest, PO833-NIL). Suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% ATB/ATM, y 1% HEPES.

Protocolos

Subcultivo celular

Cuando las células alcanzaban una confluencia superior al 80% se procedía al subcultivo. Para ello, se retiraba el medio y se lavaba con PBS. Una vez retirado todo, se añadían 5 mL tripsina 0,05%-EDTA 0,53 mM para romper las adhesiones celulares a la superficie del *flask*, y se dejaba en el incubador por 3 min. Transcurrido el tiempo, se añadían entre 6-8 mL de medio para neutralizar el efecto de la tripsina, y se recogía todo el volumen a un *falcon* de 15 mL. Se centrifugaban a 500g durante 5 min, y tras la centrifugación se resuspendía el *pellet*, con las células precipitadas, en 2 mL de medio fresco. De esta suspensión se realizaba una dilución 1:10 a un nuevo *flask* T75.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar.

Western blot

Una vez recogidas las células, cada *pellet* fue tratado con 200 µL tampón de lisis RIPA. El *buffer* de lisis RIPA fue preparado con inhibidores de proteasas: PMSF (1mM), aprotinina (2µg/mL), leupeptina (10µg/mL) y pepstatina (1µg/mL), e inhibidores de fosfatasas: ortovanadato (200µM) y NaF (1mM). En último lugar se añadió a la mezcla ditiotreitól (DTT) 1 mM, como agente reductor. Todo el procedimiento se realizó en hielo.

Para extrapolar la concentración de las muestras se realizó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) por el ensayo de Bradford.

Se emplearon geles de poliacrilamida al 10% y 12% dependiendo del tamaño de la proteína a analizar. Para correr el gel se empleó una corriente de amperaje constante de 15 mA/gel. Para la transferencia, se utilizaron membranas PVDF. La electrotransferencia se realizó a 125 mA/gel en hielo. Para comprobar la eficiencia de la transferencia en las membranas, se tiñeron con Ponceau S. Una vez detectadas las bandas de proteínas, se realizaron varios lavados con TBS-T para proceder al bloqueo de la membrana, que se

llevó a cabo con leche en polvo al 5% durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo primario correspondiente en una solución de bloqueo de BSA al 3% durante toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se lavaron en TBS-T en agitación, y se procedió a añadir el anticuerpo secundario necesario de acuerdo al hospedador del primario, conjugado con HRP. La dilución se realizó en leche al 3%. Se incubó durante 80 min en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente, se realizaron lavados en TBS-T y se procedió al revelado quimioluminiscente con el *kit* Amersham ECL Prime.

Citometría de flujo

Para medir la muerte celular, una vez recogidas las células, se centrifugaron a 600g durante 5 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µL de PBS. Se utilizó un *kit* de marcaje celular con anexina, marcada con FITC, y IP. Se añadió el mismo volumen de ambos para cada muestra. Se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y se procedió al análisis en el citómetro.

Para medir el estado del ciclo celular, las células, una vez recogidas, fueron fijadas con etanol. Todo el procedimiento se realizó en hielo. Se centrifugaron a 4°C a 10000 g por 10 min. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS. Por último, se resuspendió el *pellet* de cada muestra en 0,5 mL de PBS, y, se fue añadiendo 1 mL de etanol 70% mientras se agitaba en el vórtex. Las células se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Se lavaron en 2 mL en BSA al 2% en PBS, y se centrifugaron a 300 g 5 min. Se añadió al *pellet* 0,5 mL de la solución de PI con ARNasas, y se dejó incubar 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió al análisis por el citómetro.

Lipoperoxidación con sonda de DPPP

-Células

Previamente a la medida directa de unidades de fluorescencia de lipoperóxidos, los *pellets* se resuspendieron en 1 mL de PBS, de donde se apartaron 300 µL para medir la concentración de proteína presente en la suspensión, y 20 µL para contar el número de células.

-Muestras de pacientes

El procedimiento fue el siguiente: se tomó un volumen de muestra de 40 µL, a los que se añadieron 160 µL de solución de PBS con urea 6 M y 0,125 % EDTA. La urea actúa como agente desnaturizante. Posteriormente se añadieron 100 µL de la solución de BHT en metanol y 100 µL de la solución de 400 µM de DPPP y de 4 mM de BHT en butanol. El butanol es clave para favorecer la reacción, y a su vez el metanol para permitir la, ya que la sonda es altamente hidrófoba. Se incubó en un baño en agitación a 40 °C durante 3 h bajo condiciones de oscuridad. Pasado el tiempo, se detuvo en hielo durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se añadió 1 mL de solución de urea 6 M en PBS. De esta mezcla se cogieron 100 µL y se mezcló con 1 mL de butanol, y agitó en el vórtex 2 min. Tras ello, las muestras se centrifugaron a 1500g a 4 °C 10 min. Se determinó la fluorescencia a 360/380 nm.

Capacidad antioxidante total con ABTS

Para partir de catión radical $ABTS^{\bullet+}$ se añadió una solución de persulfato de potasio 2,45 mM a una de ABTS 7 mM y se dejó 24 h de reposo.

La solución de $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó 25 veces en PBS para obtener unos valores de absorbancia óptimos. De cada muestra se utilizaron 10 μ L y se añadieron 200 μ L de $ABTS^{\bullet+}$. Se dejó en condiciones de oscuridad y en agitación a temperatura ambiente, durante 25 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 734 nm. Al añadir un antioxidante, se produce la decoloración, cuyo grado será proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra.