

IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA GALANTAMINA FRENTE
A DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO CON H₂O₂ EN LINFOCITOS HUMANOS
CULTIVADOS *in vitro*, MEDIANTE LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR CON
AZUL DE TRYPAN

LUZ ELENA TRIANA VIDAL

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011

IDENTIFICACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA GALANTAMINA FRENTE
A DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO CON H₂O₂ EN LINFOCITOS HUMANOS
CULTIVADOS *in vitro*, MEDIANTE LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR CON
AZUL DE TRYPAN

LUZ ELENA TRIANA VIDAL

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director

Silvio Marino Carvajal Varona
Mg. Ciencias Biológicas

Co-Director

Jaime Martin Franco
PhD. Ciencias con énfasis en Química

Asesor

Alfonso Enrique Ramírez Sanabria
PhD. Química Aplicada

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2011

Nota de aceptación

Directos Mg.
Silvio M. Carvajal

Jurado Mg.
Edna Lourdes

Jurado Mg.
Nilza Velasco

Lugar y fecha de sustentación: 02 de noviembre de 2011

Me hallaron los guardias que rondan la ciudad,
y les dije ¿Habéis visto al que ama mi alma?.
Apenas hube pasado de ellos un poco y halle
al que ama mi alma.

Cantares. Cap. 2 - Ver. 3.

AGRADECIMIENTOS

“Son paréntesis mágicos que le ponen a uno el corazón al borde del alma, porque, fugitiva pero intensamente, una pizca de eternidad, de Yahveh, ha venido de pronto a fecundar el tiempo.....”

Márquez dice que somos lo que recordamos y además como lo recordamos, nuestra vida entonces se convierte en obras y memorias que te definen, que te acompañan. En mi memoria solo existen buenos recuerdos de lo que fue, frente a un ustedes que me enorgullece haber conocido y sobre todo en el agradezco haber nacido.

Agradezco a mi Mamá por tomar y calentar mi mano cada día.

Agradezco a mi Tía por enseñarme que en la obra diaria, se hace historia con la verdadera nobleza del que ama.

Agradezco a mi hermano por ayudarme con su palabra a descubrir que el hombre deja de ser lobo cuando se acerca a lo intangible de lo humano.

Al profesor Silvio Carvajal desde el más sincero agradecimiento, toda mi admiración y respeto por haberme permitido ser su alumna.

A Angélica, a Vianny y a Rocío todo mi agradecimiento, por su apoyo incondicional.

A la Profesoras Edna y Marisaura agradezco haber sembrado en mí el amor por la genética y la biología.

A los profesores Hildier, Gerardo y al grupo de Recursos Hidrobiológicos, agradezco su amable apoyo.

Agradezco al grupo de Toxicología Genética por su colaboración, en especial a Elsa por haberme enseñado la disciplina que involucra el método científico.

A los grupos de Producto Naturales y Catálisis, gracias por su amable colaboración.

Al profesor Alfonso agradezco por mostrarme la motivación del saber.

A los profesores del departamento de Física mi más sincero agradecimiento por haberme guiado y enseñado en los pasillos de la Universidad, desde el inicio de mi carrera.

A mis compañeros de biología, química y física todo mi agradecimiento por haberme permitido construir con ustedes academia y humanidad.

“Si el Universo conspira en la vacuidad, las almas perdidas lloran la belleza, la insignificancia nos rodea.....”

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 13 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 3. ANTECEDENTES | 18 |
| 4. MARCO TEÓRICO | 22 |
| 4.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL ALZHEIMER | 22 |
| 4.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER | 22 |
| 4.2.1 Patología del Alzheimer | 22 |
| 4.2.3 Estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer | 23 |
| 4.2.3 Vías de apoptosis celular | 25 |
| 4.2.4 Papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) | 27 |
| 4.2.5 Marcadores Moleculares de la enfermedad de Alzheimer | 27 |
| 4.2.6 Tratamientos en la enfermedad de Alzheimer | 27 |
| 4.2.7 Mecanismos antioxidantes de los inhibidores de Acetil Colinesterasa | 28 |
| 4.3 LINFOCITOS COMO MODELO BIOLÓGICO | 30 |
| 4.4 ENSAYOS PARA DETERMINAR EL EFECTO CITOTÓXICO Y PROTECTOR DE LA GALANTAMINA | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5. | HIPÓTESIS | 33 |
| 6. | OBJETIVOS | 34 |
| 6.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| 7. | METODOLOGÍA | 35 |
| 7.1 | EFECTO CITOTÓXICO DE LA SAL DE GALANTAMINA | 35 |
| 7.1.1 | Siembra de linfocitos humanos | 35 |
| 7.1.2 | Cosecha del cultivo celular | 36 |
| 7.2 | PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR CON AZUL DE TRYPAN | 36 |
| 7.2.1 | Extracción y siembra de células mononucleares | 36 |
| 7.3 | TRATAMIENTOS | 37 |
| 7.3.1 | Pre-tratamiento con Galantamina | 37 |
| 7.3.2 | Tratamiento simultaneo con Galantamina y H ₂ O ₂ | 37 |
| 7.3.3 | Post-tratamiento con Galantamina | 37 |
| 7.3.4 | Cosecha | 37 |
| 7.4 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 38 |
| 8. | RESULTADOS | 39 |
| 8.1 | SELECCIO DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE GALANTAMINA | 39 |
| 8.2 | ÍNDICE MITÓTICO | 40 |
| 8.3 | ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR | 42 |
| 9. | DISCUSIÓN | 46 |
| 9.1 | CITOTOXICIDAD DE LA GALANTAMINA | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 9.1.1 | Efecto dosis-respuesta de la Galantamina | 46 |
| 9.1.2 | Efecto de la Galantamina sobre el índice mitótico | 47 |
| 9.1.3 | Peróxido de Hidrogeno como inductor de daño celular | 47 |
| 9.1.4 | Efecto protector de la Galantamina frente a daño oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno | 49 |
| 10. | CONCLUSIONES | 53 |
| 11. | RECOMENDACIÓN | 54 |
| 12. | BLBLIOGRAFÍA | 55 |

TABLA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1: Relación entre la Acetilcolinesterasa y los Mecanismos de inflamación en la Enfermedad de Alzheimer. | 24 |
| Figura 2: Vías de apoptosis celular. | 26 |
| Figura 3: Estructura de la Galantamina. | 29 |
| Figura 4: Efecto de la Galantamina sobre el promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica. | 40 |
| Figura 5: Efecto de la Galantamina sobre el promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica. | 42 |
| Figura 6: Efecto de la concentración alta, media y baja de Galantamina sobre el porcentaje de viabilidad celular en linfocitos humanos de sangre periférica. | 45 |
| Figura 7: Estructura del Hidrobromuro de Galantamina. | 51 |

TABLA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1: Efecto de la Galantamina sobre el promedio de IM, en linfocitos humanos de sangre periférica, n= 4. | 41 |
| Tabla 2: Efecto de la Galantamina sobre el Porcentaje promedio de viabilidad celular, en linfocitos humanos de sangre periférica, n= 8. | 43 |

RESUMEN

En esta investigación se identificó el efecto protector de la Galantamina (Alcaloide sintético en su presentación comercial: REMINYL de 8mg), frente a daño oxidativo, inducido con H_2O_2 en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante la prueba de viabilidad celular con azul de Trypan.

Se identificó una asociación negativa, significativa estadísticamente ($p < 0,05$), entre las concentraciones de la Galantamina y el promedio de IM, permitiendo determinar las concentraciones: alta que redujo el IM en un 65%, media que redujo el IM en un 50% y baja que no disminuyó el IM, respecto al control negativo (agua).

Mediante la prueba de viabilidad celular de los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, se encontró un incremento significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje promedio de la viabilidad de las células tratadas con las concentraciones baja ($0,65\mu M$) y media ($2,5\mu M$) de Galantamina, respecto de la viabilidad identificada en el tratamiento con el H_2O_2 (Inductor de daño, con un 61% de viabilidad). Se concluye que la Galantamina, a las concentraciones indicadas, presenta una capacidad protectora frente al daño celular promovido por el peróxido de hidrogeno, soportando su posible uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como artritis y Parkinson, que se caracterizan por un incremento en las especies reactivas de oxígeno que desencadenan muerte celular programada (apoptosis).

INTRODUCCIÓN

El Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que se manifiesta con demencia progresiva, déficit cognitivo y pérdida de la memoria, que finaliza con la muerte. Hoy en día, es una de las causas más frecuentes de mortalidad en los países industrializados, y no existen tratamientos efectivos que garanticen una mejor calidad de los pacientes [1]. Al comienzo de la enfermedad, se genera un aumento significativo de estrés oxidativo en neuronas y respuesta inflamatoria en linfocitos, que desencadenan mecanismos moleculares como la expresión de la proteína amiloidea que lleva a la apoptosis celular [2].

La Galantamina es uno de los tratamientos más comunes para el Alzheimer; usualmente se utiliza como un inhibidor de la acetilcolinesterasa [3]. Dentro del estudio de la función colinérgica del alcaloide, se cree que ayuda a disminuir la citotoxicidad de la proteína beta amiloide, por medio de una posible actividad antioxidativa, que contribuiría al control inicial de especies reactivas de oxígeno, que conduce a la expresión de dicha proteína [3, 4]. El peróxido de hidrogeno (H_2O_2), es una especie reactiva de oxígeno, comúnmente utilizado como inductor de daño celular por su capacidad de permeabilizar la membrana mitocondrial y activar las vías extrínsecas e intrínsecas de muerte celular programada [5-9]. Sarmiento, B. y M. Torres, en el 2010 [10] determinaron, en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, que el H_2O_2 a una concentración de $1\mu M$, conduce a los linfocitos a apoptosis.

Por tal razón, este estudio empleó el peróxido de hidrogeno como inductor de muerte celular por apoptosis, detectable mediante la prueba de viabilidad celular con azul de Trypan. La base de este estudio radica en la inducción a muerte celular programada por el H_2O_2 , con el fin de identificar el efecto protector de la Galantamina frente a daño oxidativo inducido con H_2O_2 , en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según Alzheimer's Disease Educations and Referral Center [11], la enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia senil. Se caracteriza por síntomas como pérdida de la memoria, la razón, el juicio y el lenguaje, que termina por obstruir el estilo de vida de los pacientes. El Alzheimer se ha convertido en una de las mayores problemáticas de salud pública en los Estados Unidos, ya que involucra a las familias, al sistema de atención de salud y a la comunidad en general, que debe aceptar el deterioro mental producto de la patología. Se calcula que 4 millones de personas sufren hoy este trastorno; para el año 2050 se estima que 14 millones de estadounidenses padecerán la enfermedad si se conservan los números actuales y no se hallan tratamientos para prevenirla [12].

En Colombia se reportó, en el 2003, que de cada 100 patologías mentales, el 13,3% pertenecían a demencia [13]. De igual forma, investigadores de la Universidad Nacional afirman que actualmente entre el 12% y el 15% de la población Colombiana padecen el Alzheimer; de los 300 pacientes diagnosticados con demencia por el Instituto de Genética, el 70% de los casos se relacionan directamente con la enfermedad [14]. El impacto de este trastorno en nuestros días traspasa las barreras de la medicina, al convertirse en un problema social; se ha establecido una relación entre los bajos recursos económicos para el diagnóstico en las sociedades latinoamericanas y el aumento potencial de enfermos mayores de 65 años [15]. En este país, la frecuencia en adultos mayores que sufren esta anomalía se ha acrecentado, alcanzando el 4% de la población total lo cual revela la necesidad de programas de vigilancia epidemiológica, estudios clínicos de investigación básica y de formas terapéuticas con las que se pueda atender y ayudar directamente a dicha población [16].

En la enfermedad de Alzheimer, se originan múltiples daños a nivel celular, molecular y genético. La sobreexpresión de la proteína precursora del péptido beta amiloide (PPBA), que ocurre al inicio de la enfermedad, desencadena cambios anatómicos, como el crecimiento ventricular, y cambios moleculares como el aumento de la respuesta inflamatoria cerebral que conlleva a la apoptosis neuronal [17]. En los últimos años, se ha publicado acerca del importante papel que juega el estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Golimstok afirma que, según investigaciones experimentales, el aumento en la respuesta inflamatoria ayudaría a la aparición de EA [18]. Apoyando lo anterior, se ha descubierto que el uso de esteroides y de fármacos antiinflamatorios no esteroides, disminuyen el riesgo de padecerla [19]. Actualmente existen estudios para establecer si los antiinflamatorios pueden retrasar el comienzo de la

patología. Por ejemplo, se cree que la Indometacina mejora la capacidad cognitiva después de 6 meses de tratamiento [18].

Dentro de los tratamientos farmacológicos más comunes se encuentran los inhibidores de acetilcolinesterasa [17, 20-22]; hoy en día, los fármacos colinérgicos más utilizados son: la Tacrina, Donepecilo, Rivastigmina, Metrifonato, Galantamina y Eptastigmina [17]. En la identificación de la capacidad antiapoptótica de la Galantamina, se busca establecer su posible potencial antiinflamatorio en diferentes líneas celulares [4, 23, 24], con el fin de comprobar la doble acción como inhibidora de acetilcolinesterasa y antiinflamatoria, que contribuiría al control de la toxicidad de la proteína β amiloide. Meza, en el 2009 [25] publicó sobre una diferencia significativa en la actividad cognitiva de los pacientes que fueron medicados con Galantamina; sin embargo, en estudios *in vivo*, existen resultados inconclusos acerca de estos fármacos y de la capacidad de actuar en la fase inicial de la enfermedad, donde existe un aumento de las especies reactivas de oxígeno [20]. En Colombia existe un número pequeño de estudios que hacen referencia a estos compuestos [26, 27]; además, al consultar algunas bases de datos como Science, Google Scholar, PubMed, se observaron pocos estudios *in vitro* que asocien a la Galantamina con propiedades protectoras frente a las especies reactivas de oxígeno o daño oxidativo inducido. Por lo anterior, la ejecución de este estudio plantea responder al siguiente interrogante: ¿La Galantamina presenta actividad protectora frente al estrés oxidativo inducido con H_2O_2 , en linfocitos humanos cultivados *in vitro*?

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) se define como un trastorno neurológico que causa la apoptosis neuronal. Generalmente comienza con síntomas como la pérdida de la memoria y perturbación de las actividades cognitivas, afectando la vida cotidiana de los pacientes, con modificaciones de la personalidad que conllevan a la demencia y finalmente a la muerte. La incidencia de la enfermedad es de 3600 casos por año en Estados Unidos; lo que significa que más de cuatro millones de personas la padecen, con una alta frecuencia en adultos (65 y 69 años), entre los cuales, el porcentaje de afectados ha aumentado del 4% al 36% en menos de 15 años. La organización Alzheimer's Disease International (ADI) [28] señala que para el 2030 la prevalencia de enfermos aumentará el doble en América Latina. En Colombia, en el departamento del Valle del Cauca, en el año 1996 [29], se expuso una prevalencia de: 21.9 en 1000 habitantes, ajustada por edad de demencia relacionada con Alzheimer en adultos de 50 años. Actualmente, cerca del 4 % de la población mayor de 65 años y el 25% de adultos de 80 años, padecen este trastorno neurodegenerativo [16].

El Alzheimer se establece como la tercera enfermedad en costos económicos y la cuarta causa de muerte en los países industrializados [20]. Se reportó, por Smalls y colaboradores en el año 1996 [30], que mantener un enfermo costaba alrededor de 36 000 dólares y evaluó que, en el 2002, el costo nacional para los Estados Unidos llegó a los \$100 mil millones, lo que indica que la patología, además de ser un problema de salud, se ha convertido en una problemática económica por el elevado precio de los tratamientos. “Estos datos, conjuntamente con la pérdida de la productividad ocupacional en los casos de inicio temprano (35-40 años de edad) y su costo humano, han enfocado las estrategias actuales en el diagnóstico y tratamiento precoz del Alzheimer” [20].

El pronóstico de vida para los pacientes de Alzheimer es de 8 años después del diagnóstico. Dentro del transcurso de la patología existen tres etapas: la inicial, intermedia y final. La etapa inicial se caracteriza por una pérdida de la habilidad cognitiva moderada con expresión de la proteína β amiloide, inflamación cerebral, fosforilación anormal de Tau y toxicidad de los radicales libres. En la etapa intermedia, hay un desbalance en la homeostasis del calcio, pérdida de la sinapsis y disfunción colinérgica. En la etapa final existe pérdida neuronal y disfunción Norepinefrínica y Serotonérgica [31]. En la actualidad se piensa que el estrés oxidativo, al comienzo de la enfermedad, juega un papel principal en la etiología del Alzheimer. Se ha comprobado que las especies reactivas de oxígeno atacan a macromoléculas como lípidos, proteínas y el ADN [32]; estos cambios

del potencial redox en la célula, altera la expresión del sistema de antioxidantes causando grandes daños en el material genético, siendo posiblemente perjudicial para la viabilidad celular de las neuronas. Zawia en el 2009 [27] publicó que la alta oxidación de la guanina como resultado del estrés oxidativo, altera la unión de factores de transcripción de algunos genes, que tienen un impacto en la señalización epigenética. Una de las rutas de señalización activadas por el estrés oxidativo, es la vía de las protein-quinasas (MAPK), a la cual pertenece la kinasa extracelular reguladora (ERK1/2), la kinasa amino-terminal c-jun (JNK) y la kinasa p38. También se activa la vía de la fosfoinositol-3-kinasa (PI3K/Akt), el factor nuclear-kappa B (NF-kB) y la enzima Heme oxigenasa-1 (HO-1), las cuales controlan la respuesta celular al aumento de pro-oxidantes. Cai y colaboradores en el 2007 [33], señalan que el aumento de factores de inflamación y daño oxidativo, como peroxidación, oxidación de proteínas y DNA, característicos en la iniciación del Alzheimer, activan el mecanismo apoptótico.

El papel del receptor Fas en los mecanismos de disparo de muerte celular ocurre en diferentes situaciones, entre ellas, los desencadenados en procesos neurodegenerativos y la respuesta inmune [31]. La señalización Fas/Fas L es la que controla la apoptosis en linfocitos T y neuronas ante el daño oxidativo [34], igualmente la respuesta inflamatoria en el cerebro se relaciona con la sobreexpresión del factor de necrosis tumoral TNF- α en los linfocitos, convirtiendo a estas células en un modelo potencial para estudios de respuestas de estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas. En la actualidad, no son claras todas las posibles vías de apoptosis cuando se aumentan las concentraciones de radicales libres de oxígeno en las células. Una de las hipótesis establece que los incrementos en las ROS pueden activar la p53, la liberación de ceramidas, staurosporina y TNF (factor de necrosis tumoral), asimismo se cree que el peróxido de hidrógeno (que es ROS) se comporta como un amplificador de la respuesta oxidativa por su inestabilidad química dentro de la célula, lo cual contribuye con el desencadenamiento de la muerte celular programada. Estudios [8, 33, 35], afirman que el H₂O₂ puede generar una variación en la Permeabilidad Transitoria de la Mitocondria (MPT) o activar el receptor de muerte Fas para la liberación de moléculas pro-apoptóticas [9]. Por tal razón, múltiples estudios [5-8] utilizan al peróxido de hidrógeno como mediador de muerte celular programada. Sarmiento, B. y M. Torres [10], determinaron en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética, de la Universidad del Cauca, que el H₂O₂, a una concentración de 1 μ M, conduce a los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, a apoptosis. Por lo anterior, este estudio pretende establecer la prueba de viabilidad celular con azul de Trypan como una medida indirecta de muerte celular programada, en linfocitos humanos inducidos a daño oxidativo con H₂O₂, con base a la concentración ya estandarizada.

En el 2009 se publicó acerca de la actividad antiinflamatoria de los inhibidores de acetil colinesterasa, ya que la degradación de la acetilcolina lleva a la sobre expresión de interleucinas, citocinas y especies reactivas de oxígeno, en células del sistema inmune, estableciéndose una relación directa entre estrés oxidativo en linfocitos de pacientes con Alzheimer [36]; en este mismo año McNulty, J. et al. [23] reportan la inhibición del citocromo P450 3A4 utilizando Galantamina. Miezán y su grupo en el 2007, evaluaron la capacidad antioxidativa de la Galantamina en la línea celular SK-N-SH inducida a daño neuronal con H_2O_2 [4], lo que sugiere que este compuesto es un posible antiinflamatorio, además de su acción anticolinérgica, potencializando el uso del fármaco para todas las enfermedades neurodegenerativas, como la Esclerosis lateral amiotrófica, Ataxia de Friedreich, Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, Parkinson, Atrofia muscular espinal; y autoinmunes, como la Artritis Reumatoide y SIDA, las cuales se caracterizan por el aumento del estrés oxidativo celular, al inicio de la enfermedad. En concordancia con lo expuesto, se plantea como finalidad de este trabajo, determinar la capacidad protectora de la Galantamina frente a estrés oxidativo inducido con H_2O_2 , en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. Para la realización de este estudio se tiene en cuenta que, en las bases de datos más importantes (Science, Google Scholar, PubMed, Justor), no se han encontrado publicaciones que relacionen la capacidad antiinflamatoria de la Galantamina en linfocitos.

Esta investigación utilizó el ensayo *in vitro*, con el fin de determinar variables como las concentraciones a evaluar, el tiempo de tratamiento y para reducir el posible efecto de variables externas como: estilo de vida, genotipo y dieta que pueden interferir con los resultados. Se empleó como biomarcador de respuesta la prueba de viabilidad celular con azul de Trypan, con la cual se determinó, que la Galantamina aumenta la viabilidad celular de linfocitos humanos tratados previamente con H_2O_2 .

3. ANTECEDENTES

El Alzheimer, en la actualidad, es la causa del mayor número de demencias seniles; se estima que aproximadamente un 10% de los individuos mayores a 65 años padecen la patología. Esta enfermedad mortal se presenta comúnmente de forma esporádica, sin historia familiar previa; en los últimos años los tratamientos están enfocados en su diagnóstico y tratamiento temprano [37]. El Alzheimer fue descrito inicialmente por Alois Alzheimer en 1907, como una demencia que se acompañaba con episodios de pérdida de la memoria, solo hasta la década de los 70 se habló de una patología neurodegenerativa [38].

Los medicamentos que son capaces de inhibir la AChE cerebral como la Tacrina, el Donepecilo, la Rivastigmina y la Galantamina, evitan la degradación de la acetilcolina y, de esta forma, los niveles del neurotransmisor se aumentan en el espacio sináptico, lo cual contribuye al mejoramiento de la cognición en pacientes con Alzheimer. Se realizó en Villena, España, en el año 2003, un estudio retrospectivo observacional, en el que se incluyeron 20 pacientes con Alzheimer (con deterioro grave y muy grave), después de medicarlos durante 5 meses con fármacos anticolinestérasicos; se concluye que no hay diferencia significativa entre los grupos de tratados y no tratados, indicando la baja eficacia de esta clase de medicamentos en etapas avanzadas de la enfermedad [39].

Romero en el año 2005, reportó que no existe diferencia significativa entre el uso de diferentes inhibidores de acetilcolinesterasa, expresada en DDD/paciente/día, entre sexos, grupos de edad, ni en la desagregación de los grupos de edad por sexos; en este estudio observacional transversal, participaron 5110 individuos con demencia tipo Alzheimer [40].

López en el año 2006, establece, a partir de una investigación de tipo cohorte retrospectivo, que la tasa de mortalidad total en pacientes tratados con galantamina (con una dosis media de 15,0 mg/día) disminuye alrededor del 8%; a este trabajo pertenecieron 172 personas, las cuales fueron tratadas durante 13 meses [41]. En este mismo año, se evaluó la eficacia de la galantamina sobre los síntomas de demencia generada por Alzheimer vascular o mixta, en pacientes ambulatorios. En este estudio experimental se incluyeron 32 pacientes, se les administró gotas de Galantamina, con aumento de la dosis durante tres meses; el uso de Galantamina mejoró el estado psicomotor y cognoscitivo en los pacientes con demencia vascular y mixta [42].

Dentro de las investigaciones *in vitro*, en el año 2003, se valoró la capacidad antioxidante de la Galantamina y del hidrobromuro de Galantamina, utilizando un sistema de luminol dependiente, en el que se encontró que la capacidad antioxidante recae sobre el hidroxilo de esta molécula [43].

En el año 2004 se evaluaron los efectos de la Galantamina en la toxicidad de la proteína beta amiloide, usando una línea celular primaria de neuronas corticales de rata, donde la galantamina presentó un efecto neuroprotector mediante la inducción de la fosforilación de proteína serina/treonina quinasa, involucrada en vías celulares de supervivencia [44]. Igualmente, se observó la capacidad protectora de la Galantamina frente a muerte celular inducida por la proteína beta amiloide en la línea celular humana SH-SY5Y y una línea celular bovina; se encontró el máximo efecto protector a una concentración de 300 nM del alcaloide [45].

Investigadores de la Universidad de Antioquía, postulan a los linfocitos como modelo celular de estudio para vías celulares activadas por el estrés oxidativo en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, ya que los linfocitos presentan una similitud celular con las neuronas en los sistemas catecolaminérgico, serotoninérgico, acetilcolinérgico, glutamatergico, noradrenérgico y gabaérgico [46].

Se examinó, en el año 2007, la capacidad neuroprotectora de la Galantamina, la cual se basa en su capacidad antioxidante; el estudio empleó la línea celular SK-N-SH, la cual se indujo a estrés oxidativo celular utilizando H₂O₂; el tratamiento con Galantamina disminuyó el porcentaje de especies reactivas de oxígeno, previno la reducción en el potencial de membrana mitocondrial e inhibió, de forma significativa, la generación del anión nitrato [4].

En el año 2007, en la Universidad del Cauca, se evaluó el efecto citotóxico de extractos completos de cuatro especies endémicas caucanas (*Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subdentata* y *Crinum kunthianum*); se encontró una reducción estadísticamente significativa, en el porcentaje de índice mitótico de las células de sangre periférica tratadas con los extractos. Paralelamente, Cabezas y colaboradores, en la misma Universidad, aislaron y caracterizaron los alcaloides con actividad biológica presentes en las muestras vegetales, reportando en sus resultados la presencia de Galantamina [47].

En este año (2007) se habló acerca de la relación entre el sistema inmune y el sistema nervioso; el aumento de la respuesta inflamatoria en linfocitos T se correlaciona con el aumento de radicales libres en las neuronas. El estudio de esta vía de neuroinmunomodulación propone el uso de antioxidantes para el tratamientos de las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas [48].

La Universidad de Genova en Italia, en el año 2008, efectuó el test de genotoxicidad y carcinogénesis a 838 fármacos comerciales, se reportó para la Galantamina, en su presentación Reminyl, que no existía efecto carcinogénico o genotóxico. En esta valoración se utilizaron pruebas de mutación de genes bacterianos, de daño cromosomal en células de ratón y de daño cromosomal usando células hepáticas de rodeadores [49].

Durante el año 2009 se publicaron varios trabajos acerca de la capacidad antiapoptótica, anticitotóxica y antioxidante de la Galantamina. Matharu y colaboradores, escribieron sobre el efecto de la Galantamina como inhibidor de la agregación y toxicidad de la proteína beta amiloide; para el desarrollo del estudio se manejaron varias concentraciones de galantamina (25-1000 μ M) y se calculó la capacidad antiapoptótica mediante citometría de flujo, los resultados muestran una reducción significativa entre el porcentaje de células muertas tratadas y las no tratadas con el fármaco [3].

En el año 2009, Woods, J. y colaboradores, revisaron la hipótesis del ciclo celular disfuncional en las condiciones críticas del Alzheimer, con el fin de desarrollar medicamentos más eficaces. Se concluyó una capacidad neuroprotectora dependiente de la etapa del ciclo celular (G1 ó G2) en diferentes fármacos y se sugiere el uso de antioxidantes como alternativa terapéutica para el Alzheimer [50].

De la misma forma, se habló de un estrés oxidativo celular relacionado directamente con la neurodegeneración, en el mal de Alzheimer. Una revisión realizada por tres Universidades estadounidense, mencionan el roll del estrés oxidativo, la epigenética y los componentes ambientales en la etiología de la enfermedad. Se concluye, que el aumento de las especies reactivas de oxígeno al inicio de la enfermedad desencadenan la mayoría de daños celulares y genéticos en las neuronas [50]. En relación a lo anterior, Kamal y colaboradores, en el año 2009, reportan acerca de las propiedades antiinflamatorias de los inhibidores de

acetil colinesterasa, donde se plantea que la inhibición de la colina evita la respuesta inflamatoria celular; se sugiere el uso de estos fármacos para enfermedades como cáncer, esclerosis y otras patologías que involucran aumento de las especies reactivas de oxígeno [51].

McNulty y colaboradores, en el año 2009, utilizando pruebas de quimioselectividad, publicaron sobre la inhibición de la P450 3A4 por la Galantamina. Los autores proponen que el bloqueo selectivo de este grupo de enzimas en las enfermedades neurodegenerativas, impediría la generación de radicales libres producto de la activación de esta vía metabólica [23].

4. MARCO TEÓRICO

4.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL ALZHAIMER.

El Alzheimer se define como una demencia progresiva, que causa pérdida de la memoria, de las actividades cognitivas, del lenguaje y finalmente lleva a la muerte. Hoy en día, esta enfermedad se ha establecido como una de las principales causas de mortalidad en los países industrializados, generando un fuerte impacto socio-económico por la ausencia de tratamientos eficientes que garanticen una mejor calidad de vida de las personas que sufren este trastorno neurodegenerativo. La incidencia de la enfermedad es superior en la población adulta, lo cual significa que cerca del 70% de las demencias seniles son causadas por Alzheimer. Se calcula que, actualmente, cerca de 22 millones de personas presentan la patología y que en, 30 años, la frecuencia se habrá incrementado al doble. En Colombia, el 4% de la población mayor de 65 años la padece [15, 18, 20].

4.2 ENFERMEDAD DE ALZHAIMER.

4.2.1 Patología del Alzheimer. La enfermedad afecta principalmente el sistema cognitivo, se expresa con pérdida progresiva de memoria y del lenguaje, disminución en la capacidad para realizar actividades rutinarias, desorientación, dificultad para aprender cosas nuevas. El deterioro intelectual es tan fuerte que el funcionamiento social y laboral se hace imposible. El pensamiento abstracto y el juicio se afectan; se presentan episodios de apraxia, afasia y agnosia, sin razón alguna. Los pacientes sufren de cambios anatómicos como disminución del peso del cerebro y crecimiento ventricular; y cambios a nivel microscópico como pérdida de sinapsis, apoptosis neuronal, la angiopatía amiloidea y la formación de placas seniles [18, 31].

A nivel celular, el trastorno se manifiesta mediante proteólisis anormal de la proteína precursora del B amiloide (PPBA), daño en la membrana celular, reducción en el nivel de ATP intracelular y el aumento de las especies reactivas de oxígeno, en las neuronas y linfocitos que activan la respuesta inflamatoria [20, 31, 52]. En este sentido, se evidencia que son numerosas las transformaciones biológicas que se desarrollan en esta enfermedad neurodegenerativa; por tal razón, es importante limitarse solo a la recapitulación de la relación que tiene el estrés oxidativo con la fisiopatología del Alzheimer.

4.2.2 El estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer. Varios mecanismos de neurodegeneración han sido propuestos en la EA. Se cree que el estrés oxidativo, el daño mitocondrial, los procesos inflamatorios, la susceptibilidad genética, los agentes ambientales y la activación de la muerte celular programada, son factores que interactúan entre sí para generar una disfunción neuronal y celular que finaliza con la muerte. Las vías y mecanismos del estrés oxidativo en el Alzheimer han sido discutidos. En términos usuales, el estrés oxidativo se describe como un daño en células, tejidos y órganos, causado por el desbalance entre la producción de antioxidantes y radicales libres de oxígeno, este daño afecta directamente a macromoléculas que pueden promover, en el intervalo de la enfermedad, la liberación de factores de inflamación en astrocitos y linfocitos. Las especies reactivas de oxígeno comprometidas en la respuesta inflamatoria contribuyen en la patogénesis del estrés oxidativo, que además se incrementa con la edad. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, los mecanismos que dan como resultado la pérdida de la homeostasis celular son: la oxidación de lípidos, proteínas y del ADN [33].

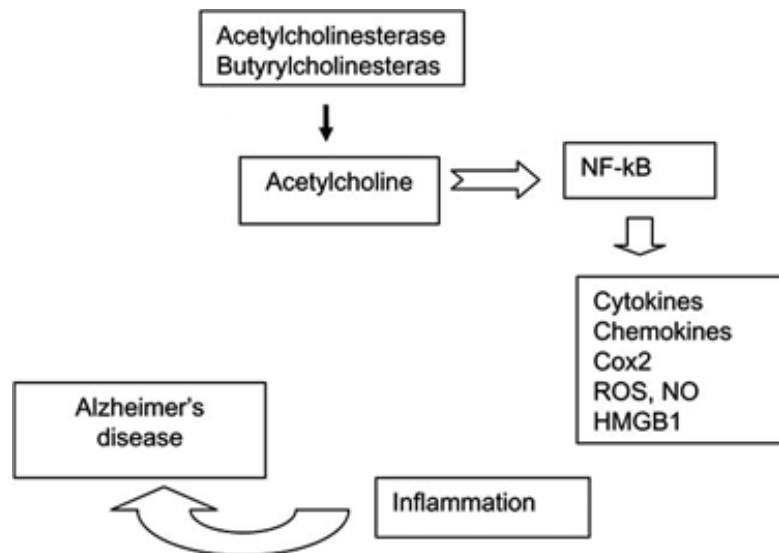
La lipoperoxidación involucra la interacción de moléculas intermediarias del metabolismo que contiene radicales libres de oxígeno con los átomos de hidrógeno de los lípidos insaturados; el aumento anormal de esta reacción en la enfermedad de Alzheimer induce un desbalance redox al interior de la célula, que se manifiesta con la oxidación de lipoproteínas de transporte, la formación de la placa amiloide y la pérdida de la sinapsis colinérgica. Entre el 40-65% de los enfermos, tienen al menos una copia del ApoE mutado, este gen normalmente codifica para la apolipoproteína E encargada del catabolismo de proteínas ricas en triglicéridos. De igual forma, un gran número de eventos neurodegenerativos son atribuidos al desequilibrio de iones a nivel celular causado por metales como Al, Fe, Cu y Zn, que intervienen en la fluidez de membrana; en consecuencia, en la actualidad, múltiples fármacos con actividad antioxidativa se están desarrollando como potenciales tratamientos para la neurodegeneración [33].

La oxidación de proteínas es considerada como un biomarcador de estrés oxidativo por el daño enzimático que se crea. La interacción del oxígeno con lipoproteínas de baja densidad LDL, es el mecanismo más importante en las enfermedades degenerativas, como esteroesclerosis, diabetes y Alzheimer; se ha relacionado la oxidación de LDL con los niveles de paroxonasa 1 en el cerebro. Igualmente, la glicación de las proteínas no enzimáticas acarrea la agregación de proteínas heterogéneas que, al unirse al receptor P-amiloide, forman ácido tiobarbitúrico y especies reactivas de oxígeno, activando la transcripción del factor

NF-KB1. La directa contribución de la reducción de azúcares y lípidos en el estrés oxidativo celular, en los trastornos neurodegenerativos, hace relevante la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas que presenten una actividad protectora frente a los radicales libres [33].

La atracción del ADN por los radicales libres, especialmente por lo Hidroxilos, produce quiebres de doble cadena, entrecruzamientos, intercambios de cromátidas hermanas y formación de aductos, que, en caso de no ser reparados, pueden cambiar secuencias genéticas y convertirse en mutaciones letales para la célula. En el Alzheimer, se ha encontrado deficiencias en el sistema de reparación de la 8-Hidroxiguanina, 5-Hidroxicisteína y 5-Hidrouracil, que, en elevadas proporciones en el ADN nuclear y mitocondrial, conducen a la variación de secuencias codificantes que activan genes proapoptóticos. Paralelamente, el potencial de membrana mitocondrial es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrogeno en la célula, así, un aumento del H₂O₂ conlleva a la expresión de moléculas que provocan la muerte celular [33].

Figura 1. Relación entre la Acetilcolinesterasa y los mecanismos de inflamación en la Enfermedad de Alzheimer [36].



4.2.3 Vías de apoptosis celular. El papel del H₂O₂ en la inducción de apoptosis por estrés oxidativo es muy importante; para entenderlo, se debe iniciar mencionando las diferentes vías de muerte celular programada, que son

mecanismos de protección del organismo frente a los múltiples agentes dañinos. La señalización de la apoptosis se ha conservado en la naturaleza, aún los nematodos siguen esta cascada de eventos. Se inicia con una activación que puede ser por dos vías, una extrínseca mediada por receptores de muerte y otra intrínseca en la que interviene la mitocondria; posteriormente, coinciden en la activación de caspasas que son las responsables de ejecutar la apoptosis [35].

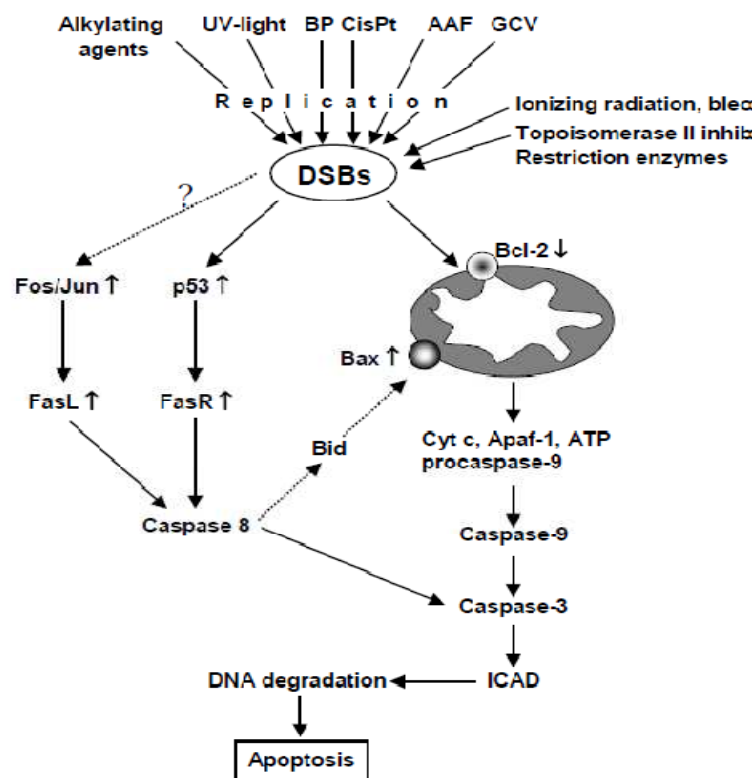
Las caspasas son proteasas que tiene un dominio N-terminal, una subunidad larga (p20) y una corta (p10); las caspasas inflamatorias son las 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14 que presentan un dominio de reclutamiento de caspasas CARD; las iniciadoras son de dos clases: las que contienen un dominio efector de muerte DED (8 -10), las que tienen un CARD (2 - 9) y las efectoras 3, 9 y 7 que se unen a las caspasas iniciadoras para la degradación de los sustratos. Aunque la proteólisis es la principal reacción que controla la activación de estas enzimas, también existen otros mecanismos como ubiquitinación y fosforilación que intervienen en su funcionamiento [35].

La vía extrínseca se activa por el factor de muerte transmembranal TNF (factor de necrosis tumoral). La gran familia de TNF abarca cerca de 20 proteínas que intervienen en la supervivencia celular. Dentro de los receptores de muerte se encuentran TNFR1 (TNF- receptor 1), Fas (Apoptosis antígeno 1) y TRAILR1 (TNF-ligando receptor inductor de apoptosis 1). Los linfocitos humanos y las neuronas, en el Alzheimer, presentan la misma vía de apoptosis ante el estrés oxidativo inducido, que empieza con la unión de Fas-L ligando a su receptor Fas, luego se reclutan las proteínas adaptadoras al dominio de muerte intracelular del receptor, la proteína que generalmente se agrega es la FADD (dominio de muerte asociado a Fas) que contiene un dominio efector de muerte que interacciona con la pro-caspasa 8 para formar DISC que activa la caspasa 8, y esta última impulsa la caspasa 3 cuando se desliga de DISC. La diferencia principal entre la vía Fas y TNFR1 radica en que la activación de Fas lleva directamente a la apoptosis, mientras que el mecanismo TNFR1 puede promover el factor de transcripción NK-kB (factor nuclear kB) que expresa moléculas de supervivencia neuronal [35].

En la vía intrínseca, la mitocondria juega un papel muy importante porque permeabiliza su membrana para la liberación de moléculas proapoptóticas ante señales que aun no son bien conocidas; en el caso de las enfermedades neurodegenerativas se cree que especies reactivas de oxígeno, exitocinas y lípidos y proteínas tóxicas pueden estimular este mecanismo. Tras la liberación del citocromo c, Smac-DIABLO, omi-HtrA2 (serina proteasa de alta temperatura), factor inductor de apoptosis AIF y la endonucleasa G, el cit-c se une a la proteína

Apaf-1 (proteasa) y a la caspasa 9 formando el apoptosoma que activa la caspasa efectora 3 [35].

Figura 2. Vías de apoptosis celular. Este grafico muestra las vías de apoptosis descritas. La vía extrínseca ocurre cuando hay un estímulo (endógeno o exógeno) del receptor de muerte Fas. La vía intrínseca es la mediada por la mitocondria, la cual libera moléculas pro-apoptóticas [53].



4.2.4 El papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS). La reducción parcial del oxígeno lleva a la formación de especies reactivas y radicales libres que se originan en cualquier compartimento celular (complejo mitocondrial, retículo endoplasmático, cloroplasto) como producto del metabolismo. Todas las ROS pueden atacar directamente a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos;

lo que conduce a un cambio en el potencial de membrana, el reciclado mitocondrial y el aumento en el NADPH. Se disminuye la producción de ATP y se crean nuevos radicales libres (por xantina oxidasa). Al reducirse la actividad glucolítica y la capacidad de la polimerasa para reparar el ADN, se bajan los niveles de NAD⁺, y se altera el estado energético de la célula. En una hora, el transporte de Ca⁺ al exterior se hace menor, afectando al citoesqueleto. También se perturba el equilibrio K⁺/Na⁺, que causa la pérdida de integridad celular (por disfunción metabólica), daños en citoesqueleto, mutaciones en el ADN y apoptosis o necrosis [9, 54].

En la formación natural del H₂O₂, intervienen generalmente enzimas que reducen el O₂. El peróxido de hidrogeno es un fuerte inductor de apoptosis, por su capacidad de permeabilizar la membrana mitocondrial y crear inestabilidad genética; se considera que esta molécula es capaz de activar cualquier vía de muerte celular [22, 55] .

4.2.5 Marcadores Moleculares de la enfermedad de Alzheimer. Existen algunos marcadores plasmáticos para la enfermedad que se relacionan directamente con el estrés oxidativo, entre los cuales estan: el aumento de interleucina 6 en linfocitos, incremento de proteína C reactiva, aumento en especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrogeno, disminución en la concentración de antioxidantes como la vitamina C, A, E y carotenoides, oxidación de lipoproteínas y aumento en la concentración de HDL. Las nuevas investigaciones se enfocan hacia el tratamiento temprano de la respuesta inflamatoria y oxidativa en el Alzheimer, con el fin de prevenir los pasos adyacentes a esta sintomatología, como es la formación de la placa amiloidea [52].

4.2.6 Tratamientos en la enfermedad de Alzheimer. La característica más relevante en el cerebro cuando se padece la EA es la pérdida neuronal colinérgica, producto del déficit en acetilcolina; igualmente otros neurotransmisores se afectan como la serotonina y la noradrenalina. La pérdida de las neuronas colinérgicas se da en proporciones distintas en el cerebro, siendo predominante en los lóbulos temporales; la patología expone así mismo, un aumento en la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), lo que genera un deterioro en la actividad colinérgica [17, 31].

Existen varias clases de tratamientos como son: drogas que modifican los cambios estructurales disminuyendo la concentración de la proteína amiloide; compuestos que controlan mecanismos hormonales; moléculas que controlan la

inflamación, partiendo del hecho de que la respuesta inflamatoria es necesaria en el metabolismo de la placa amiloide. No obstante, los tratamientos más importantes son los que modulan los sistemas neurotransmisores, especialmente la síntesis de acetilcolina (ACh). La ACh se forma a partir de la acetil-CoA presente en la mitocondria y la colina celular. La ACh es encerrada en vesículas y posteriormente se transfiere a la membrana neuronal, cuando termina la sinapsis en la despolarización, es liberada al medio sináptico para activar el receptor colinérgico postsináptico. Los medicamentos modulan este mecanismo mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), que descompone el neurotransmisor en acetato y colina. La Tacrina, el Donepecilo, Irivastigmina y la Galantamina, inhiben la acetilcolinesterasa y de esta forma ayudan a elevar los niveles de acetilcolina en las neuronas, lo que estimula a los receptores nicotínicos y muscarínicos, que mejoran la cognición [18].

En condiciones normales existen enzimas que protegen a la célula frente a los radicales libres, como la superóxido dismutasa, las catalasas y el glutatión S transferasa. Actualmente, se está probando el uso de antioxidantes como la vitamina E y la selegilina en el Alzheimer; sin embargo, existe una gran controversia sobre si los compuestos que pueden controlar el estrés oxidativo logren, además, generar cambios metabólicos que conduzcan a la neurodegeneración. Estudios recientes, tratan de establecer si la Galantamina, además de ser un colinérgico, presenta una capacidad antioxidante, lo cual potencializaría su uso hacia otras patologías que muestren un aumento del estrés oxidativo [18].

4.2.7 Mecanismos antioxidantes de los inhibidores de Acetil Colinesterasa.

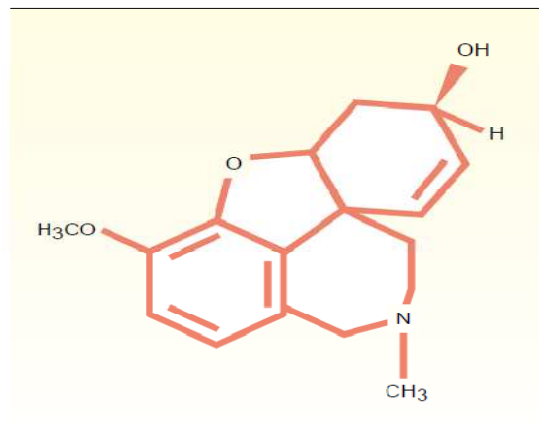
La inflamación es una respuesta localizada del sistema inmune hacia daños o lesiones tisulares que ayuda a reducir, destruir o inhibir el agente nocivo; cuando el tejido no es capaz de superar los efectos adversos se genera una inflamación crónica que acaba por atenuar el daño, en todas las enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes, este patrón de inflamación crónica esporádica se mantiene. En el Alzheimer, cambios en la respuesta inflamatoria celular genera activación neuronal mediada por las células gliales para la producción de la proteína amiloidea; se cree que la activación de la microglía y astrocitos se encuentra sujeta a la liberación de radicales libres, de óxido nítrico y enzimas proteolíticas, al medio extracelular [56].

Los linfocitos presentan un sistema colinérgico no neuronal, la acetilcolina sintetizada por los linfocitos modula la vía colinérgica y nicotínica en las neuronas,

se relaciona con la activación celular y funciona como un antiinflamatorio promoviendo la entrada de calcio a la célula [56].

Los inhibidores de acetil colinesterasa, como Galantamina, actúan a nivel de neuronas y células sanguíneas; se ha reportado que algunos de estos fármacos, en ensayos *in vitro*, pueden inhibir la proliferación en linfocitos; sin embargo, se cree que el mantener los niveles de la acetilcolina en la célula, activa la expresión de antígenos lo que produciría su capacidad antiapoptótica. Este neurotransmisor igualmente modula la expresión de factor-kappa B NF-kB, que es ampliamente utilizado por las células eucariotas como regulador de los genes que controlan la proliferación celular y la supervivencia celular. Por otro lado, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa disminuye la producción de citocinas, controlando la segregación de moléculas de inflamación [56].

Figura 3. Estructura de la Galantamina [57].



La Galantamina ($C_{17}H_{21}NO_3$), presenta una masa molar 287.354 g/moles, un pKa: 8,2 y una biodisponibilidad del 80%. Es un alcaloide terciario, que actúa como un inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la acetilcolinesterasa.

La Galantamina es un alcaloide terciario, que se aisló en 1952 del bulbo de *Galanthus woronowii*. Debido a su efecto anticolinesterásico, fue usada al comienzo como anestésico general. Posteriormente, fue aislada de otras plantas de la familia Amerylleacea y hoy en día, se obtiene mediante síntesis de laboratorio. La Galantamina, en su forma comercial Reminyl, es de origen sintético, es totalmente soluble en agua a pH=6, es ligeramente lipofílica, con una

biodisponibilidad del 80%, el porcentaje de unión a proteínas es del 18%, es metabolizada por el citocromo P450 y posee una vida media de 7 horas [58].

4.3 LINFOCITOS COMO MODELO BIOLÓGICO.

El uso de linfocitos humanos como modelo para evaluación citotóxica se debe a la facultad de mostrar de forma cuantificable los cambios generados por la exposición al xenobiótico. La gran capacidad de predicción de los efectos agudos inducidos por un agente externo, en condiciones *"in vitro"*, hace a este modelo biológico ideal en la evaluación y producción de medicamentos.

Así mismo, es conveniente el manejo de esta población celular por la estrecha similitud celular y bioquímica entre linfocitos y neuronas. Son células postmitóticas en fase Go, comparten vías moleculares que se creían eran únicas de las neuronas, como son los sistemas: dopaminérgico, serotoninérgico, acetilcolinérgico, glutamatergico, noradrenérgico, gabaérgico, señalización de calcio, transporte y almacenamiento del hierro, señalización de muerte y supervivencia [46].

Por otro lado, la respuesta inflamatoria mediada por los linfocitos, se define como la interacción de mecanismos complejos que se originan para la neutralización de patógenos, reparar los tejidos e incitar la curación de lesiones; se caracteriza por el aumento en la concentración de proteínas en la fase aguda y la segregación de citocinas proinflamatorias. De la misma forma, el sistema nervioso es capaz de liberar citocinas como ruta moduladora de la inflamación. La comunicación entre estos dos sistemas se puede hacer mediante tres formas: la vagal, la simpática y la colinérgica. Esta última vía, como se expuso anteriormente, es la que se ve afectada en la enfermedad de Alzheimer. Las concentraciones de acetil colina, son las que dirigen la respuesta entre las células que liberan las citocinas (linfocitos) y las neuronas, los receptores nicotínicos y muscarínicos, en las células cerebrales, reciben la señal inflamatoria y ordenan la inhibición de la inflamación. En los estados finales del Alzheimer, se incrementa la inflamación cerebral y la respuesta neuroendocrinoimmunológica se torna deficiente [2].

Por último, la vía extrínseca de apoptosis se activa esencialmente en situaciones patológicas en las que la inflamación es sobresaliente, tanto en linfocitos como en neuronas, generando un desequilibrio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Por tal razón, en este momento, se están valorando fármacos dirigidos a esta ruta de muerte celular. En este sentido, la evaluación de la

Galantamina en linfocitos humanos significaría un acercamiento al mecanismo molecular del medicamento, e indicaría si este medicamento es capaz de ayudar a la supervivencia neuronal interactuando con el mecanismo extrínseco de apoptosis [18].

4.4 ENSAYOS PARA DETERMINAR EL EFECTO CITOTOXICO Y PROTECTOR DE LA GALANTAMINA.

El ensayo *in vitro* presenta varias ventajas como el control interno de variables, el tiempo de duración y la capacidad de reproducción, con lo cual se puede inferir de forma clara y cuantificable el efecto de la variable independiente en el estudio. Las pruebas citotóxicas pertenecen a esta clase de ensayos, con la capacidad de determinar, a través de cambios en los mecanismos celulares establecidos, los efectos de interferencia en la estructura y/o función celular, como la integridad de la membrana, estados del metabolismo, regulación iónica y división celular [59].

Según Arrebola, D. y colaboradores, en el año 2005, “La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas” [59]. Dentro de los ensayos más utilizados y validados se encuentran las pruebas de índice mitótico y viabilidad celular con azul de trypan. La evaluación de estos biomarcadores permiten la fácil detección de células en mitosis y muertas, respectivamente, permitiendo de esta manera la valoración del efecto del exógeno en la reproducción y supervivencia celular.

La prueba de IM se ha establecido como un biomarcador de citotoxicidad. Este ensayo logra proporcionar información acerca de compuestos con actividad citotóxica o “citostática”, los cuales pueden bloquear el ciclo de división celular a través de daños a la célula o al material genético [60]. Aquellas sustancias que son capaces de bloquear el ensamble de fibras del huso, pueden disminuir el número de mitosis en el ensayo y así evidenciar la acción del químico.

El IM es la proporción o porcentaje de células que se hallan en división celular. Se calcula dividiendo el número de células en mitosis entre el total de células analizadas. En este sentido, si la sustancia a evaluar presenta un efecto

bloqueador pre mitótico, disminuirá el IM de las células considerablemente, respecto al grupo control (tratado con el solvente puro). En el caso contrario (bloqueador en mitosis), se incrementará el número de mitosis proporcionalmente a la concentración.

La prueba de viabilidad celular con azul de trypan, muestra daños de membrana celular, ante la acción de un agente citotóxico. En este sentido, el ensayo permite identificar la proporción de células en mitosis ocasionadas por el agente. Las variaciones en el porcentaje de viabilidad celular hacen referencia a un deterioro de la permeabilidad membranal que genera la muerte celular. “Bajo dicha perspectiva, el parámetro de evaluación de viabilidad celular confirma la probabilidad que tiene una población celular de reparar un daño y/o sobrevivir con él” [10].

Numerosos estudios han utilizado el peróxido de Hidrogeno como inductor de muerte celular [8, 46] (que se puede determinar mediante la prueba de viabilidad celular) dada la capacidad de pasar a través de la membrana celular y generar especies reactivas de oxígeno muy dañinas, como los Hidroxilos. En condiciones normales, la célula genera peróxido a través de la reducción del oxígeno ($2 e^- + O_2 + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$), con el fin de desactivar algunos radicales; por ejemplo, la superóxido dismutasa es capaz de neutralizar el superóxido con la siguiente reacción: $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Sin embargo, cuando se presenta el desequilibrio entre ROS y antioxidantes, el peróxido comienza a interactuar con lípidos de membrana y macromoléculas como el ADN, desencadenando los procesos apoptóticos [61].

En el 2010, Sarmiento, B. y M. Torres [10], determinaron, en el laboratorio de Toxicología genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, que el H_2O_2 , a una concentración de $1\mu M$, induce apoptosis al 80% de los linfocitos humanos cultivados *in vitro*. Partiendo de esta concentración estandarizada, la prueba de viabilidad celular con azul de Trypan, representa una medida indirecta de muerte celular programada, ya que este ensayo permite la discriminación entre células muertas y vivas, después de un tratamiento. En esta prueba de exclusión, el colorante, que es un coloide, se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana [31], las células que se encuentran en apoptosis o necrosis se colorean de azul y las viables permanecen intactas. En consecuencia, si una sustancia (eje. Galantamina) inhibe el efecto apoptótico del H_2O_2 , el porcentaje de células muertas debe disminuir con respecto a las no tratadas con el compuesto.

5. HIPÓTESIS

Si la exposición a Galantamina a diferentes concentraciones (alta, media, y baja) presenta actividad protectora frente al daño oxidativo inducido con H_2O_2 , en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, se espera que el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas con Galantamina antes, durante y después del tratamiento con H_2O_2 , sea mayor frente a las células no tratadas, de lo contrario el porcentaje de viabilidad celular será igual o incluso menor a los no tratadas.

6. OBJETIVOS

Determinar el efecto citotóxico y protector de la Galantamina frente a daño oxidativo inducido con H_2O_2 , en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante las pruebas de Índice Mitótico y viabilidad celular con azul de Trypan respectivamente.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Identificar el efecto citotóxico de la Galantamina mediante la prueba de índice mitótico, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

Determinar el efecto antioxidante de la Galantamina mediante las prueba de viabilidad celular con azul de *Trypan* y microscopia óptica.

7. METODOLOGÍA

En este trabajo se evaluó la capacidad protectora de la Galantamina frente al daño oxidativo inducido con H_2O_2 , en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. El estudio determinó el efecto citotóxico de la Galantamina mediante las pruebas de Índice Mitótico y se valoró el efecto combinado del H_2O_2 (inductor del daño celular) y de la Galantamina (protector contra el daño) mediante la prueba de Viabilidad Celular, con Azul de Trypan.

Es un estudio experimental, *in vitro*, de clase comparativo o prueba de hipótesis (asociación causa-efecto). Se empleó un diseño con bloques aleatorizados. El bloque es cada experimento el cual se repitió al menos tres veces, en semanas consecutivas y distintas. Dentro de cada experimento (bloque) se aplicaron los tratamientos por duplicado.

7.1 EFECTO CITOTÓXICO DE LA GALANTAMINA.

El efecto citotóxico de la Galantamina, se determinó mediante la prueba de Índice Mitótico (IM) [62], con el fin de establecer las concentraciones: alta, media y baja del compuesto, que fueron utilizadas en la prueba de viabilidad celular, con azul de Trypan [61]. Las concentraciones experimentales se encontraron a partir de una dilución seriada, usando un factor de $\frac{1}{2}$. Se inició con 5 ml de una solución acuosa de la Galantamina 4000 μM , de la cual se tomaron 2.5 ml y se completó con 2.5 ml de H_2O destilada, para obtener 5 ml de una segunda mezcla que presenta la mitad de la concentración que la original. Repitiendo el anterior procedimiento, se realizaron siete soluciones más, con concentraciones de 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.2; μM . Los cultivos de linfocitos se trataron con 0.1 ml de cada una de las ocho soluciones de trabajo, con concentraciones finales en el medio de 80; 40; 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625 μM . Las ocho soluciones de trabajo se evaluaron en linfocitos humanos cultivados *in vitro* [62].

7.1.1 Siembra de linfocitos humanos para la prueba de Índice Mitótico. Se tomaron 15 ml de sangre periférica por venopunción, con jeringas heparinizadas, de un donador de sexo femenino, saludable de 21 años de edad, que no consume drogas psicoactivas, no fuma y no consume bebidas alcohólicas, frecuentemente. La siembra de los linfocitos humanos se realizó en cámara de flujo laminar, manteniendo todas las normas de esterilidad, utilizando tubos falcón de 15ml, con

4,5 ml de medio RPMI 1640 pH a 7.2 ± 0.2 (R-8758 Sigma), suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (16000-044 Invitrogen), Penicilina-Streptomocina al 1% (A-5955 Sigma), Fitohemaglutinina al 2%, L-glutamina al 1% (G-3126 Sigma) y 0,5ml de sangre periférica. El volumen final del cultivo fue de 5 ml y se incubó a 37 °C, en atmosfera húmeda, durante 48 horas.

7.1.2 Cosecha de linfocitos humanos. A las 48 horas después de iniciado el cultivo, la muestra se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, se removió el sobrenadante cuidando de no dañar el botón y se suspendió suavemente. Al precipitado celular se le agregó 6 ml de solución hipotónica (KCL 0.075M) y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo, se agregó 2 ml de fijador Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético), luego se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se adicionó 5 ml de fijador y se refrigeraron los cultivos durante 20 minutos, una vez descartado el sobrenadante se repitió el proceso de fijación dos veces más. Después de la tercera fijación, se gotearon las placas y el extendido celular se dejó secar en la plancha a 65°C. Pasados 3 días, se hizo la tinción con Giemsa al 10%. Finalmente, se leyó (en el microscopio óptico) las preparaciones citogenéticas para la determinación del Índice Mitótico (IM).

7.2 PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR CON AZUL DE TRYPAN.

Para determinar la viabilidad celular de los linfocitos humanos, inducidos a apoptosis con peróxido de hidrogeno, se utilizó la prueba de exclusión de azul de Trypan [61].

7.2.1 Extracción y siembra de células mononucleares. Manteniendo las condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar (Flo-w 120v), se adicionaron 7 ml de histopaque (sigma 107-1) a un tubo Falcon de 15ml. A continuación, se agregaron suavemente 7 ml de sangre periférica (extraída por venopunción) y se centrifugó la mezcla a 2600 rpm por 30 minutos (Sorvall Deutont mod. T600). Utilizando una pipeta pasteur (Fisher13-678-6C), se extrajo la capa de células mononucleares (linfocitos y monocitos), que están ubicadas entre el plasma sanguíneo y el histopaque. El preparado celular se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml, que contenía previamente 7 ml de PBS (Sigma P3813) estéril y nuevamente se centrifugó, a 1200 rpm por 12 minutos.

Posteriormente se descartó el sobrenadante y se realizó otro lavado empleando 3,5 ml de PBS (con iguales condiciones de centrifugación). Se tomó 10 µl del

precipitado celular y se mezcló con 10 μ l de azul de Trypan (Sigma T 6146). La suspensión se llevó al hemocitómetro para el recuento de células viables (claras) y células muertas (azules) (el porcentaje de viabilidad celular fue mayor al 95%).

El volumen antes calculado, que generalmente se encontraba entre 7 y 10 μ l y contenía 150000 células/ microlitro, se transfirió a un eppendorf de 2 ml (*GIBCO LC1010*), se complementó con 0,48 ml (485 μ l) de medio RPMI 1640 y finalmente se agregaron 15 μ l de PHA (Sigma L8754-56; concentración final en el medio 2%), para obtener un volumen final de 0,5 ml (500 μ l) por cada microcultivo.

7.3 Tratamientos. El tratamiento de los cultivos, una vez sembrados los linfocitos, fue en cámara de flujo laminar, manteniendo las condiciones de esterilidad. Se adicionó a cada microcultivo de 500 μ l, un volumen de 10 μ l de las concentraciones: alta, media, baja de la Galantamina y de los controles negativo y positivo (agua estéril y H₂O₂ respectivamente). Se sometieron a evaluación tres modalidades de tratamiento, así:

7.3.1 Pre-tratamiento con Galantamina. A las 24 horas después de la siembra, los cultivos se trataron con las concentraciones alta, media y baja de la Galantamina y el control negativo con agua estéril. 24 horas después del tratamiento con Galantamina, se indujo a daño celular (muerte por apoptosis) con H₂O₂ 1 μ M; la cosecha se realizó 72 horas después de la siembra.

7.3.2 Tratamiento simultaneo con Galantamina y H₂O₂. El tratamiento simultaneo con las concentraciones alta, media y baja de Galantamina, el control negativo y el H₂O₂ (1 μ M), fue a las 48 horas después de la siembra.

7.3.3 Post-tratamiento con Galantamina. El H₂O₂ (1 μ M) se aplicó a las 48 horas después de la siembra. Las concentraciones alta, media y baja de Galantamina, junto al control negativo, se agregaron después de 8 horas de haber tratado los cultivos con el inductor del daño (H₂O₂), es decir a las 56 horas después de la siembra.

7.3.4. Cosecha del cultivo celular. Transcurridas 72 horas después de la siembra, los microcultivos se centrifugaron a 1200 rpm por 12 minutos en microcentrifuga (Centrifuge 5415D para eppendorf); se descartó el sobrenadante y se adicionó, a cada microcultivo, 400 μ l de medio simple [62]. De cada

suspensión celular final, se extrajo 10 μ l de solución y se mezcló con 10 μ l de azul de Trypan al 4% (Sigma T 6146). La viabilidad celular se leyó empleando el hemocitómetro (o cámara de recuento celular Neubeauer) y el microscopio óptico (NIKON Y-S2-T2), con el objetivo 40X.

Para la lectura del IM y de viabilidad celular se realizó previa codificación de las placas (ciego), con el fin de evitar sesgos en el análisis.

7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Como los datos del Índice Mitótico (%) y de viabilidad celular, se ajustaron a la distribución normal (*Kolmogorov-Smirnov: $p > 0,15$*), la comparación de los promedios de IM, entre los cinco tratamientos, se hizo mediante la prueba paramétrica *Análisis de Varianza Factorial (Anova)*, que permite, además determinar si existe una interacción entre los tratamientos (concentraciones de Galantamina) y los diferentes tiempos (pre-tratamiento, simultaneo y pos-tratamiento) en que se hicieron las repeticiones. Igualmente, se evaluó el tipo de asociación entre cada uno de los biomarcadores del estudio (índice mitótico y viabilidad celular), y las concentraciones reales de la Galantamina, utilizando el análisis de correlación de Pearson y curva de mejor ajuste.

8. RESULTADOS

8.1 SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE LA GALANTAMINA.

Para identificar las tres concentraciones (alta, media y baja) de Galantamina empleadas en el ensayo de citotoxicidad, se efectuó un ensayo preliminar de Índice Mitótico, utilizando ocho concentraciones del compuesto: 80 μM ; 40 μM ; 20 μM ; 10 μM ; 5 μM ; 2.5 μM ; 1.25 μM y 0.625 μM (concentraciones finales en el medio).

Mediante la prueba no paramétrica de Spearman, se identificó una asociación negativa no lineal, significativa estadísticamente ($p=0,08$). Mediante el análisis de curva de mejor ajuste, se logró identificar que la asociación es de tipo cuadrática, que se describe con la ecuación:

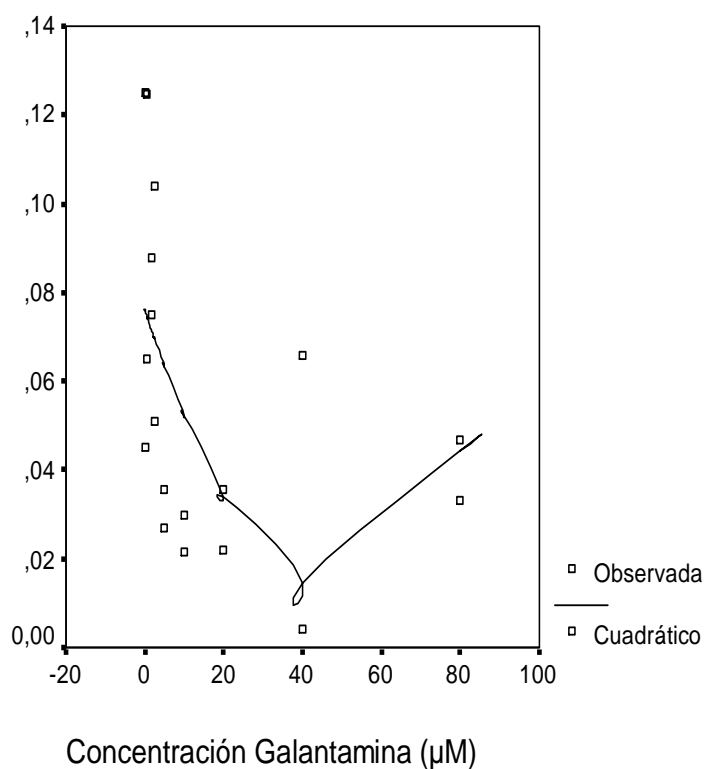
$$\text{IM (\%)} = 0,574 - 0,0036 (\mu\text{M Galantamina}) + 0,0001 (\mu\text{M Galantamina})^2$$

El coeficiente de determinación ($R=0,085$), permite concluir que el porcentaje de viabilidad celular depende en un 86% de la variación en la concentración de Galantamina.

A través de este análisis, se estableció una asociación lineal negativa entre el IM y las seis concentraciones más bajas de Galantamina (20 μM ; 10 μM ; 5 μM ; 2.5 μM ; 1.25 μM y 0.625 μM) (ver figura 4), entre las cuales se escogieron las tres concentraciones: alta, media y baja (20 μM ; 2.5 μM y 0.625 μM), cumpliendo con el siguiente criterio: la concentración alta disminuye el IM en un 80% respecto al control negativo, la concentración media reduce el IM en un 50% respecto al control negativo, y en la concentración baja, el IM es semejante al control negativo.

Figura 4. Efecto de la Galantamina sobre el promedio de IM en linfocitos humanos de sangre periférica.

Índice Mítico



Se estableció una asociación lineal negativa entre el IM y las seis concentraciones más bajas de Galantamina (20 μM ; 10 μM ; 5 μM ; 2.5 μM ; 1.25 μM y 0.625 μM), entre las cuales se escogieron las tres concentraciones: alta, media y baja (20 μM ; 2.5 μM y 0.625 μM).

8.2 ÍNDICE MITOTÍCO.

En la tabla 1 se reportan los promedios de IM registrados en n repeticiones del experimento, junto a las medidas de variabilidad, de cada uno de los tratamientos (control negativo, control positivo y concentraciones de Galantamina), que fueron utilizados en la prueba de viabilidad celular.

Tabla 1. Efecto de la Galantamina sobre el Porcentaje promedio de IM, en linfocitos humanos de sangre periférica, n= 4.

| Concentraciones de Galantamina | Modalidades de tratamiento con Galantamina | | | Total |
|--|--|--------------|-----------------|----------------|
| | Pre tratamiento | Simultaneo | Pos tratamiento | |
| Control (H ₂ O ó 0 µM) | 92 ± 0,01 * | 91 ± 0,008 * | 90 ± 0,02 * | 90 ± 0,01(8) * |
| Baja (20 µM) | 86 ± 0,03 * | 85 ± 0,006 * | 83 ± 0,03 * | 84 ± 0,02(8) * |
| Media (2,5 µM) | 73 ± 0,02 * | 74 ± 0,03 * | 74 ± 0,001 * | 74 ± 0,01(8) * |
| Alta (0,625 µM) | 64 ± 0,04 | 59 ± 0,04 | 54 ± 0,02 | 59 ± 0,3(8) |
| Peróxido (100 mM) | 59 ± 0,09 | 63 ± 0,08 | 60 ± 0,07 | 61 ± 0,8(8) |
| P=<0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| P= <i>Valor de significancia entre las tres modalidades de tratamiento</i> | >0,001 | | | 0,731 |

n = Tamaño de muestra (repeticiones). 2000 células analizadas por repetición.

** Concentraciones de Galantamina para las cuales el IM difiere significativamente respecto al control positivo, determinado mediante la prueba HDS de Tukey para varianzas homogéneas.*

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba Anova.

Los datos de IM (%) se ajustan a la distribución normal (Kolmogorov-Smirov: $p=0,15$). Por lo tanto, el análisis comparativo de prueba de hipótesis, se hizo mediante el análisis de varianzas, complementado con la prueba HDS de Tukey para varianzas homogéneas.

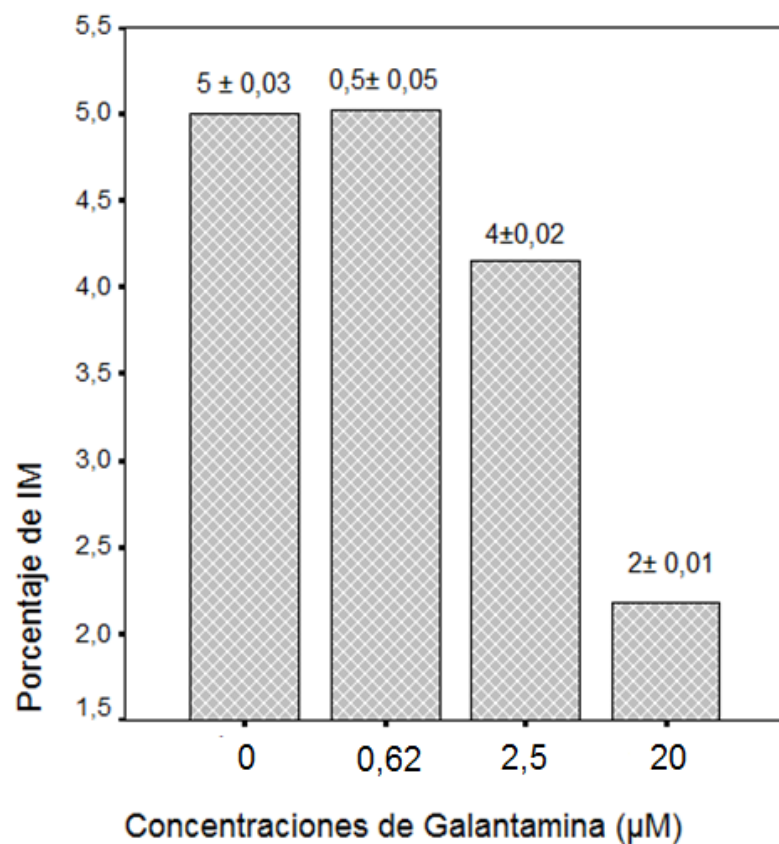
Se identificó diferencia significativa estadísticamente ($p=0,03$), entre los promedios de IM de los distintos tratamientos (dosis alta, media, baja de Galantamina, control negativo y positivo).

Mediante la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey para varianzas homogéneas, se logro establecer que:

Las concentraciones de Galantamina, cuyos promedios de IM difieren significativamente del promedio de Índice Mitótico del control negativo (Agua), fueron: la concentración alta (20 µM) con un IM de $2\% \pm 0,01\%$ y, la concentración media (2,5 µM), con un IM de $4\% \pm 0,02\%$ ($p = 0,01$ y $p = 0,02$, respectivamente). En consecuencia, se concluye que la concentración alta y media de Galantamina, presentan un efecto citotóxico, que reduce el índice Mitótico alrededor de un 60% y un 20% respectivamente, respecto al control negativo (agua); (ver figura 5).

La concentración baja de Galantamina (0,62 μM), no difiere significativamente ($p = 0,57$), del control negativo. Sin embargo, respecto al control positivo, se encontró una diferencia significativa ($p = 0,012$), por lo tanto, se concluye que la concentración baja de Galantamina no presenta efecto citotóxico como se observa en la figura 5.

Figura 5. Efecto de la Galantamina sobre el promedio de IM, en linfocitos humanos de sangre periférica.



Las concentraciones de Galantamina, cuyos promedios de IM difieren del promedio de Índice Mitótico del control negativo (Agua), fueron: la concentración alta (20 μM) con un IM de $2\% \pm 0,01\%$ y, la concentración media (2,5 μM), con un IM de $4\% \pm 0,02\%$.

8.3 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes promedios de viabilidad celular, con sus respectivas medidas de variabilidad, de cada uno de los tratamientos (control negativo, control positivo y concentraciones de la Galantamina), que se determinaron mediante n repeticiones del experimento.

Tabla 2. Efecto de la Galantamina sobre el Porcentaje de viabilidad celular, en linfocitos humanos de sangre periférica, n= 8.

| Concentraciones Galantamina | Promedio de Viabilidad celular (%) \pm Error Estándar (n) |
|--|---|
| Control (H ₂ O ó 0 μ M) | 90 \pm 0,01(8) |
| Baja (20 μ M) | 84 \pm 0,02(8) * |
| Media (2,5 μ M) | 74 \pm 0,01(8) * |
| Alta (0,625 μ M) | 59 \pm 0,3(8) |
| Peróxido (100 mM) | 61 \pm 0,8(8) |

P<0,001

n = Tamaño de muestra (repeticiones). 2000 células analizadas por repetición.

** Concentraciones de Galantamina para las cuales el porcentaje de viabilidad celular difiere significativamente respecto al inductor de daño celular (100mM), determinado mediante la prueba de HSD de Tukey para varianzas homogéneas.*

p = Nivel de significancia calculado mediante la prueba Anova.

Los datos registrados en el ensayo de viabilidad celular, se ajustan a la distribución normal (kolmogorov-smirov $p=0,5$), por lo tanto el análisis comparativo o prueba de hipótesis se realizó mediante análisis de varianzas.

Mediante la prueba Anova Factorial se identificó una diferencia significativa estadísticamente ($p=0,00$), entre los cuatro tratamientos; pero no se encontró diferencia significativa ($p=0,726$), entre los tiempos de tratamiento (Pretratamiento, simultaneo y Postratamiento).

Mediante la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey, para varianzas homogéneas, se estableció que:

Los tratamientos que difieren significativamente ($p=0,00$, $p=0,00$), del inductor de daño celular son: las concentraciones baja (0,06 μ M) y media (2,5 μ M), cuyos porcentajes de viabilidad celular son del 84% y 74% respectivamente. En estas concentraciones, los porcentajes de viabilidad celular son significativamente mayores que el observado en el tratamiento con peróxido de hidrogeno. Lo que significa que las concentraciones baja y media de Galantamina, presentan un

efecto protector al disminuir la citotóxicidad del peróxido de hidrogeno en un 23% y 12%, respectivamente.

La viabilidad celular (59%) correspondiente a la concentración alta de Galantamina (20 μM), no difiere significativamente ($p=0,59$), del porcentaje de viabilidad del inductor de daño celular (H_2O_2 100 mM); por lo cual, se concluye que la dosis alta del alcaloide no presenta un efecto protector frente a daño celular inducido con el peróxido de hidrogeno.

Mediante la prueba de asociación de Pearson, se identificó una relación lineal negativa ($p=0,014$), mostrando un efecto dosis-respuesta; en el cual, un aumento en la concentración de Galantamina disminuye la viabilidad celular de los linfocitos.

En la figura 6 se muestra la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($p=0,00$), que describe la relación cuadrática entre la concentración de Galantamina y el porcentaje de viabilidad celular.

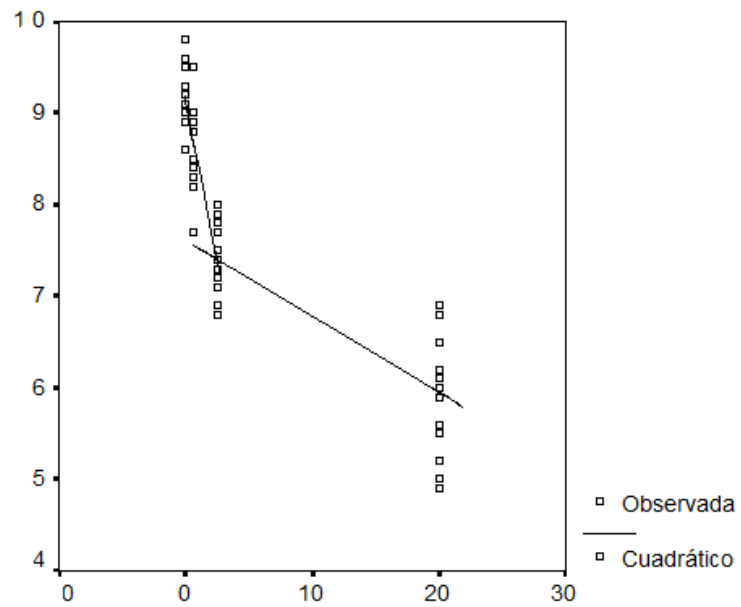
La relación de tipo cuadrática de las concentraciones de Galantamina se describe con la ecuación:

$$\text{IM (\%)} = 0,04 + 0,049 (\mu\text{M Galantamina}) + 0,0002 (\mu\text{M Galantamina})^2$$

El coeficiente de determinación ($R=0,82$), permite concluir que el porcentaje de viabilidad celular depende en un 82% de la variación en la concentración de Galantamina.

Figura 6. Efecto de la concentración alta, media y baja de Galantamina sobre el porcentaje de viabilidad celular en linfocitos humanos de sangre periférica.

Porcentaje de Viabilidad Celular



Concentraciones Reales de Galantamina

En la figura se muestra la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($p=0,00$), que describe la relación cuadrática entre la concentración de Galantamina y el porcentaje de viabilidad celular. La dosis alta de Galantamina difiere significativamente con respecto al control negativo (agua).

9. DISCUSIÓN

9.1 CITOTOXICIDAD DE LA GALANTAMINA.

La prueba de Índice Mitótico, muestra que la concentración alta (20 μM) de Galantamina presenta el mayor efecto citotóxico con respecto a los otros dos tratamientos. Esta capacidad citotóxica se puede relacionar con los grupos hidroxilos libres presentes en los anillos aromáticos de la Galantamina, los cuales, en concentraciones elevadas, pueden generar un daño celular al interactuar con macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleícos [35].

9.1.1 Efecto dosis-respuesta de la Galantamina. El ensayo citotóxico evidenció una asociación negativa entre el IM y las concentraciones de Galantamina (20 μM ; 2.5 μM y 0.625 μM), lo que significa que el índice mitótico disminuye con el aumento de la concentración del alcaloide.

McNulty, J. y colaboradores, en el año 2009 [63], al evaluar la citotoxicidad de los alcaloides representativos de la familia Amarillidacea (Galantamina, licorina y crinamina) en células Jurkat, encontraron que las concentraciones de Galantamina, entre 2 y 5 μM , presentaban un porcentaje de apoptosis del 76 y 90% respectivamente. Los autores aseguran que existe una quimio-selectividad entre el anillo que tiene el grupo hidroxil-alílico con macromoléculas funcionales; se cree que esta capacidad de inducir muerte celular en células cancerígenas de mamíferos, se debe a la activación de la caspasa 3 [64], lo cual se considera una propiedad de los alcaloides pertenecientes a esta familia. Jiménez y colaboradores, en el año 1976, proponen que la inhibición de la división celular corresponde a la facultad de inhibir la síntesis de ARN y proteínas [65, 66]. Igualmente, Li, W. en el año 2009, sugiere una relación entre el aumento de la sobrevivencia en ratas con cáncer linfático y el tratamiento con inhibidores de acetil colinesterasa, como la Galantamina, ya que son capaces de bloquear receptores aniónicos colinérgicos en células inmunes, lo cual puede influir indirectamente en la liberación de interleucinas (III IL-3) responsables de la señal de sobrevivencia en linfocitos [67].

Husson, publicó en el año 1995 [68], que el extracto de *Haemanthus albidiflorus* (especie perteneciente a la familia Amarilliaceae), en una concentración de 0,02 μM reduce en un 20% el IM, en células linfoides.

El estudio de efecto de las concentraciones celulares y moleculares de los inhibidores de acetil colinesterasa, como la Galantamina, mostró una supresión en la proliferación de linfocitos y en la expresión de moléculas inflamatorias. Los resultados sugieren que los inhibidores de acetil colinesterasa acrecientan la concentración extracelular de acetil colina disminuyendo el estrés oxidativo e inhiben señales *in vitro* de proliferación [69]. La fitohemaglutinina, mitogeno que activa los linfocitos T, incrementa la expresión de ARNm que expresa colina. Los inhibidores de acetil colinesterasa, como la Galantamina, igualmente contribuyen al aumento de la cantidad de colina, lo que significa que, en ensayos *in vitro*, esta interacción (aumento de la concentración extracelular de colina) puede generar efectos tóxicos en la célula, como liberación de citocinas [70].

El efecto dosis-respuesta dependiente, puede hacer referencia a una capacidad protectora de la Galantamina que involucra un arresto del ciclo celular en la fase S, como mecanismos de protección de expresión génica desfavorable o al aumento en la concentración de hidroxilos libres y colina, que causan daños que pueden detener el ciclo celular.

9.1.2 Efecto de la Galantamina sobre el índice Mitótico. La concentración alta de la Galantamina (20 μM), disminuyó en un 60% el IM respecto del control negativo, lo que evidencia un daño pre mitótico, que puede presentarse en las fases G_0 a G_1 , ó en la fase de síntesis.

La dosis alta fue la concentración con mayor efecto citotóxico, al reducir el índice mitótico y presentar un porcentaje de viabilidad celular cercano al 65%, semejante al registrado para el control positivo (H_2O_2 1 μM), demostrando un bloqueo premitótico del ciclo celular, posiblemente por muerte celular programada. Este comportamiento en la viabilidad celular, puede hacer referencia a una vía de muerte inducida como respuesta al daño celular [53].

9.1.3. Peróxido de hidrogeno como inductor de daño celular. En condiciones celulares normales, el oxígeno se encuentra en su forma más estable O_2 , la cual es poco reactiva, con una velocidad de reacción baja a temperatura fisiológica. Sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio entre las concentraciones de moléculas pro-oxidantes y de antioxidantes, se genera un daño celular, que es el resultado de la interacción de macromoléculas como el ADN, con especies químicas de oxígeno que presentan un electrón desapareado y una configuración espacial de alta inestabilidad [71].

El H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno que tiene una vida media corta y es altamente soluble; el producto de su disociación en fase acuosa, son los iones hidroxilos y superóxidos; radicales energéticos capaces de romper enlaces y generar daño celular [71].

El peróxido de hidrógeno es capaz de alterar la permeabilidad de la membrana celular mediante peroxidación lipídica, lo que conduce a muerte celular por pérdida de la integridad de membrana [71].

La atracción del ADN por especies reactivas como el peróxido, produce quiebres de doble cadena, entrecruzamientos, intercambios de cromátidas hermanas y formación de aductos, que, en caso de no ser reparados, pueden cambiar secuencias genéticas y convertirse en mutaciones letales para la célula. Daños como la 8-Hidroxiguanina, 5-Hidroxicisteína y 5-Hidouracil, en elevadas proporciones en el ADN nuclear y mitocondrial, conducen a la variación de secuencias codificantes que activan genes pro-apoptóticos. El potencial de membrana mitocondrial es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno en la célula; así, un aumento del H_2O_2 conlleva a la expresión de moléculas que provocan la muerte celular programada [33].

Numerosas investigaciones han utilizado el peróxido de hidrógeno como inductor de muerte celular [72-77]. El daño de permeabilidad que se genera a nivel de la membrana celular y mitocondrial, promueve la liberación de proteínas pro-apoptóticas y citocromo que activa la caspasa 3, iniciando la vía intrínseca de apoptosis [75]. La muerte celular programada inducida por peróxido de hidrógeno, juega un papel fundamental en la evaluación *in vitro* de compuestos con capacidad antiapoptótica, ya que estimula, en diferentes líneas celulares, la activación del gen p53, el cual dirige este mecanismo de muerte [77].

Ezoulin y colaboradores, en el año 2008 [78], evaluaron la capacidad antioxidante de la Galantamina, frente a daño neuronal generado por peróxido de hidrógeno ($1\mu g/ml$). Encontraron que a esta concentración de peróxido, existe un aumento significativo de especies reactivas de oxígeno (35%), especialmente del ion superóxido (25%), que genera un cambio en la permeabilidad de membrana mitocondrial. Weinreb y colaboradores, en el año 2009, investigaron la citotoxicidad del H_2O_2 ($150\mu M$) en células neuronales, observando una reducción de la viabilidad celular cercana al 45%. Shi, H. y colaboradores, en el año 2009

[79], publicaron que H_2O_2 (200 μM) induce apoptosis en un 50%, en células linfoides de rata.

Hampton y colaboradores, en el año 1997 [80], afirman que concentraciones de peróxido de hidrogeno cercanas a 50 μM , inducen a muerte celular programada de los linfocitos T y células linfoides, por la activación de caspasas. La activación de la vía extrínseca de apoptosis, se encuentra mediada por la interacción del receptor de muerte Fas con especies reactivas de oxígeno. En concentraciones altas el H_2O_2 puede generar necrosis en las células.

Sarmiento, B. y M. Torres, en el año 2010 [10], determinaron, en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, que el H_2O_2 , a una concentración de 1 μM , conduce a los linfocitos humanos cultivados *in vitro* a apoptosis, en un 50%.

El aumento de la concentración extracelular del peróxido de hidrogeno en los linfocitos cultivados *in vitro*, causa la activación de receptores de muerte membranales (NTF y Fas); esta selectividad por la apoptosis, obedece a la naturaleza de la línea celular, en la cual, la activación de linfocitos T de defensa, esta mediada por especies reactivas de oxígeno [81]. El efecto citotóxico del H_2O_2 (100mM) (inductor de daño celular), en el ensayo de viabilidad celular, fue en promedio del 61% \pm 0.8, lo cual difiere significativamente del control negativo (agua) en un 31%. En consecuencia, en esta investigación, todos los tratamientos con Galantamina, se realizaron con células cuya viabilidad celular se hallaba reducida aproximadamente en un 60% como consecuencia de su tratamiento con H_2O_2 .

9.1.4 Efecto protector de la Galantamina frente a daño oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno. En la presente investigación se determinó que el porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos humanos previamente tratados con peróxido de hidrogeno, fue significativamente mayor para las concentraciones baja (viabilidad: 84%) y media (viabilidad: 74%) respecto a la viabilidad celular correspondiente a los cultivos tratados con el peróxido de hidrogeno (viabilidad: 61%); por lo que se concluye que las concentraciones baja y media de Galantamina, presentan un efecto protector, restableciendo la viabilidad celular en un 28% y 17%.

Los inhibidores de acetil colinesterasa, como la Galantamina, son específicos para neuronas y linfocitos, ya que comparten el sistema colinérgico de señalización. La función característica de estos fármacos es la inhibición de la enzima colinesterasa por la unión directa al sitio oligomérico. La degradación de la colina, en linfocitos cultivados *in vitro*, puede activar la vía extrínseca de muerte celular programada. Se sugiere que la capacidad de la Galantamina de impedir este proceso, puede determinar su efecto protector. El aumento en la concentración de colina extracelular en esta línea celular, disminuye la producción de moléculas pro-oxidantes como las citocinas, que pueden activar el receptor de muerte Fas, el cual da inicio a la vía extrínseca de apoptosis [56].

La liberación de interleucinas como respuesta al estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrogeno, puede inducir a la activación del receptor TNF que está involucrado en la apoptosis; la inhibición de estas vías de señalización, por el aumento en la concentración celular de colina, reprime la respuesta inflamatoria en linfocitos T, bloqueando la producción de citocinas y moléculas pro-inflamatorias, contribuyendo a la supervivencia celular [56].

El descontrol del ciclo celular por estrés oxidativo exógeno, es fundamental en el estudio de enfermedades neurodegenerativas e infecciosas, ya que se genera un daño metabólico celular que inicia con estrés oxidativo; algunos inhibidores de acetil colinesterasa pueden retener células neuronales en mitosis [50]. Esta capacidad se establece como un mecanismo de protección al material genético; impidiendo la expresión de genes que activen la apoptosis [50]. Esta estrategia terapéutica, es estudiada actualmente para enfermedades infecciosas.

La posibilidad de la Galantamina como agente protector, se relaciona estrechamente con el uso de otros inhibidores de acetil colinesterasa, como la triacina, que arrestan el ciclo celular en Go y favorecen a la supervivencia celular en líneas neuronales [50].

Traycova, M. y colaboradores, en el año 2003 [43], evaluaron el efecto antioxidante del hidrobromuro de Galantamina, mediante la técnica luminol-dependiente. El agente oxidante fue H_2O_2 1 μM . Las concentraciones del fármaco variaban entre 1 a 100 μM . Encontraron que la dosis de 1 μM tenía el mayor efecto antioxidante, debido a la capacidad de la Galantamina para atrapar iones superóxido e hidroxilo. Los autores sugieren que esta propiedad se debe al grupo hidroxilo de la Galantamina, que puede oxidarse transformándose en un grupo ceto y así reducir radicales libres, manteniendo la coordinación en el enlace del

nitrógeno cuaternario, que puede recibir electrones desapareados de las especies reactivas de oxígeno.

La concentración baja de Galantamina (0,62 μM), presentó el mayor efecto antioxidante, ajustado a lo expuesto por Traycova, M.[43], en el que la Galantamina (1 μM), atrapaba iones hidroxilos y superóxidos con un rendimiento de reacción cercano al 80%.

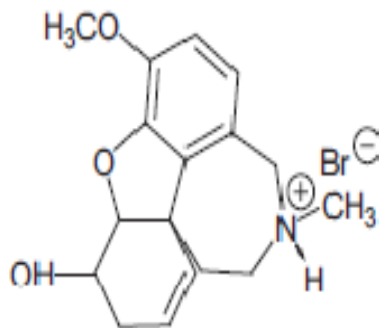


Figura 7. Estructura del Hidrobromuro de Galantamina, la capacidad antioxidante se debe al grupo hidroxilo (OH), que puede oxidarse y al nitrógeno (N) de la molécula.

Miezan, J. y colaboradores, en el año 2007 [4], determinaron el efecto protector de la Galantamina (0.1–100 μM), frente a daño celular inducido con H_2O_2 (500 μM), en una línea neuronal. Se observó una reducción en el potencial de membrana del 19% y en la producción de especies reactivas de oxígeno del 50%; se expone una significativa inhibición al daño oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno. El estudio concluyó que: los altos niveles del neurotransmisor acetilcolina, disminuyen la producción de radicales libres y con esto la posibilidad de que la célula entre en apoptosis; y confirmó que el estrés oxidativo celular causado por el H_2O_2 genera acumulación de radicales libres y pérdida de la actividad mitocondrial.

McNulty, J. y colaboradores [23], publicaron acerca de la capacidad de la Galantamina de inhibir la enzima P450, involucrada en la metabolización de fármacos y xenobióticos, lo que sugiere que el efecto protector del alcaloide puede relacionarse con el bloqueo de esta enzima, encargada de activar moléculas adicionándoles grupos altamente reactivos como hidroxilos y peróxidos,

que pueden generar estrés oxidativo celular en enfermedades neurodegenerativas e infecciosas.

Arias, E. y colaboradores [45], publicaron acerca de la capacidad de la Galantamina de prevenir apoptosis en células neuronales. Se propone que la interacción del fármaco con receptores colinérgicos de membrana, pueden aumentar la expresión de la proteína de sobrevivencia Bcl-2 y regular la entrada de calcio a la célula, manteniendo las diferencias de electronegatividad celular.

El peróxido de hidrogeno es usado como inductor de apoptosis y necrosis en diferentes líneas celulares [80], la prueba de exclusión utilizando azul de Trypan, permitió comparar el número de células muertas entre los tratamientos y el inductor de daño celular (H_2O_2). El aumento en el porcentaje de viabilidad celular en las células tratadas con la concentración media y baja de Galantamina, muestra un efecto protector, que disminuye el número de células apoptóticas [43]. Se encontró que el máximo efecto protector fue a la concentración más baja, semejante a lo publicado en el 2007, por Mieza y Traykova [4, 43].

10. CONCLUSIONES

Se identificó el efecto citotóxico de la concentración alta (20 μM) y media (2,5 μM) de Galantamina, mediante la prueba de Índice Mitótico en linfocitos de sangre periférica, cultivadas "in vitro".

Se estableció una relación lineal negativa, entre las concentraciones de Galantamina y el efecto citotóxico (% de Índice Mitótico).

Se identificó efecto protector de las concentraciones baja (0,62 μM) y media (2,5 μM) de Galantamina, frente al daño oxidativo inducido por H_2O_2 , determinado mediante la prueba de Viabilidad Celular, en células mononucleares aisladas de sangre periférica, cultivadas "in vitro".

Se estableció que la concentración alta de Galantamina (20 μM), no presentó efecto protector al daño celular inducido por H_2O_2 .

11. RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto protector de la Galantamina, en ensayos “*in vivo*” o líneas celulares con activación metabólica, para esclarecer la eficacia de la capacidad antioxidante, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

Identificar si la estructura cristalina de la Galantamina, interviene en su actividad biológica.

Evaluar el efecto protector de la Galantamina libre de excipientes, para establecer con claridad el efecto citotóxico del fármaco.

Determinar el mecanismo de acción de la Galantamina en linfocitos humanos, con el fin de identificar su posible uso en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y en patologías autoinmunes como el SIDA y artritis reumatoide.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Romano, M., et al., *Enfermedad de Alzheimer* Revista de Posgrados de Medicina 2007. **175**.
2. Hernández, M., et al., *Vías de Inmunomodulación*. Salud Mental, 2007. **30**: p. 13-19.
3. Matharu, B., et al., *Galantamine inhibits [beta]-amyloid aggregation and cytotoxicity*. Journal of the neurological sciences, 2009. **280**(1-2): p. 49-58.
4. Miezán, J., et al., *Antioxidative properties of galantamine on neuronal damage induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells*. 2007.
5. Callaghan, R., J. O'Connor, and A. Álvarez Barrientos, *Microscopía confocal y estrés oxidativo en células*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009(0).
6. Chandel, N., et al., *Redox regulation of p53 during hypoxia*. Oncogene, 2000. **19**(34): p. 3840-3848.
7. MITOCONDRIAL, P. and E. LA, *NEFROLOGIA EXPERIMENTAL FISILOGIA Y FISIOPATOLOGIA*. NEFROLOGIA, 1999. **19**(Supl 2).
8. Dennis, A. and A. Mederos, *Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular*. Rev Mex Neuroci, 2006. **7**(4): p. 330-337.
9. EDICINA, M., *OXIDO NITRICO, INFLAMACION Y CELULAS FAGOCITICAS*.
10. Sarmiento, B. and M. Torres, *Determinación del efecto citotóxico del veneno de escorpión *Tityus pachyurus* (Butinidae) en linfocitos humanos cultivados in vitro, mediante la prueba de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis*, in *Biología*. 2010, Universidad del Cauca: Popayán.
11. Center, A.s.D.E.a.R. *Impacto de la enfermedad de Alzheimer*. 2009 [cited 2010 29 de septiembre].
12. Voge, S., *NOAH--New York Online Access to Health: library collaboration for bilingual consumer health information on the Internet*. Bulletin of the Medical Library Association, 1998. **86**(3): p. 326.
13. Pradilla, A., et al., *Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano*. Revista Panamericana de Salud Pública, 2003. **14**(2): p. 104-111.
14. BENITEZ, B., et al., *Exploration of genetic susceptibility factors for Parkinson's disease in a South American sample*.
15. Mangone, C., et al., *La demencia en Latinoamérica*. Rev Neurol Arg, 2000. **25**: p. 1085-112.
16. Morales, C., *ÍNDICE ANALÍTICO-PÁGINAS REVISTA ACADEMICA E INSTITUCIONAL DE LA UCPR*. Revista Páginas, (71).
17. Romero, J. and E. Rodríguez, *Tratamiento farmacológico de los déficits cognitivos de la enfermedad de Alzheimer*. Medicina General, 2000. **26**: p. 653-660.

18. Golimstok, A., *Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*.
19. McGeer, P., M. Schulzer, and E. McGeer, *Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies*. *Neurology*, 1996. **47**(2): p. 425.
20. Llibre Rodríguez, J. and M. Guerra Hernández, *Enfermedad de Alzheimer: Situación actual y estrategias terapéuticas*. *Revista Cubana de Medicina*, 1999. **38**: p. 134-142.
21. Romero, M., et al., *Utilización de los inhibidores de la acetilcolinesterasa y la memantina para el tratamiento clínico de la demencia tipo Alzheimer*. *Rev Esp Salud Pública*, 2005. **79**(6): p. 665-672.
22. Medrano, V., et al., *Relevancia del tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa en las fases graves de la enfermedad de Alzheimer*. *Rev Neurol*, 2003. **36**(12): p. 1101-1104.
23. McNulty, J., et al., *Selective cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of Amaryllidaceae alkaloids*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2009. **19**(12): p. 3233-3237.
24. Naderi, J., C. Lopez, and S. Pandey, *Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress*. *Mechanisms of ageing and development*, 2006. **127**(1): p. 25-35.
25. Meza, G., et al., *Estudio abierto de eficacia de galantamina de liberación prolongada en pacientes con demencia tipo Alzheimer, vascular o mixta*. *Rev Mex Neuroci*, 2005. **6**(1): p. 34.
26. Merchán, D., L. Vargas, and V. Kouznetsov, *Nuevos agentes inhibidores de la acetilcolinesterasa con fragmentos estructurales de lignanos*. *REVISTA SALUD UIS*, 2009. **40**(2).
27. Zawia, N., D. Lahiri, and F. Cardozo-Pelaez, *Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009. **46**(9): p. 1241-1249.
28. Graham, N. and H. BRODATY, *Alzheimer's Disease International*. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 1997. **12**(7): p. 691.
29. Takeuchi, Y. and J. Guevara, *Prevalencia de las enfermedades neurológicas en el Valle del Cauca. Estudio Neuroepidemiológico Nacional (EPINEURO)*. *Colombia Médica*, 1999. **30**(2).
30. Small, G., et al., *The impact of symptom severity on the cost of Alzheimer's disease*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2002. **50**(2): p. 321-327.
31. M.A. Peinado, et al., *Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares*. *Revista Neurología*, 2001. **31**: p. 1054-1065.
32. Cerdá Micó, C., S. Borreguero Oliva, and G. Sanz Tormo, *Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas*. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (0).

33. Cai, z. and Y. Yan, *Pathway and mechanism of oxidative stress in Alzheimer's disease*. Journal of Medical Colleges of PLA, 2007. **22**: p. 5.
34. I. Ferrer, et al., *Fas and Fas ligand expression in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2001. **102**: p. 121-131.
35. García, J., *Mecanismos intracelulares en la supervivencia y muerte neuronal en modelos excitotóxicos y transgénicos de la Enfermedad de Huntington*, in *Departamento de Biología celular y Anatomía Patología 2007*, Universidad de Barcelona Barcelona. p. 6-46.
36. M.A. Kamal, N.H. Greig , and M. Reale, *Anti-Inflammatory Properties of Acetylcholinesterase Inhibitors Administred in Alzheimer's Disease*. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, 2009. **8**(85-100).
37. Llibre Rodríguez, J.J. and M.A. Guerra Hernández, *Enfermedad de Alzheimer: Situación actual y estrategias terapéuticas*. Revista Cubana de Medicina, 1999. **38**(2): p. 134-142.
38. Pérez Martínez, V.T., *Demencia en la enfermedad de Alzheimer: un enfoque integral*. Revista Cubana de Medicina General Integral, 2005. **21**(3-4): p. 0-0.
39. Medrano, V., et al., *Relevancia del tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa en las fases graves de la enfermedad de Alzheimer*. Revista de Neurología, 2003. **36**(12): p. 1101-1104.
40. Romero, M.P., et al., *Utilización de los inhibidores de la acetilcolinesterasa y la memantina para el tratamiento clínico de la demencia tipo Alzheimer*. Rev Esp Salud Pública, 2005. **79**(6): p. 665-672.
41. López-Pousa, S., *Factores asociados a la mortalidad en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con galantamina*. Medicina clínica, 2006. **127**(06): p. 206.
42. en Tabasco, S., et al., *EFICACIA DE LA GALANTAMINA EN LOS SÍNTOMAS DE DEMENCIA DEL TIPO ALZHEIMER, VASCULAR Y MIXTA Salud en Tabasco, enero-abril, año/vol. 12, número 001 Secretaría de Salud del Estado de Tabasco Villahermosa, México*. SALUD EN TABASCO, 2006. **12**(1): p. 423.
43. Traykova, M., et al., *Antioxidant properties of galantamine hydrobromide*. ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C, 2003. **58**(5/6): p. 361-365.
44. K. Takeshi, et al., *Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks Ab-enhanced glutamate toxicity*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004. **325**: p. 975-982.
45. Arias, E., et al., *Galantamine prevents apoptosis induced by [beta]-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors*. Neuropharmacology, 2004. **46**(1): p. 103-114.
46. DEL, M.J., C.V.P.O.S. VÉLEZ, and O. VÉLEZ-PARDO, *Los linfocitos: modelo de estudio en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson*.

47. Cabezas, F., et al., *Alcaloides y actividad biológica en eucharis amazonica, e. grandiflora, caliphuria subedentata y crinum kunthianum, especies colombianas de amaryllidaceae*. Ciencias, 2007.
48. Hernández, M.E., et al., *Vías de neuroinmunomodulación. Primera parte*. Salud Mental, 2007. **30**(6): p. 13.
49. Brambilla, G. and A. Martelli, *Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2009. **681**(2-3): p. 209-229.
50. Woods, J., M. Snape, and M.A. Smith, *The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: Suggestions for drug development*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2007. **1772**(4): p. 503-508.
51. Kamal, M., N. Greig, and M. Reale, *Anti-Inflammatory Properties of Acetylcholinesterase Inhibitors Administred in Alzheimers Disease*. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Cu, 2009. **8**(1): p. 85-100.
52. Romano, M., et al., *ENFERMEDAD DE ALZHEIMER*.
53. Kaina, B., *DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling*. Biochemical Pharmacology, 2003. **66**: p. 1547-1554.
54. Tornero, D., et al., *Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos*. Revista de Neurología, 2002. **35**(4): p. 354-361.
55. Kim, H., Y. Kim, and C. Kim, *Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction*. Oncogene, 2004. **24**(7): p. 1252-1261.
56. Nizri, E., et al., *Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors*. Neuropharmacology, 2006. **50**(5): p. 540-547.
57. Carretero, M., *Galantamina*. Actualidad Científica, 2001. **3**.
58. Janssen-Cilag, S.A., *Ficha Técnica*, M.d.S.y.P. Social, Editor. 2007: Madrid.
59. Arrebola, D.F.A., L.A.R. Fernández, and D.L.C. Sánchez, *Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad*.
60. Fenech, M., *Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology*. Toxicology, 2002. **181**: p. 411-416.
61. Reina, M. *tecnica de contaje celular*. 2003 [cited 2010 15 de septiembre].
62. Hoyos, L., S. Carvajal, and N. Cajas, *Manual de citogenetica: Linfocitos Humanos*, U.d.C. Grupo de investigación en Toxicología genetica y citogenetica, Editor. 2002. p. 16-23.
63. McNulty, J., et al., *Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells*. Phytochemistry, 2009. **70**(7): p. 913-919.

64. Kekre, N., et al., *Pancreatistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells*. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2005. **56**(1): p. 29-38.
65. Jimenez, A., et al., *Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells:: Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1976. **425**(3): p. 342-348.
66. SMIRNOFF, N., *Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants*. *Annals of Botany*, 1996. **78**(6): p. 661.
67. Li, W., et al., *Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(1): p. 16-9.
68. Husson, G., et al., *Utilisation des cultures cellulaires pour la recherche des effets cytotoxiques et antiviraux d'un extrait naturel d'Amaryllidaceae*. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 1995. **189**(4): p. 679-692.
69. Zvetkova, E., et al., *Aqueous extracts of Crinum latifolium (L.) and Camellia sinensis show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells*. *International immunopharmacology*, 2001. **1**(12): p. 2143-2150.
70. Winkler, C., et al., *Vitamin C and E suppress mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells in vitro*. *International archives of allergy and immunology*, 2006. **142**(2): p. 127-132.
71. Viant, D.F., et al., *Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal*. *Medisan*, 1999. **3**(3): p. 5-11.
72. Shin, S.H., et al., *Protective Effects of a Herbal Composition (HemoHIM) Against Apoptosis Induced by Oxidative Stress of Hydrogen Peroxide*. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2006. **35**.
73. Antonio, R.N.E., *DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN EL CEREBELO DE RATÓN DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA*.
74. Miramar Gallart, M.D., M.L. Peleato Sánchez, and S.A. Susin López, *Caracterización redox de "Apoptosis inducing factor" y estudio de los mecanismos moleculares implicados en su transferencia electrónica*.
75. Sawada, M., et al., *p53 regulates ceramide formation by neutral sphingomyelinase through reactive oxygen species in human glioma cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(11): p. 1368-1378.
76. Vargas, F., et al., *Estudio in vitro de las propiedades antioxidantes de olanzapina en neutrófilos humanos*.
77. Lee, H., et al., *Antioxidant activity of Glycyrrhiza uralensis fisch extracts on hydrogen peroxide-induced DNA damage in human leucocytes and cell death in PC12 cells*. *Food Science and Biotechnology*, 2008. **17**.

78. Ezoulin, M.J.M., et al., *Antioxidative properties of galantamine on neuronal damage induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells*. Neurotoxicology, 2008. **29**(2): p. 270-277.
79. Shi, D.H., et al., *Protective effect of hopeahainol A, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2009. **28**(1): p. 30-36.
80. Hampton, M.B. and S. Orrenius, *Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis*. FEBS letters, 1997. **414**(3): p. 552-556.
81. Vicedo Tomey, A. and Y. Vicedo Ortega, *Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2000. **19**(3): p. 206-212.