

<b>Universidad</b>	Universidad Tecnológica de Pereira
<b>Programa Académico</b>	Medicina
<b>Nombre del Semillero</b>	Semillero de Fisiología Aplicada y Neurociencias (SEFAN)
<b>Nombre del Grupo de Investigación (si aplica)</b>	Grupo de Fisiología Celular y Aplicada
<b>Línea de Investigación (si aplica)</b>	Neurociencias
<b>Nombre del Tutor del Semillero</b>	Julio César Sánchez Naranjo
<b>Email Tutor</b>	<a href="mailto:jcsanchez@utp.edu.co">jcsanchez@utp.edu.co</a>
<b>Título del Proyecto</b>	Papel del canal TRPV4 en la respuesta de un modelo neuronal a marcadores proinflamatorios y alteraciones homeostáticas
<b>Autores del Proyecto</b>	Juan Felipe Quintero Moreno, Aníbal Valencia Vásquez
<b>Ponente (1)</b>	Juan Felipe Quintero Moreno
<b>Documento de Identidad</b>	1088315510
<b>Email</b>	juafelquintero@utp.edu.co
<b>Ponente (2)</b>	Aníbal Valencia Vásquez
<b>Documento de Identidad</b>	1089746479
<b>Email</b>	afw.11@utp.edu.co
<b>Teléfonos de Contacto</b>	3108911302-3225203338
<b>Nivel de formación de los estudiantes ponentes (Semestre)</b>	VIII (J.F. Quintero) y VII Semestre (A. Valencia)
<b>MODALIDAD (seleccionar una- Marque con una x)</b>	<b>PONENCIA</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Investigación en Curso (X)</li> <li>• Investigación Terminada</li> </ul>
	<b>PÓSTER</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Propuesta de Investigación</li> </ul>
<b>Área de la investigación (seleccionar una- Marque con una x)</b>	• Ciencias Naturales
	• Ingenierías y Tecnologías
	• Ciencias Médicas y de la Salud. (X)
	• Ciencias Agrícolas
	• Ciencias Sociales
	• Humanidades
	• Artes, arquitectura y diseño

# **PAPEL DEL CANAL TRPV4 EN LA RESPUESTA DE UN MODELO NEURONAL A MARCADORES PROINFLAMATORIOS Y ALTERACIONES HOMEOSTÁTICAS**

**AUTORES:** Juan Felipe Quintero Moreno<sup>(1)</sup> Aníbal Valencia Vásquez<sup>(2)</sup>

## **RESUMEN:**

El calcio es un ion con un papel determinante en el desencadenamiento de las vías metabólicas celulares que regulan los procesos de neuroprotección y neurodegeneración. La alteración en la homeostasis de dicho ion genera cambios fisiológicos en los procesos celulares que conllevan finalmente a la muerte celular, especialmente en las neuronas, procesos que son la vía final común de las alteraciones patológicas que más afectan al sistema nervioso central y que son de alta prevalencia e incidencia en nuestra población. Uno de sus mecanismos más importantes de transporte es el canal TRPV4 y su rol en la regulación del calcio intracelular y sus efectos deletéreos para la supervivencia neuronal bajo factores proinflamatorios y cambios homeostáticos en distintas enfermedades. **Objetivo:** Establecer los efectos del factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina 1 beta, los cambios de pH, osmolaridad e hipoxia sobre la expresión y funcionalidad del canal TRPV4 sobre la línea celular SHSY5Y. **Metodología:** Se realizarán cultivos de SHSY5Y los cuales serán expuestos con factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interleucina 1 $\beta$ , acidosis, alcalosis, hiperosmolaridad, hipoosmolaridad e hipoxia por 2 horas con su respectivo control. Posteriormente se realizará RT-PCR y Western Blot, para detección del RNA y la proteína respectivamente. Además, se realizarán pruebas de viabilidad celular con MTT para cada una de las condiciones en estudio y se realizará caracterización electrofisiológica por *patch clamp*. Con los datos recolectados se realizará un test t-Student no pareado de dos colas o la prueba no paramétrica correspondiente, una  $p < 0.05$  será significativa. **Resultados:** Se han obtenido 6 ensayos por cada estímulo realizado a las células SHSY5Y con los agentes a estudiar. De allí se ha recolectado el RNA y proteínas correspondientes para luego realizar la PCR y Western Blot. La expresión de TRPV4 ya fue comprobada por RT-PCR. Aún está pendiente realizar el registro electrofisiológico.

**PALABRAS CLAVE:** TRPV4, calcio, daño neuronal, homeostasis celular, SH-SY5Y.

## **INTRODUCCIÓN:**

Las enfermedades neurológicas son una gran problemática en todo el mundo, dada la alta prevalencia, el impacto que causa en la calidad de vida y los costos económicos sobre los pacientes (1). En el mundo los eventos cerebrovasculares son la segunda causa de mortalidad y cada año alrededor de 42 millones de personas sufren un trauma craneoencefálico (2, 3). Por otra parte, en 2010 existían 35,6 millones de personas que padecían alguna demencia y existe una incidencia de 4,5 a 19 personas por cada mil habitantes al año que padecen enfermedad de Parkinson en EEUU (1, 4). El envejecimiento de la población mundial, los inadecuados hábitos de vida y las altas tasas de trauma craneoencefálico y eventos cerebrovasculares en todos los países del mundo, convierten el daño neuronal en un problema de salud pública (1).

Cada una de las condiciones expuestas conlleva a daño neuronal por diferentes noxas que involucran vías fisiopatológicas distintas las cuales tienen como eje común la alteración de la homeostasis calcio (5, 6). La comprensión de los mecanismos de transporte de calcio afectados en cada una de estas patologías permitiría una utilidad práctica en cuanto a la disminución de las

complicaciones, la calidad de vida y el enfoque de tratamiento que existen actualmente. Los canales *transient receptor potential vanilloid 4* (TRPV4) son una ruta importante de  $\text{Ca}^{2+}$  en las membranas externas, su expresión esta incrementada en el hipocampo y la corteza cerebral (7), y se han involucrado en procesos de señalización y apoptosis celular. Por tanto, la comprensión de los diferentes procesos involucrados en la alteración de la homeostasis del calcio intracelular como son: la exposición a citocinas proinflamatorias, cambios de pH, osmolaridad y condiciones de hipoxia sobre la expresión y funcionalidad del.

(1) [juafelquintero@utp.edu.co](mailto:juafelquintero@utp.edu.co) Estudiante medicina. SEFAN. Universidad Tecnológica de Pereira.

(2) [afw.11@utp.edu.co](mailto:afw.11@utp.edu.co) Estudiante medicina. SEFAN. Universidad Tecnológica de Pereira.

canal TRPV4 en las células SH-SY5Y presentes en las patologías descritas, permitirá aportar conocimiento acerca de la interrelación entre las enfermedades neurodegenerativas y la homeostasis del calcio intracelular.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

El conocimiento de la fisiopatología de una enfermedad es el primer paso para llegar a la comprensión y posterior intervención de condiciones como el accidente cerebrovascular, trauma craneoencefálico y enfermedades neurodegenerativas, las cuales son patologías de alta prevalencia generadoras de alta morbimortalidad, discapacidad y por ende, de altos costos al sistema de salud (8). Existen procesos fisiopatológicos comunes que incluyen una respuesta inflamatoria generalizada, edema vasogénico, cambios en pH, osmolaridad, alteraciones de las concentraciones iónicas, disfunción mitocondrial, proliferación astrocitaria y muerte neuronal tardía; todos estos cambios convergen a una vía final común cuyo denominador es la alteración de la homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (6).

Este ion es un elemento clave en la homeostasis neuronal, en la cual cumple un papel determinante en el desencadenamiento de las vías metabólicas celulares que controlan los procesos de neuroprotección y neurodegeneración. Los niveles de calcio intracelulares están determinados por los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los diferentes transportadores de dicho ion que se encuentran en las membranas celulares (6, 9); estos se encargan de mantenerlo en un balance, ya que sus incrementos sostenidos pueden ser deletéreos para la supervivencia neuronal (10, 11). El canal TRPV4 está involucrado en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , este último tiene una función dual en la señalización celular y de vías apoptóticas (10), entendiendo que este ion a nivel citoplasmático es un determinante fundamental de la supervivencia neuronal ante los estímulos que plantea el medio. Resulta de vital importancia caracterizar y entender los diferentes mecanismos que se ven involucrados en dicho proceso, desde saber cómo se da la expresión génica normal del TRPV4 a nivel de las neuronas hasta comprender como dicha expresión se ve alterada en respuesta a un factor proinflamatorios como la  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , y cambios de pH y osmolaridad lo anterior puesto que no existen los suficientes estudios que integren y correlacionen dichas variables, presentes todas en el proceso fisiopatológico de diversas enfermedades del sistema nervioso central(12). Es por esto que la pregunta problema es: ¿Cuáles son los efectos de los marcadores pro-inflamatorios y las alteraciones homeostáticas sobre la expresión y la actividad del canal TRPV4 en células SHSY5Y?

### **JUSTIFICACIÓN:**

En el mundo entero las enfermedades neurológicas son un problema de salud pública que se ha ido incrementando de forma exponencial con el paso de los años(1, 2). Es por esto que existe un

gran interés en entender el comportamiento a nivel celular de estas enfermedades ya que el estudio de estos procesos se vuelve relevante para entender los mecanismos de neuroprotección y neurotoxicidad, los cuales tienen una gran utilidad en términos de disminución de complicaciones neurológicas, calidad de vida y costos de tratamiento en los pacientes que sufren estas enfermedades.

Múltiples procesos patológicos como el de las enfermedades cerebrovasculares, el trauma craneoencefálico y las enfermedades neurodegenerativas, inician con procesos de lesión celular que conllevan a la alteración de la homeostasis de los iones, especialmente las concentraciones intracelulares de calcio; entre las diferentes noxas se encuentran la respuesta inflamatoria generalizada, el edema vasogénico, los cambios en pH, la osmolaridad y las alteraciones de las concentraciones iónicas (6, 7). Los canales TRPV4 son una ruta importante de  $Ca^{2+}$  que ha venido cobrando gran importancia en las últimas décadas gracias a que estos son canales que pueden ser estimulados por una gran variedad de agentes, tienen la capacidad de asociarse a cascadas de señalización intracelular, interactuar con una diversidad de proteínas, se encuentran expresados en varios tejidos cumpliendo muchas funciones y son una vía importante de daño y muerte neuronal (12). Además, es claro el papel de estos canales sobre la neurotoxicidad que puede ser inducida tras su activación (13-15). Asimismo, se ha demostrado que los canales TRPV4 son protagonistas en la respuesta de las células ante diferentes condiciones que pueden afectar su funcionalidad como son la exposición ante citocinas proinflamatorias (16), cambios de osmolaridad y pH (17), y condiciones de hipoxia (18), las cuales serán investigadas en este estudio utilizando un modelo neuronal. Por estas razones el estudio de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la muerte neuronal después de la exposición a factores proinflamatorios y alteraciones homeostáticas son un propósito de gran importancia para la investigación, pues permitirá comprender mejor el proceso e intervenir en éste para minimizar el daño o repararlo cuando esto sea posible a través de diversas estrategias terapéuticas.

## **OBJETIVOS**

**General:** Establecer el efecto de marcadores pro-inflamatorios y alteraciones homeostáticas sobre la expresión y la actividad del canal TRPV4 en células SHSY5Y como modelo neuronal.

### **Específicos:**

- Verificar la expresión génica del canal TRPV4 en neuronas de la línea SHSY5Y y.
- Determinar el efecto del  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , cambios de pH y osmolaridad, e hipoxia sobre la expresión génica del canal TRPV4 en las células SH-SY5Y.
- Establecer el efecto del  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , cambios de pH y osmolaridad, e hipoxia sobre la actividad del canal TRPV4 en las células SH-SY5Y.
- Determinar la viabilidad y la supervivencia de las células SH-SY5Y expuestas a  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , cambios de pH y osmolaridad, e hipoxia.

## **REFERENTE TEÓRICO:**

Las células SH-SY5Y, línea celular humana derivada de neuroblastoma, han sido de gran utilidad en el campo de las neurociencias como modelo *in vitro* para el estudio de procesos neurobiológicos (19). Gracias a sus características morfológicas y funcionales, las células SH-SY5Y se han utilizado como modelos neuronales para el estudio de los mecanismos de neurotoxicidad y neuroprotección implicados en trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson (PD) (20) y de Alzheimer (AD) (21), trauma craneoencefálico (22) y enfermedad cerebrovascular (23).

La señalización intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  es vital para toda célula, ya que regula procesos comunes entre todas ellas como el metabolismo celular, cambios en el citoesqueleto, excitotoxicidad, proliferación, diferenciación y apoptosis (5). Tanto en las neuronas como en todas las células, algún estímulo nocivo puede generar un incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  sostenido que induce la activación de enzimas que desencadenan una cascada apoptótica y la posterior muerte celular (6). Esta alteración en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  tiene grandes efectos negativos para la supervivencia y la funcionalidad de las neuronas (7). La alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  es un proceso común que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas (24), en el trauma cerebral (25) y la enfermedad cerebrovascular (26).

Para la movilización de este ion a través de las membranas celulares internas o externas es necesaria la participación de mecanismos de transporte (5). Entre estos mecanismos se encuentran los canales TRPV4, miembros de la subfamilia TRPV que a su vez hacen parte de la familia de los canales TRP, y son una ruta importante de  $\text{Ca}^{2+}$  en las membranas externas (12). El TRPV4 contiene 6 dominios transmembrana que presenta ambas colas N- y C-terminal ubicados a nivel citoplasmático y el poro del canal se encuentra ubicado entre los dominios transmembrana 5 y 6 (27). El gen del TRPV4 se encuentra ubicado en el cromosoma 12q en la posición 24.11 y presenta 5 variantes (TRPV4A-E) (28). Los TRPV4 son canales catiónicos no selectivos que presentan una alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  aunque también son permeables a iones monovalentes como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Li}^+$ , en menor medida (29). Estos canales han sido involucrados en diversas funciones como la osmoregulación, mecanotransducción, temperatura corporal, nocicepción, inflamación, excitabilidad neuronal, tono vascular, dolor, migración y volumen celular, entre otras (12).

Los canales TRPV4 pueden ser activados por diversos estímulos como los cambios osmóticos, calor ( $24\text{-}38^\circ\text{C}$ ), pH bajo, endocannabinoides y ácido araquidónico, y regulados por el  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfatidilinositol 4,5-difosfonato, fosfolipasa C y proteína cinasa C (PKC) (12). Además, el  $4\alpha$ -forbol 12,13-didecanoato ( $4\alpha\text{PDD}$ ) es un agonista sintético específico, mientras que el HC-067047 es un antagonista potente y específico de este canal (27). Hasta el momento, se han encontrado 38 proteínas que pueden interactuar con el TRPV4, entre ellas se encuentran canales iónicos, proteínas del citoesqueleto, proteínas que modifican su localización y proteínas que modulan su señalización intracelular (12, 27). Además, los canales TRPV4 pueden expresarse en diversos tejidos, entre ellos se encuentran el sistema nervioso central y periférico, cardiovascular, inmunológico, digestivo, reproductor y musculoesquelético (12). Diversos estudios han demostrado la participación de estos canales en la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en varios tipos de células como astrocitos (30), microglia (31), neuronas (32), adipocitos (11), condrocitos (16) y células endoteliales (33).

Durante el proceso de neurodegeneración se produce una alteración en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por múltiples mecanismos desencadenantes (34). Tanto en el cerebro de ratas adultas mayores (35) como en el cerebro de modelos transgénicos de la AD (36), se ha encontrado un incremento en la expresión del TRPV4 en la formación hipocámpal y la corteza cerebral. Los péptidos  $\text{A}\beta$  pueden activar el TRPV4 expresado en neuronas y astrocitos hipocámpales, incrementando el  $\text{Ca}^{2+}$  y llevando a la muerte celular (37), aunque este efecto fue abolido por un antagonista inespecífico de los canales TRP. La activación del TRPV4 induce apoptosis por medio de la disminución de la actividad de la vía PI3K/PKB e incremento de la vía p38 MAPK en el hipocampo de ratones (14). En la EP la sobreactividad de aferencias del núcleo subtalámico sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra genera excitotoxicidad mediada por glutamato a través de sus receptores NMDA (38). Además, las neuronas de la SN se caracterizan por tener una actividad marcadas que permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual conlleva a un aumento del estrés

oxidativo y una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (39). En efecto, se ha demostrado que la estimulación de canales TRPV4 conlleva a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico, induciendo apoptosis neuronal (15).

Diversos estudios han demostrado que citocinas proinflamatorias regulan la actividad del TRPV4 y la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Neuronas del ganglio de la raíz dorsal incrementan la expresión del TRPV4, tanto a nivel del RNA mensajero como de la proteína, al ser estimuladas con  $\text{TNF-}\alpha$  (40). El  $\text{TNF-}\alpha$  tiene la capacidad de incrementar la respuesta del TRPV4 ante sus agonistas en células similares a odontoblastos (41). Otros estudios en células endoteliales cerebrales demostraron que la  $\text{IL-1}\beta$  incrementa la expresión del TRPV4 (42). En condrocitos bovinos y humanos la activación del TRPV4 induce un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y dicho efecto fue atenuado por  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  (16, 43).

Aumentos en la osmolaridad sanguínea pueden ser desencadenados por estados hiperglucémicos como los que se presentan en la diabetes mellitus, la cual ha sido asociada con diversas enfermedades neurodegenerativas (44). Estados hiperosmóticos pueden inducir apoptosis (45) y también la fosforilación de la proteína tau (46) en las células de la línea SH-SY5Y. Además, se ha demostrado que la hiperosmolaridad también induce la proteólisis de la proteína tau a través de la activación de la caspasa 3 (47). Estos procesos de fosforilación de la proteína tau se han asociado a incrementos transitorios de las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la activación de la  $\text{GSK3}\beta$  (48). Las condiciones hipotónicas son ampliamente conocidas como activadoras del TRPV4 en diferentes tipos de células (11, 16). En efecto, estímulos hipotónicos activan el TRPV4 e incrementan los potenciales postsinápticos excitatorios por medio del aumento de la actividad de los receptores AMPA de glutamato, siendo este proceso dependiente de la activación de la PKC o PKA (17). El estrés hipoosmótico induce un mecanismo de disminución regulatoria de volumen, en el cual se forma un complejo entre el TRPV4 y la acuaporina 4 que funciona de forma sinérgica como un osmosensor en células gliales (49). Estos mecanismos regulatorios de volumen también se han demostrado en otras células (50, 51).

La alteración cerebrovascular presente en caracterizada por hipoperfusión cerebral y deterioro en la vasodilatación (52). Estudios en modelos animales de la AD demostraron que la dilatación inducida por la activación del TRPV4 en arterias cerebrales se encuentra alterada (33). La activación de los canales TRPV4 genera un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los astrocitos que se encuentran acoplados con los vasos sanguíneos cerebrales (53). Es bien conocido que la hipoxia genera alteraciones en el pH extracelular y en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (54). En neuronas hipocampales los aumentos o disminuciones en el pH extracelular conllevan a un incremento o supresión de la actividad del receptor de NMDA de glutamato, respectivamente (55). Asimismo, los estadios de acidosis incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mientras que la alcalosis tiene un efecto opuesto (56). Recientemente se ha encontrado que la actividad de los canales TRPV4 se incrementa, generando un aumento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , en astrocitos hipocampales sometidos condiciones de hipoxia cerebral (18). Finalmente, en ratones sometidos a isquemia cerebral la activación del TRPV4 indujo muerte de las neuronas hipocampales, proceso al parecer mediado por el receptor NMDA (57).

## **METODOLOGÍA.**

**Tipo de estudio:** El estudio es de tipo experimental.

**Células en cultivo:** Se emplearán de la línea celular SHSY5Y (ATCC<sup>®</sup> CRL 2266<sup>™</sup>), conservadas en condiciones de congelación en nitrógeno líquido. Una vez descongeladas y bajo estrictas medidas de asepsia, las células se sembrarán a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> y se incubarán a 37°C con 5%  $\text{CO}_2$ . Cuando las células logren una confluencia entre 80 a 90% y la morfología estándar de la línea, las células se resembrarán según sea necesario. Para el cultivo se

empleará el medio DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino, aminoácidos esenciales y 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin y neomicina.

**Tratamiento farmacológico:** se emplearán cultivos con confluencia del 80 a 90% y morfología de células maduras. El medio se reemplazará por una solución de Krebs-Ringer y se utilizarán las soluciones stock de TNF- $\alpha$  (2 µg/mL) e IL-1 $\beta$  (0.1 mg/mL), las cuales serán disueltas en PBS (phosphate-buffered saline solution). Las células serán sometidas a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , tratamiento individualizado durante 2 horas. Estas concentraciones se encuentran entre rango utilizado en varios estudios donde se exploran sus efectos celulares (59, 60).

**Condiciones de hipoxia y anoxia:** Las células SH-SY5Y serán cultivadas en placas, las cuales posteriormente son introducidas en la cámara MIC-101 (Billups-Rothenberg, Inc.) e incubadas a 37°C con 10% (hipoxia) o 0% (anoxia) de O<sub>2</sub>. La cámara viene equipada con un medidor que permite controlar la tasa de flujo de los gases. **Determinación de la viabilidad celular:** Para evaluar la viabilidad de las células SH-SY5Y se usará el MTT Cell Proliferation Assay (ATCC), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células se cultivarán en una placa de 96 pozos a una densidad de 50.000 células/pozo en un volumen de 200µl/pozo. Las células se dejarán incubando a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta que tengan una confluencia del 90% y posteriormente se descartará el medio de cultivo, y se adicionan 200 µl de la muestra con cada una de las condiciones estimulantes por separado con sus respectivos controles. Luego se incubarán nuevamente a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. En el caso de las condiciones de hipoxia, se introduce la placa con las células en su medio de cultivo en la cámara MIC-101 (Billups-Rothenberg, Inc.) en las condiciones previamente descritas. Luego de estimular por el tiempo requerido, se retirará la muestra de los estimulantes y se adicionaron 200 µl de MTT a 0.5 mg/ml en medio DMEM sin rojo de fenol y sin suplementar. Se incubarán las células por 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, y después se retirarán el medio con el MTT teniendo cuidado de no eliminar los cristales de formazán púrpura formados. Posteriormente, se adicionarán 100 µl de DMSO (99.8%) y se agitará la placa por 15 minutos para solubilizar los cristales. Por último, se realizará la medición de la absorbancia a 570 nm con corrección a 620 nm en un lector de placas.

**RT-PCR: Extracción del ARN:** Con un conteo celular de entre 500000 a 750000 células, se realizará el aislamiento de ARN por medio de un kit RNeasy Plus y siguiendo la técnica del fabricante. Después la muestra se pasará por medio de un buffer de lisis que neutralizan las ribonucleasas, luego un tratamiento con proteasas por 10 minutos a 55°C digiere el remanente proteico, posteriormente se añade etanol que ayuda a la fijación del ARN. La fase se complementará con un lavado con agua libre de nucleasas y una digestión con una desoxirribonucleasa por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se agrega el ARN. **Molde RT-PCR:** La transcriptasa del kit comercial posee actividad ADN-polimerasa dependiente de molde de ARN y actividad de exorribonucleasa dependiente de una doble cadena híbrida ARN: ADN. El proceso incluye: a) hibridación de cebadores o “primers”; b) retrotranscriptasa, consistente en la síntesis de una cadena de ADN utilizando un molde de ARN y c) degradación del ARN presente en cadenas híbridas ARN: ADN, esta actividad de exorribonucleasa sólo actuará sobre el ARN hibridado al ADNc sintetizado, y no afecta al ARN de cadena simple. Se diseñaron los primers anti-sentido como cebadores de la reacción. **Primers: Forward:** 5'-TGGCTTCTCGCATACCGT-3', **Reverse:** 5'-GGCTCTGGCGTTGGCTTA -3' (11). El volumen obtenido que se procesará suspendido a 25µL en el termociclador, este equipo permite la transcripción reversa por 30 minutos a 50°C seguidos de 15 minutos a 95°C. La PCR continuará con la fase de: desnaturalización a 95°C por 60s, alineación a 51°C – 60°C por 60s, extensión a 72°C por 60s y amplificación por 50 ciclos.

**Western Blot:** Se tomarán las células y serán sometidas a 250  $\mu$ L del buffer de lisis (0.5M HEPES, 3M NaCl, 1M MgCl<sub>2</sub>, 0.5M EDTA, 0.1M DTT, 10% SDS, 10% desoxicolato sódico y 0.3% Triton X-100) incubado en hielo; después de un tiempo se centrifugará a 5000 rpm a 4°C por 5 min, luego se cuantificará la cantidad de proteína por el método de Bradford Pierce (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Se realizará una electroforesis en gel de poliacrilamida y 10% de TRIS HCl con 110 V de 60 a 90 min. Se transferirá a una membrana PVDF y se lavará la membrana con PBS, para un bloqueo posterior con leche por una hora a temperatura ambiente. Después se incubará el antígeno policlonal anti-TRPV4 (#ACC-124) (1:2500) y  $\beta$ -actina (1:1000) se utilizará como control a 4°C toda la noche. La muestra se incubará por 2 horas con los anticuerpos secundarios de conejo, las bandas se revelarán por luminiscencia y se evaluarán su densidad por medio de un densitómetro (11).

**Registro electrofisiológico:** Con el objetivo de caracterizar electrofisiológicamente la actividad del canal TRPV4, se utilizará la técnica de patch clamp en modo célula completa para registrar las corrientes de la membrana en las células SH-SY5Y. Estas células serán colocadas en una cámara de registro que se encuentra acoplada a un microscopio invertido (TE2000U, Nikon), posterior a la estimulación con las condiciones descritas. Las pipetas que se utilizarán para generar el parche (Sutter Instruments) deben tener una resistencia entre 4 a 7 M, lo cual se logrará por medio del instrumento P-97 (Sutter Instruments). Luego se procederá a realizar el parche entre la pipeta y la célula y cuando se logre un sello de resistencia mayor a 5 M, se procederá a registrar las corrientes de la membrana por medio del amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). Para generar las señales del pinzamiento de voltaje se empleará la interfase Digidata 1440A (Axon Instruments Inc.). Las señales que se obtengan serán analizadas utilizando el pCLAMP 10.0 (Axon Instruments Inc.). Todos los experimentos que se lleven a cabo será a temperatura ambiente (20-22°C).

**Análisis estadístico:** Los datos recolectados se analizarán con los paquetes estadísticos SPSS y Graph Prism, por medio de un test t-Student no pareado de dos colas o la prueba no paramétrica respectiva; una  $p < 0.05$  será considerada significativa.

**Aspectos bioéticos:** Este estudio es considerado como un estudio sin riesgo según la Resolución 8430 de 1993, por emplearse únicamente una línea celular. Su realización estará bajo los lineamientos del Comité de Bioética de la Universidad Tecnológica de Pereira.

## **RESULTADOS:**

En este estudio se ha logrado la estandarización de la técnica de cultivo y mantenimiento de las células de SH-SY5Y en nuestro laboratorio involucrando en el proceso a los estudiantes integrantes del proyecto y del semillero, logrando confluencias celulares adecuadas para la realización de hasta ahora 6 ensayos donde se han expuesto las células a cada uno de los estímulos programados, extrayendo proteína para la realización de la Western Blot y el RNA para la PCR-RT. Estas muestras se encuentran suspendidas en buffer de mantenimiento y refrigeradas a -80°C, en espera de continuar el proceso. Además se logró realizar dos ensayos de toxicidad con MTT por parte de los estudiantes en los cuales se lograron resultados ambiguos que ayudaron a reorientar el uso de la técnica. Este estudio espera realizar una contribución al entendimiento del TRPV4 y los factores pro-inflamatorios en los procesos de neuroinflamación. Usar estas herramientas de laboratorio para la formación de los integrantes del Semillero de Fisiología Aplicada y Neurociencias (SEFAN) en el manejo de equipos y técnicas de experimentación con el apoyo y experiencias que tiene el Grupo de Fisiología Celular y Aplicada.

## **IMPACTO:**



- Social: Este estudio permite aportar un nuevo abordaje acerca del estudio y tratamiento de las enfermedades neurológicas, elemento que permite ahondar en posibles dianas terapéuticas a futuro en enfermedades de alto costo social para la sociedad Colombiana y el mundo.
- Económico: Este estudio grandes implicaciones económicas ya que busca establecer rutas comunes de entendimiento de diferentes patologías que le cuestan mucho al sistema de salud, a las familias y a la sociedad por todos los costos directos e indirectos que de allí se derivan.
- Ambiental: En este estudio se usará el mínimo de papel posible y no se usarán impresiones, según las políticas de sostenibilidad de la UTP. Además se realizarán la disposición de los desechos y residuos tóxicos según la normativa interna y lo establecido en la ley.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

1. WHO. Neurological disorders: public health challenges. World Health Organization; 2006.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England). 2012;380(9859):2095-128.
3. Gardner RC, Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Molecular and cellular neurosciences*. 2015;66(Pt B):75-80.
4. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*. 2013;9(1):63-75. e2.
5. Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling. In: Banci L, editor. *Metalloomics and the Cell*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 119-68.
6. Sánchez JC, López-Zapata DF, Romero-Leguizamón CR. Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad. *RevNeurol*. 2010;51(10):0624-632.
7. Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(15):2787-814.
8. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, et al. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *RevNeurol*. 47(08):0414-426.
9. Woods NK, Padmanabhan J. Neuronal Calcium Signaling and Alzheimer's Disease. In: Islam MS, editor. *Calcium Signaling*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 1193-217.
10. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, et al. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Regulate Amyloid- $\beta$  Plaque Deposition and  $\beta$ -Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. *The American journal of pathology*. 2007;170(2):680-92.
11. Sanchez JC, Rivera RA, Munoz LV. TRPV4 Channels in Human White Adipocytes: Electrophysiological Characterization and Regulation by Insulin. *J Cell Physiol*. 2016;231(4):954-63.
12. White JP, Cibelli M, Urban L, Nilus B, McGeown JG, Nagy I. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiological reviews*. 2016;96(3):911-73.
13. Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, Parada CA, Reichling DB, Levine JD. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(18):4444-52.

14. Jie P, Hong Z, Tian Y, Li Y, Lin L, Zhou L, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 induces apoptosis in hippocampus through downregulating PI3K/Akt and upregulating p38 MAPK signaling pathways. *Cell Death & Disease*. 2015;6(6):e1775.
15. Hong Z, Tian Y, Yuan Y, Qi M, Li Y, Du Y, et al. Enhanced Oxidative Stress Is Responsible for TRPV4-Induced Neurotoxicity. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:232.
16. Sanchez JC, Lopez-Zapata DF, Wilkins RJ. TRPV4 channels activity in bovine articular chondrocytes: regulation by obesity-associated mediators. *Cell calcium*. 2014;56(6):493-503.
17. Li L, Yin J, Jie PH, Lu ZH, Zhou LB, Chen L, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 mediates hypotonicity-induced enhancement of synaptic transmission in hippocampal slices. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19(11):854-62.
18. Butenko O, Dzamba D, Benesova J, Honsa P, Benfenati V, Rusnakova V, et al. The Increased Activity of TRPV4 Channel in the Astrocytes of the Adult Rat Hippocampus after Cerebral Hypoxia/Ischemia. *PloS one*. 2012;7(6):e39959.
19. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In: Amini S, White KM, editors. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 9-21.
20. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*. 2010;123(8):1086-92.
21. Agholme L, Lindstrom T, Kagedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;20(4):1069-82.
22. Song J, Li N, Xia Y, Gao Z, Zou SF, Yan YH, et al. Arctigenin Confers Neuroprotection Against Mechanical Trauma Injury in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells by Regulating miRNA-16 and miRNA-199a Expression to Alleviate Inflammation. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2016;60(1):115-29.
23. Zhou QB, Ju XN, Wang XY, Wang MH, Kong F, Sun C, et al. Pretreatment with baicalin attenuates hypoxia and glucose deprivation-induced injury in SH-SY5Y cells. *Chinese journal of integrative medicine*. 2016;22(3):201-6.
24. Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. 2016;90(4):675-91.
25. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurology*. 2015;72(3):355-62.
26. Mauricio CA, Arroyave CD. Función del intercambiador sodio calcio (NCX) en la hipoxia neuronal y la neuroprotección. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2016;17(5):60-9.
27. Garcia-Elias A, Mrkonjić S, Jung C, Pardo-Pastor C, Vicente R, Valverde MA. The TRPV4 Channel. In: Nilius B, Flockerzi V, editors. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 293-319.
28. Everaerts W, Nilius B, Owsianik G. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2010;103(1):2-17.
29. Nilius B, Prenen J, Wissenbach U, Bodding M, Droogmans G. Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2001;443(2):227-33.
30. Benfenati V, Amiry-Moghaddam M, Caprini M, Mylonakou MN, Rapisarda C, Ottersen OP, et al. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience*. 2007;148(4):876-92.

31. Konno M, Shirakawa H, Iida S, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, et al. Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *Glia*. 2012;60(5):761-70.
32. Hong Z, Tian Y, Qi M, Li Y, Du Y, Chen L, et al. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Inhibits  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Activated Current in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2016;9:77.
33. Zhang L, Papadopoulos P, Hamel E. Endothelial TRPV4 channels mediate dilation of cerebral arteries: impairment and recovery in cerebrovascular pathologies related to Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology*. 2013;170(3):661-70.
34. Supnet C, Bezprozvanny I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell calcium*. 2010;47(2):183-9.
35. Lee JC, Choe SY. Age-related changes in the distribution of transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) in the central nervous system of rats. *Journal of molecular histology*. 2014;45(5):497-505.
36. Lee JC, Choe SY. Region-specific changes in the distribution of transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) in the central nervous system of Alzheimer's disease model mice. *Genes & Genomics*. 2016;38(7):629-37.
37. Bai JZ, Lipski J. Involvement of TRPV4 channels in A $\beta$ (40)-induced hippocampal cell death and astrocytic Ca<sup>2+</sup> signalling. *Neurotoxicology*. 2014;41:64-72.
38. Assous M, Had-Aissouni L, Gubellini P, Melon C, Nafia I, Salin P, et al. Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra. *Neurobiology of Disease*. 2014;65:69-81.
39. Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, et al. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*. 2010;468(7324):696-700.
40. Wu Z, Wang S, Wu I, Mata M, Fink DJ. Activation of TLR-4 to produce tumour necrosis factor-alpha in neuropathic pain caused by paclitaxel. *European journal of pain (London, England)*. 2015;19(7):889-98.
41. El Karim I, McCrudden MT, Linden GJ, Abdullah H, Curtis TM, McGahon M, et al. TNF-alpha-induced p38MAPK activation regulates TRPA1 and TRPV4 activity in odontoblast-like cells. *Am J Pathol*. 2015;185(11):2994-3002.
42. Ma YY, Huo HR, Li CH, Zhao BS, Li LF, Sui F, et al. Effects of cinnamaldehyde on PGE2 release and TRPV4 expression in mouse cerebral microvascular endothelial cells induced by interleukin-1beta. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2008;31(3):426-30.
43. Sanchez JC, Lopez-Zapata DF. Effects of Adipokines and Insulin on Intracellular pH, Calcium Concentration, and Responses to Hypo-Osmolarity in Human Articular Chondrocytes from Healthy and Osteoarthritic Cartilage. *Cartilage*. 2015;6(1):45-54.
44. Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *Journal of Molecular Medicine*. 2004;82(8):510-29.
45. Van Golen CM, Feldman EL. Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J Cell Physiol*. 2000;182(1):24-32.
46. Stoothoff WH, Johnson GV. Hyperosmotic stress-induced apoptosis and tau phosphorylation in human neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research*. 2001;65(6):573-82.

47. Olivera-Santa Catalina M, Caballero-Bermejo M, Argent R, Alonso JC, Cuenda A, Lorenzo MJ, et al. Hyperosmotic Stress Induces Tau Proteolysis by Caspase-3 Activation in SH-SY5Y Cells. *J Cell Biochem.* 2016;117(12):2781-90.
48. Li X, Lu F, Tian Q, Yang Y, Wang Q, Wang JZ. Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996).* 2006;113(1):93-102.
49. Benfenati V, Caprini M, Dovizio M, Mylonakou MN, Ferroni S, Ottersen OP, et al. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(6):2563-8.
50. Liu X, Bandyopadhyay BC, Nakamoto T, Singh B, Liedtke W, Melvin JE, et al. A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(22):15485-95.
51. Galizia L, Pizzoni A, Fernandez J, Rivarola V, Capurro C, Ford P. Functional interaction between AQP2 and TRPV4 in renal cells. *J Cell Biochem.* 2012;113(2):580-9.
52. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2016;164(4):603-15.
53. Dunn KM, Hill-Eubanks DC, Liedtke WB, Nelson MT. TRPV4 channels stimulate Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular coupling responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(15):6157-62.
54. Yao H, Haddad GG. Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia. *Cell calcium.* 2004;36(3-4):247-55.
55. Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H<sup>+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990;87(16):6445-9.
56. Ou-Yang Y, Kristian T, Mellergard P, Siesjo BK. The influence of pH on glutamate- and depolarization-induced increases of intracellular calcium concentration in cortical neurons in primary culture. *Brain Res.* 1994;646(1):65-72.
57. Jie P, Lu Z, Hong Z, Li L, Zhou L, Li Y, et al. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 is Involved in Neuronal Injury in Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Molecular neurobiology.* 2016;53(1):8-17.
58. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2013;1078:9-21.
59. Zhao J, O'Connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to A $\beta$  production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of neuroinflammation.* 2011;8(1):1-17.
60. Lee M, McGeer E, McGeer PL. Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging.* 2015;36(1):42-52.