

CONVENIO TERGUM S.L.

TÍTULO: EFECTO BENEFICIOSO DE TERGUM MAXIMUM (TM) FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO, MUERTE Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS

EQUIPO DESARROLLADOR EN EL IBiS: Laboratorio 209

EMPRESA FINANCIADORA: TERGUM S.L. C.I.F. B91875658 que se encuentra domiciliada en Av. Veintiocho de Febrero 39, 41702 Dos Hermanas.

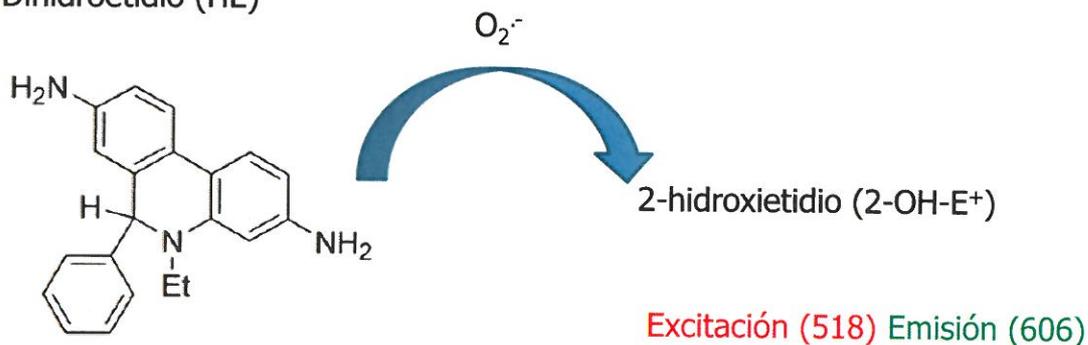
MEMORIA CIENTÍFICA

1) ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

Se ha evaluado el efecto de Tergum Maximum (TM) en la producción intracelular de anión superóxido en fibroblastos.

El dihidroetidio (Dhe, D11347, Life) es una molécula fluorescente altamente específica para la detección de anión superóxido celular siguiendo la reacción:

Dihidroetidio (HE)



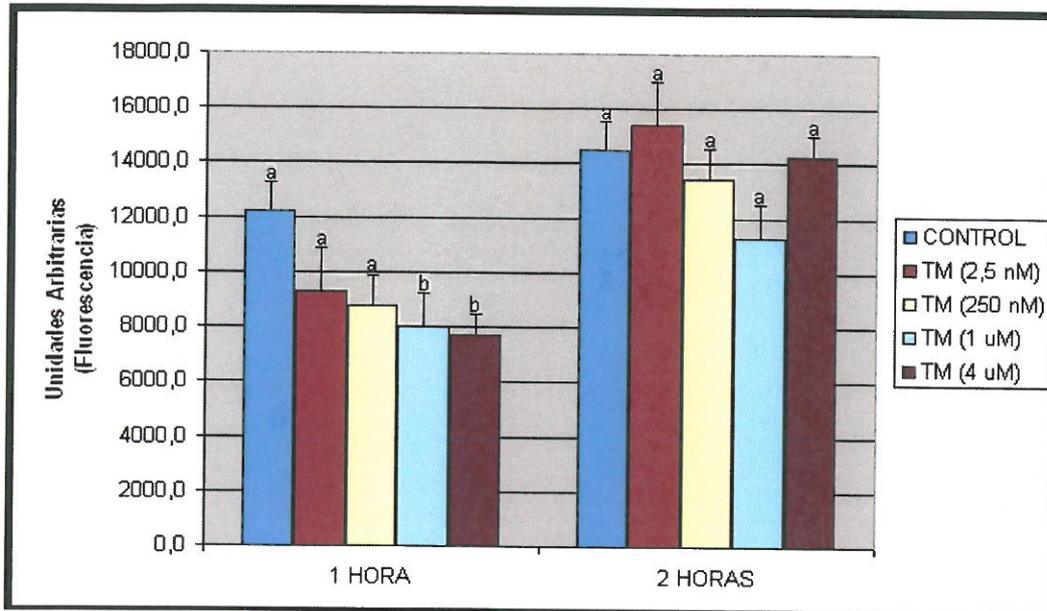


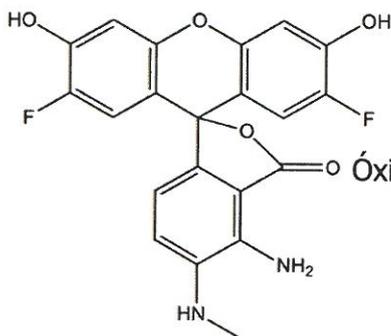
Figura 1: Regulación de la producción de anión superóxido por TM en fibroblastos

4-amino-5-metilamino-20,70-difluorofluoresceína (DAF-FM, D23842, Life) es una molécula fluorescente altamente específica para la detección de óxido nítrico siguiendo la reacción:

4-amino-5-metilamino-20,70-difluorofluoresceína

(DAF-FM)

← 4, 5-diaminofluoresceína (DAF-2)
Forma fluorinada



→ Triazol, DAF-FM-T

Óxido nítrico+productos oxidados
(N_2O_3 , ácido nitroso)

Excitación (495) Emisión (515)

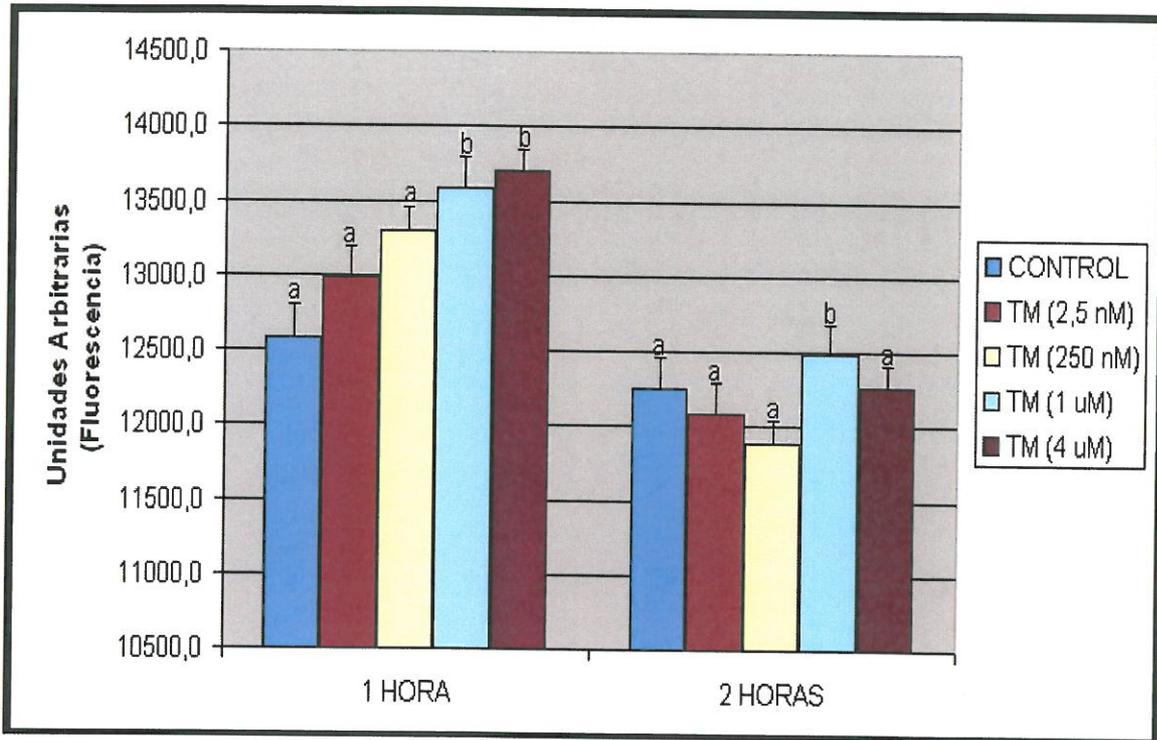
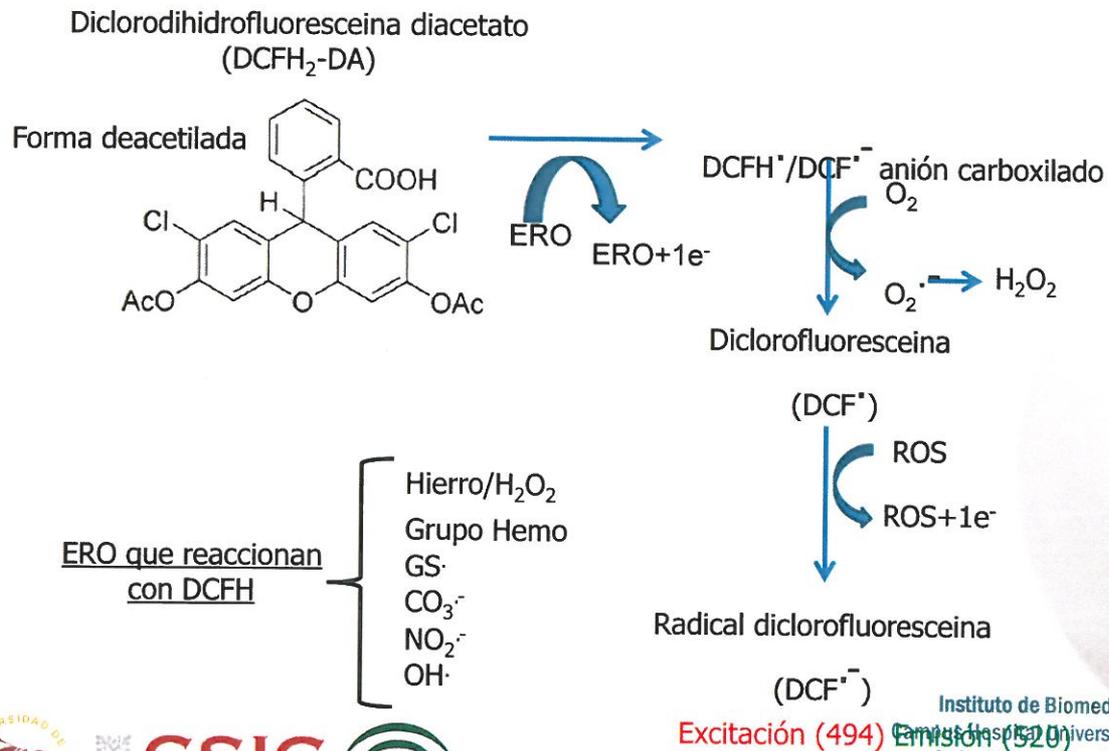


Figura 2: Regulación de la producción de óxido nítrico por TM en fibroblastos

Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA, D399, Life) es una molécula fluorescente altamente específica para la detección de especies reactivas de oxígeno (ERO) siguiendo la reacción:



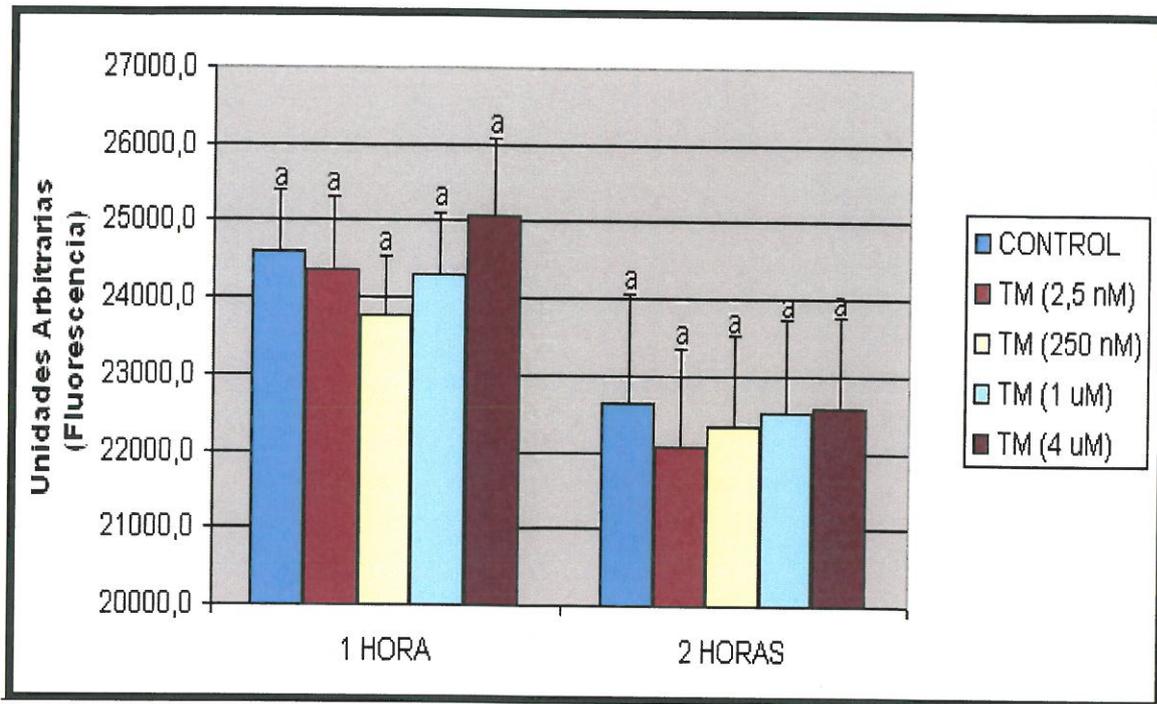
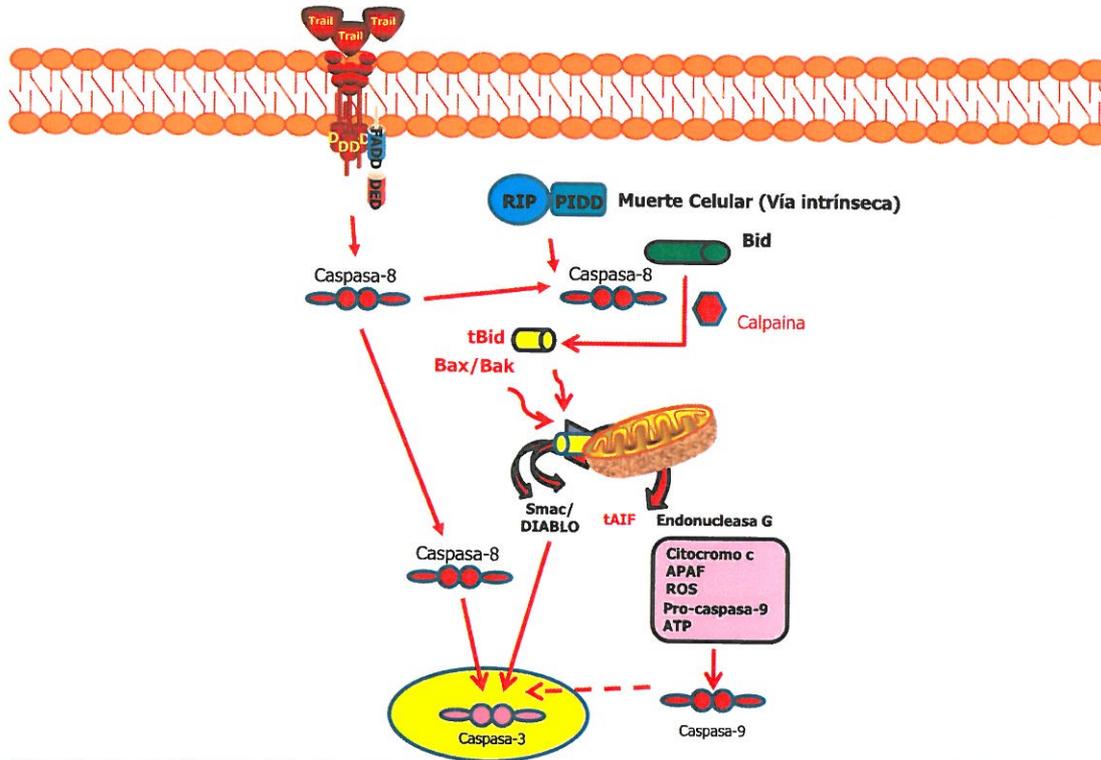


Figura 3: Regulación de la producción de ERO por TM en fibroblastos

2) REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR (APOPTOSIS)

La muerte celular se puede inducir a través de la vía extrínseca e intrínseca como se describe a continuación:

Receptores de muerte celular (Vía extrínseca)



La determinación de la actividad caspasa-3 es un adecuado marcador de la muerte celular por apoptosis. La medición de caspasa-3 en el lisado celular se basa en el uso de sustratos comerciales que son específicamente rotos por la caspasa-3 generando una señal quimioluminiscente (G8091, Promega).

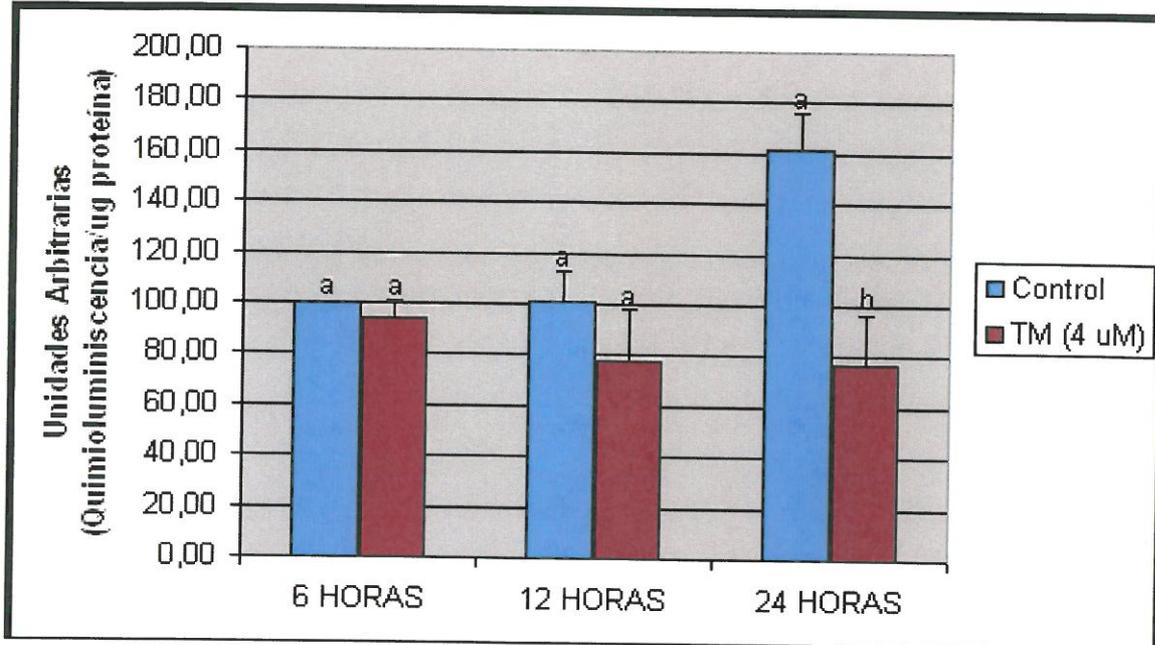


Figura 4: Regulación de la actividad caspasa-3 por TM en fibroblastos

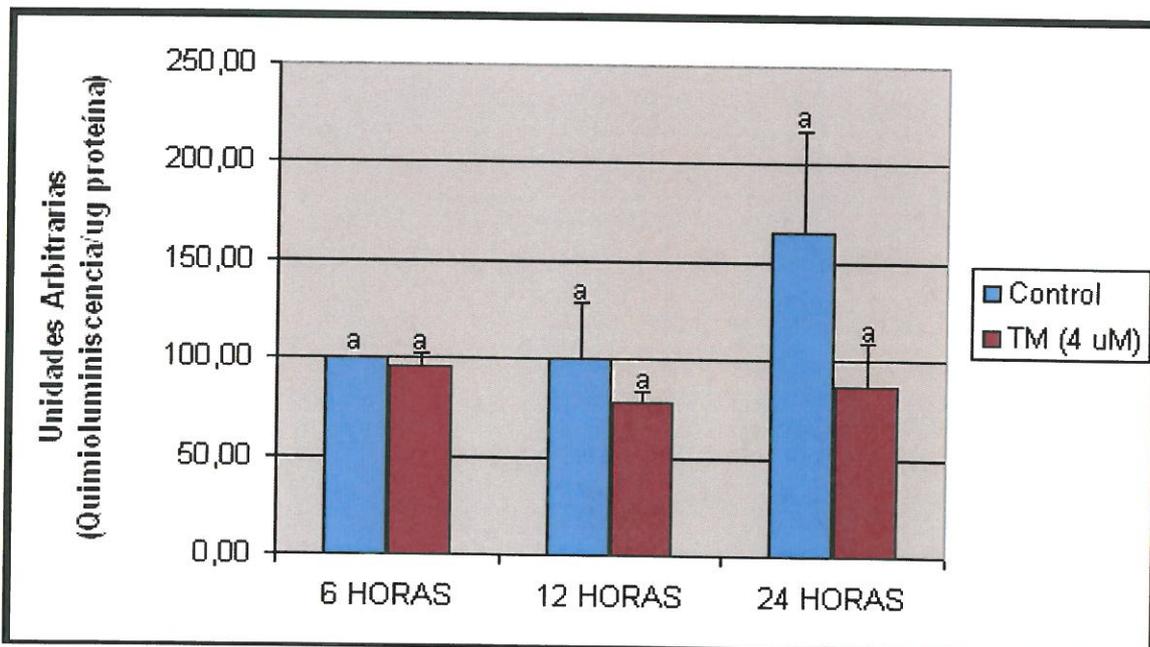


Figura 5: Regulación de la actividad caspasa-3 por TM en queratinocitos

4) REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La activación de la proliferación celular está acoplada a la progresión del ciclo celular y transcripción del DNA (Figura 6).

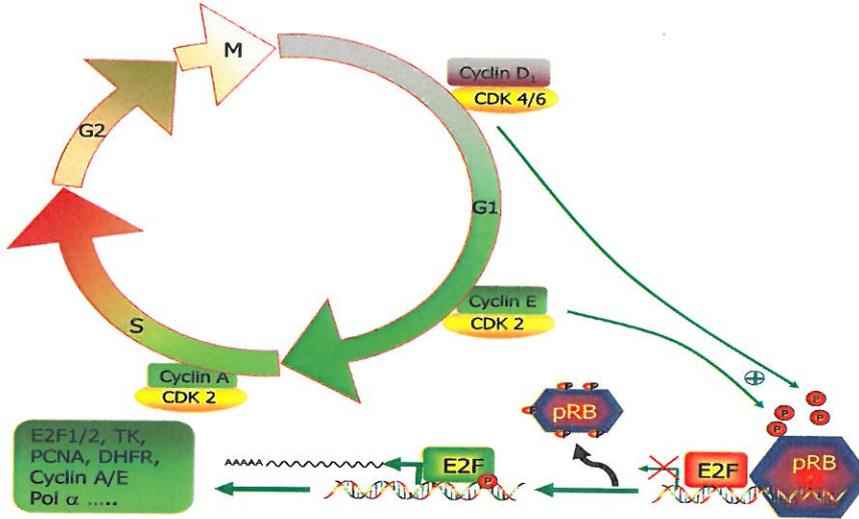


Figura 6: Esquema del ciclo celular

El procedimiento para la valoración de la proliferación celular se basa en la medición de la incorporación de bromo-deoxiuridina con anticuerpos específicos (Cat N° 11669915001, Roche)

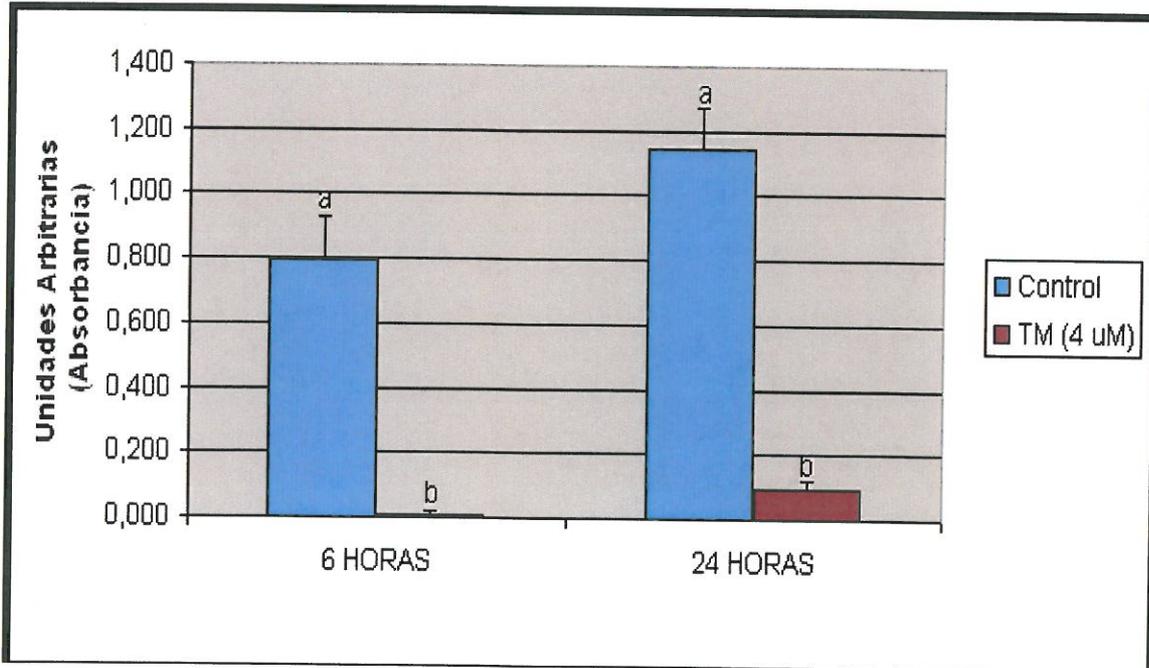


Figura 7: Regulación de la proliferación celular por TM en fibroblastos.

CONCLUSIONES

- 1) TM reduce la producción de anión superóxido y óxido nítrico de forma dosis dependiente a tiempos cortos (1 hora) en fibroblastos.
- 2) El tratamiento no cambia la producción de ERO.
- 3) TM reduce la apoptosis (24 horas) en fibroblastos y queratinocitos.
- 4) El efecto anti-apoptótico de TM se relaciona con una drástica reducción de la proliferación en fibroblastos (6 y 24 horas).

IMPACTO CIENTÍFICO

De los resultados del presente proyecto se deriva que el producto a testar desarrollado por TERGUM S.L. denominado Tergum Maximum (TM) presenta actividad antioxidante frente a radicales libres de oxígeno (ERO) con incremento asociado de la producción de óxido nítrico. La repercusión biológica de este hecho comporta la demostración de efectos beneficiosos tisulares de tipo vasodilatador. Este efecto beneficioso se relaciona con una actividad citoprotectora caracterizada por reducción de la muerte celular de tipo apoptótico en fibroblastos y queratinocitos. De forma interesante, el producto TM es capaz de bloquear fuertemente la proliferación de las células lo que podría tener un impacto relevante en la reparación celular, así como en la prevención de los procesos de malignización celular.

Firmamos este informe en Sevilla a 11 de Noviembre del 2014

Dr. Jordi Muntané Relat
Investigador Principal del Convenio

Visto Bueno,

Dr. José López Barneo
Director Científico del IBiS

