



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**El ácido nordihidroguayarático protege de estrés oxidante  
a monocitos humanos (THP-1)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ULISES EHATL JUÁREZ FIGUEROA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. SILVIA GUZMÁN BELTRÁN  
2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ  
Director General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**El ácido nordihidroguayaretico protege de estrés oxidante a monocitos humanos (THP-1)**

realizado por **Juárez Figueroa Ulises Ehatl** con número de cuenta 3-0328476-7 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. José Pedraza Chaverri

Propietario Dra. María Elena del Carmen Flores Carrasco

Propietario Dra. Silvia Guzmán Beltrán  
Tutora

Suplente Med. Cir. Francisco Javier Urrea Ramírez

Suplente M. en C. Susana González Reyes

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 29 de marzo de 2011

EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/CZS/cigs



## ÍNDICE

	Pagina
Resumen	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)	3
1.1.1 Formación de ERO	4
1.1.2 Función de las ERO	5
1.2 SISTEMA ANTIOXIDANTE	6
1.3 ESTRÉS OXIDANTE	8
1.4 YODOACETATO	11
1.5 PERÓXIDO DE HIDROGENO	12
1.6 ÁCIDO NORDIHIDROGUAYARÉTICO (NDGA)	12
1.6.1 Efecto protector del NDGA	14
1.7 MONOCITOS Y MACRÓFAGOS HUMANOS	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 GENERAL	19
4.2 PARTICULARES	19
5. ESTRATEGIA GENERAL	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 REACTIVOS	21
6.2 CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR DE MONOCITOS HUMANOS (THP-1)	21
6.3 PRUEBAS DE TOXICIDAD EN LAS CÉLULAS THP-1	22

6.3.1	NDGA	22
6.3.2	IAA	22
6.3.3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	23
6.4	EFEECTO DEL NDGA CONTRA LA MUERTE CELULAR GENERADA POR IAA Y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN MONOCITOS HUMANOS	23
6.5	CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	24
6.5.1	MTT	24
6.6	PRODUCCIÓN DE ERO EN LAS THP-1 EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDANTE	25
6.7	EFEECTO ANTIOXIDANTE DEL NDGA EN THP-1 EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDANTE	26
6.8	DETERMINACIÓN DE ERO <i>IN SITU</i>	26
6.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
7.	RESULTADOS	28
7.1	EFEECTO DEL NDGA EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1	28
7.2	EFEECTO DEL IAA EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1	29
7.2.1	Efecto del IAA sobre la viabilidad celular	29
7.2.2	Efecto del IAA sobre la producción de ERO	31
7.3	EFEECTO DEL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN LOS MONOCITOS HUMANOS (THP-1)	33
7.3.1	Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la viabilidad celular	33
7.3.2	Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la producción de ERO	34
7.4	EFEECTO DEL NDGA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR IAA	36
7.5	EFEECTO DEL NDGA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A	38

## ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR IAA

7.6 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	39
7.7 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	47
10.REFERENCIAS	48
11.APÉNDICE	55



## Resumen

El ácido nordihidroguayarático (NDGA) es un potente antioxidante, el cual puede neutralizar diversas especies reactivas de oxígeno (ERO). El NDGA se ha usado ampliamente contra el daño generado en diferentes modelos de estrés oxidante en animales y cultivos celulares.

El yodoacetato (IAA), es un inhibidor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, el cual induce un déficit energético, generando una producción exacerbada de ERO. Otro oxidante que puede causar daños severos a la célula es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este compuesto es una ERO *per se*, tiene la capacidad de atravesar membranas celulares y puede dar lugar a la formación del radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del NDGA sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1 expuestos a estrés oxidante generado por IAA y  $H_2O_2$ . El esquema experimental fue: (i) establecer las concentraciones inocuas de NDGA en los monocitos humanos THP-1; (ii) determinar el valor de la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de IAA y  $H_2O_2$ , además de establecer un modelo de estrés oxidante con ambos compuestos; (iii) evaluar si concentraciones de 10 y 20  $\mu M$  de NDGA protegen 16 h después de pre-incubarlo en los monocitos humanos THP-1, de la muerte celular generada por IAA y  $H_2O_2$ ; (iv) cuantificar la producción de ERO generadas por IAA y  $H_2O_2$  (mediante la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, DCFH-DA); (v) determinar si el NDGA previene la generación de ERO y la muerte celular.

Se encontró que las concentraciones inocuas de NDGA en los monocitos humanos THP-1 estuvieron entre 1 y 25  $\mu M$  a las 24 h de incubación. Y se usó 10 y 20  $\mu M$  de NDGA para evaluar su efecto.

Por otro lado se determinó que tanto el IAA como el  $H_2O_2$ , producen muerte celular y exacerbaban la producción de ERO en un 300% y 150%, respectivamente. Las concentraciones de IAA y  $H_2O_2$  que causaron un 50% de muerte celular ( $CI_{50}$ ) fueron de 52.64  $\mu M$  y 9.34 mM, respectivamente.

Finalmente se demostró que el NDGA previene significativamente la muerte celular por estrés oxidante cuando las células se pre-incuban por 16 h con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de NDGA antes del tratamiento con IAA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dicha protección se asoció a la disminución de la producción de ERO con respecto al control sin NDGA.

## 1. ANTEDECENTES

### 1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO)

Las ERO son especies químicas que están incompletamente reducidas y son más reactivas que el oxígeno, y pueden ser o no radicales libres (Tabla 1).

Los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1999). Lo anterior, hace a las moléculas muy inestables y reactivas, con un período de vida media muy corto, menor a 10 segundos.

Las especies con radicales libres reaccionan rápidamente con la molécula más cercana al sitio donde son formadas para poder estabilizarse (Bergendi *et al.*, 1999). Las especies reactivas no radicales son moléculas que en su conformación electrónica no poseen electrones desapareados, pueden dar lugar a la formación de otras ERO más tóxicas como al radical  $\text{OH}^\bullet$  que se forma a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.**

Radicales	No radicales
Superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^\bullet$ )	Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )
Hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ )	Ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ )
Peroxilo ( $\text{RO}_2^\bullet$ )	Nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ )
Alcoxilo ( $\text{RO}^\bullet$ )	Acido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ )
Carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ )	Ácido hipobromoso ( $\text{HOBr}$ )
Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$ )	Ozono ( $\text{O}_3$ )
Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) forma $^1\Sigma^+$	Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) forma $^1\Delta_g$

(Tomada de Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2005)

### 1.1.1 Formación de ERO

Las ERO son constantemente generadas como resultado del metabolismo aerobio. Uno de los principales procesos de formación de  $O_2^{\bullet-}$  se da en la cadena respiratoria mitocondrial. En el complejo 1 (NADH-oxidoreductasa ubiquinona) y en el complejo 3 (ubiquinol citocromo *c*-reductasa) se lleva a cabo la mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  [Figura 1]. También enzimas como el citocromo P450, ciclooxigenasas, lipooxigenasas y la xantina oxidasa pueden producir  $O_2^{\bullet-}$ . Otra fuente de producción de  $O_2^{\bullet-}$  es la auto-oxidación de flavonoides, hidroquinonas, tioles y metales libres o unidos a proteínas (Curtin *et al.*, 2002).

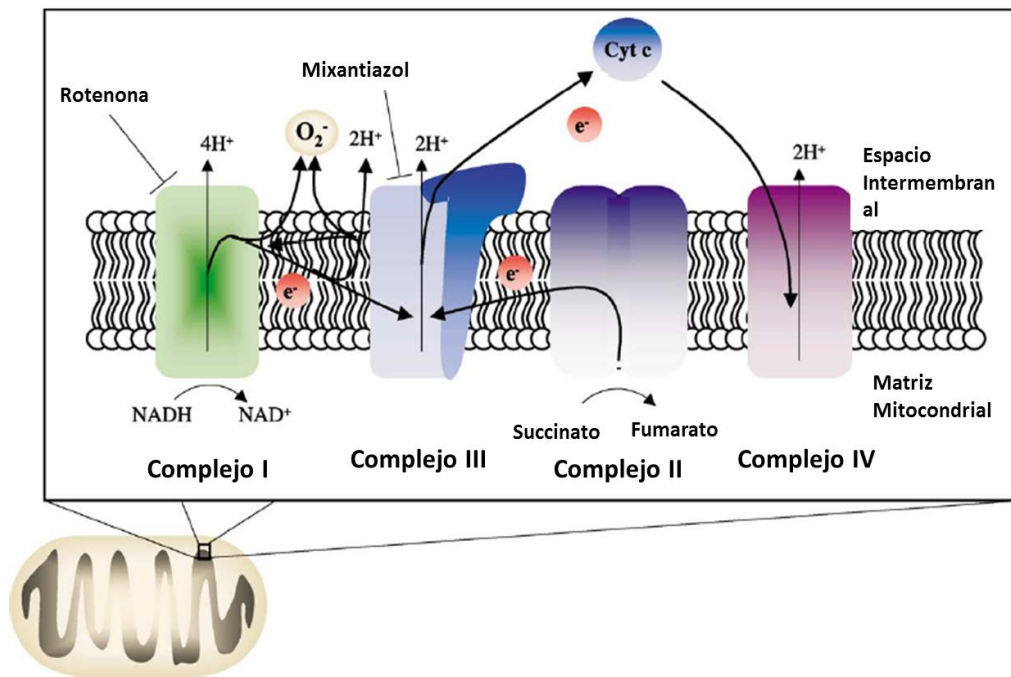


Figura 1. Diagrama ilustrado de las subunidades mayores de la cadena de transporte de electrones (CTE) y sitios de producción de  $O_2^{\bullet-}$ . Los electrones entran en la CTE en el complejo I (NADH-oxidoreductasa ubiquinona) o en el complejo II (succinato deshidrogenasa) seguido de la oxidación de NADH y succinato, respectivamente. La ubiquinona es un acarreador de electrones liposoluble; los electrones son acarreados del complejo I y II al complejo III (ubiquinol citocromo *c*-reductasa). El  $O_2^{\bullet-}$  puede ser producido en ambos complejos I o III. Esto se debe a la formación de semiquinonas en ambos complejos resultando en la formación de  $O_2^{\bullet-}$ . La rotenona y el mixantiazol, inhibe el transporte de electrones en el complejo I y III, respectivamente; esta inhibición se puede usar para prevenir el incremento en la producción del superóxido por la mitocondria (Curtin *et al.*, 2002).

La formación de  $H_2O_2$  se debe a la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  la cual ocurre espontáneamente o por presencia de pH bajos. Sin embargo esta reducción del  $O_2^{\bullet-}$  puede ser catalizada por la familia de enzimas superóxido dismutasas (SOD) produciendo  $H_2O_2$ , el cual tiene la capacidad de atravesar las membranas. Dentro de la célula en presencia de iones metálicos como el  $Fe^{2+}$  o  $Cu^{2+}$  se produce la reacción de Fenton y se forma el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). Otra reacción de producción de  $OH^{\bullet}$  es la de Haber-Weiss la cual realiza una catálisis metálica involucrando al  $Fe^{3+}$  o  $Cu^{2+}$  libre o secuestrado de complejos nucleicos de hierro, ferritina, lactoferrina, hemoglobina y mioglobina. También es muy frecuente la desaminación de L-arginina a L-citrulina la cual es catalizada por la sintasa del óxido nítrico (NOS), generando óxido nítrico (NO) el cual no es altamente reactivo *per se*, pero cuando interactúa con  $O_2^{\bullet-}$  o con metales de transición genera productos que afectan la funcionalidad de las macromoléculas. Otro factor que genera ERO es la luz visible, la luz ultravioleta, la radiación ionizante con la interacción de materiales biológicos (Genestra, 2007; Cercarini *et al.*, 2007; Curtin *et al.*, 2002; Bartosz, 2009; Matés *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Función de las ERO

Las ERO tienen un amplio papel fisiológico en la señalización de diferentes procesos como: apoptosis, proliferación celular, regulación transcripcional y en respuesta de células del sistema inmune (Valko *et al.*, 2006; Bartosz, 2009; Bergendi, 1999)

Las ERO participan en la coordinación y potenciación de la activación de los receptores a factores de crecimiento por la influencia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), las cuales están relacionadas con la proliferación celular, apoptosis y necrosis. La sensibilidad al glutatión debida al  $H_2O_2$  activa a las MAPKs. Las fosfatasa unidas a la membrana son necesarias para la defosforilación, las cuales contienen residuos de cisteína sensibles a redox, que cuando existen niveles altos de ERO se inactivan. Esta cascada de

señalización activa los receptores de los factores de crecimiento (Dröge, 2002; Seifried *et al.*, 2007).

Un ejemplo en el cual las ERO participan en la transducción de señales, es en la actividad del factor nuclear kapa potenciador de la cadena ligera de células B activadas (NFκB), el cual participa en una amplia variedad de procesos biológicos como inflamación, control de crecimiento y apoptosis, entre otros. Hay dos formas en que las ERO puede afectar a NFκB; la primera es que pueden degradar al IκB inhibidor de NFκB, incrementando sus niveles en el núcleo y favoreciendo la unión ADN-NFκB. Y la segunda aumentando directamente su transcripción (Seifried *et al.*, 2007).

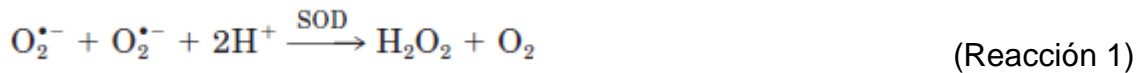
La participación de las ERO en el inicio de la respuesta del sistema inmune contra la invasión de los patógenos. En células fagocíticas la producción de ERO es un evento crítico para iniciar la fagocitosis y subsecuentemente la eliminación del microorganismo invasor (Bogdan *et al.*, 2000). Este evento de producción de niveles elevados de ERO, mejor conocido como “estallido respiratorio” se debe a la actividad de la NADPH oxidasa la cual cataliza la transferencia de un electrón del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) al O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que puede formar ERO más dañinas como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup> y HOCl, que son esenciales en la defensa contra los patógenos (Wientjes y Segal, 1995; Babior, 2004).

## 1.2 SISTEMA ANTIOXIDANTE

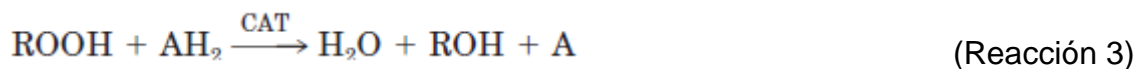
Las células poseen un sistema antioxidante celular endógeno, el cual puede ser enzimático y no enzimático, para poder mantener la homeostasis en el sistema redox.

Dentro del sistema antioxidante enzimático se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), entre otras. La SOD es la enzima que cataliza la dismutación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción 1), el cual puede ser eliminado por CAT o GPX. Existen tres formas de SOD, la

citoplasmática (Cu/Zn-SOD), la mitocondrial (Mn-SOD) y la extracelular (EC-SOD) (Valko *et al.*, 2006; Genestra, 2007)

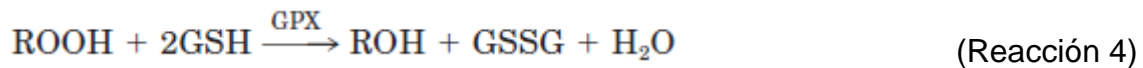


La CAT es una enzima tetramérica que consta de cuatro subunidades de 60 kDa idénticas, que contiene un grupo ferriprotoporfirina por subunidad, tiene una masa molecular de alrededor de 240 kDa. La CAT se encuentra en mitocondrias y peroxisomas, dismuta eficientemente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar agua y oxígeno molecular, además reacciona con actividad de peroxidasa con donadores de hidrógeno (metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles), reacciones 2 y 3 (Pedraza-Chaverri y Cardénas-Rodríguez, 2005; Valko *et al.*, 2006).



El sistema del glutatión (GSH) es uno de los mecanismos de defensa antioxidante más importante, y donde la participación de la GPX (80 kDa) es indispensable en la reducción de hidroperóxidos utilizando GSH, a fin de proteger a las células contra el daño oxidante (reacción 4).

El GSH es altamente abundante en el citosol (1-11 mM), núcleo (3-15 mM) y mitocondria (5-11 mM). El GSH se encuentra en estos compartimientos debido a que es sintetizado en el citosol, después es transportado por proteínas acarreadoras a la mitocondria dependientes del gradiente de concentración. En el núcleo mantiene la homeostasis redox, debido a que existen proteínas sulfidrilicas de vital importancia en la reparación y expresión de ADN. La proporción de GSH/GSSG es un buen indicador en la determinación de estrés oxidante en los organismos, debido a que el glutatión oxidado se acumula dentro de las células (Valko *et al.*, 2006).



Por otra parte el sistema antioxidante está integrado por compuestos con estructuras formadas por grupos tiol (GSH), hidroxilo (ácido ascórbico), protones transferibles (dimetiltiourea: DMTU), anillos aromáticos ( $\alpha$ -tocoferol), fenoles (guayacol), polifenoles (ácido nordihidroguayarático: NDGA) y dobles enlaces conjugados (licopenos). Estos compuestos pueden reaccionar directamente con las ERO para proporcionarles estabilidad o inhibirlas (Pedraza-Chaverri y Cárdenas-Rodríguez, 2005, Valko *et al.*, 2006; Rocha, 2005).

### 1.3 ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante se define como la pérdida de la homeostasis del sistema redox; en la célula es el desequilibrio entre agentes oxidantes y el sistema antioxidante celular, el cual es generado por un incremento en la producción de ERO, un déficit en el sistema antioxidante endógeno o por ambos procesos. Este desbalance provoca un gran daño a las diferentes biomoléculas como es la oxidación de proteínas, lipoperoxidación y fragmentación del ADN (Halliwell y Gutteridge, 1999; Harrison *et al.*, 2003; Bartosz, 2009).

La oxidación proteica catalizada por metales es el mecanismo más común de daño por estrés oxidante, debido a la introducción de grupos carbonilo en los residuos aminoácidos. En este proceso se requiere de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la presencia de iones como el  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . La catálisis se da en los sistemas oxidantes como el nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH)-NADPH oxidasa. Los iones metálicos se unen en un sitio específico dentro de la proteína y reaccionan con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generando  $\text{OH}^\bullet$ , que ataca a los residuos de aminoácidos cercanos al sitio de unión al metal (Cecarini *et al.*, 2007).



Las ERO también pueden inducir la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas por dos vías distintas: vía diamida o vía amidación- $\alpha$ . El  $\text{OH}^\bullet$ , generado de la radiolisis del agua o del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reacciona con proteínas para formar agua y un radical carbono-centrado (radical alquilo). Este radical puede a continuación actuar como puente de unión con otro radical alquilo y formar agregados proteicos o reaccionar con el  $\text{O}_2$  para generar un radical peróxido-alquilo. Este puede ser convertido por la acción de un  $\text{Fe}^{2+}$  o un  $\text{HO}_2^\bullet$  a un peróxido de alquilo. El peróxido de alquilo puede transformarse a un radical alquilo por  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$  o por una reacción de dismutación para producir un radical alcoxilo (Cecarini *et al.*, 2007).

La lipoperoxidación (LPO) es el proceso por el cual los lípidos sufren oxidación; esto induce daños en la estructura, la integridad, la fluidez, la permeabilidad y la funcionalidad de las biomembranas. También modifica las lipoproteínas de baja densidad a formas pro-aterogénicas y proinflamatorias, generando productos potencialmente tóxicos. La LPO se lleva a cabo por tres procesos, el primero es por medio de radicales libres a través de un mecanismo en cadena, iniciando con un radical libre (como el  $\text{OH}^\bullet$ ) que puede oxidar varias moléculas de lípidos. Este primer proceso empieza con la abstracción del hidrógeno bis-alílico de ácidos grasos poliinsaturados originando radicales alquilo, los cuales se rearreglan en una conformación estable cis-trans de radicales pentadienilo; posteriormente al unirse un oxígeno a los radicales pentadienilo se forman radicales lipoperoxilo. El siguiente paso se da por la liberación del oxígeno del radical peroxilo originando oxígeno y radicales pentadienilo, los cuales rápidamente reaccionan con el oxígeno dando una forma preferencialmente más estable termoquímicamente trans-trans que cis-trans. Por último la adición intramolecular del radical peroxilo a una doble unión para dar un producto tipo prostaglandina bi-cíclica (Niki, 2009) [Figura 2].

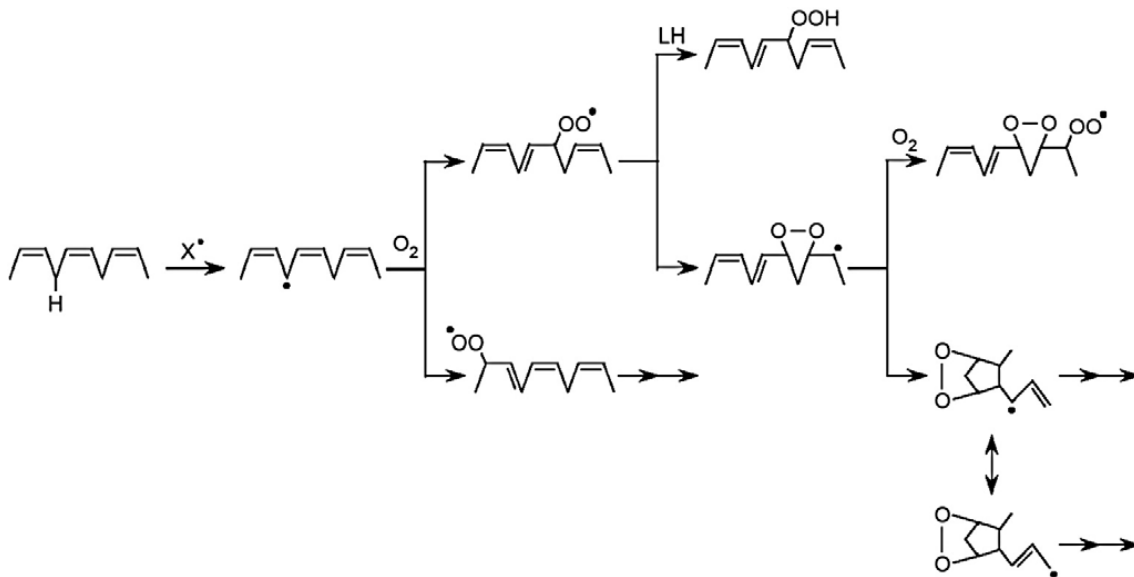


Figura 2. Vías de lipoperoxidación mediada por radicales libres. (Ilustración tomada de Niki, 2009).

Otro proceso de LPO es la no enzimática o en ausencia de radicales. Un ejemplo de esto se da con las mieloperoxidasas (MPO) que son hemo proteínas secretadas por fagocitos activados. Las MPO reaccionan con el  $H_2O_2$  en presencia de cloruro y bromuro generando los oxidantes ácido hipocloroso (HOCl) y ácido hipobromoso (HOBr) respectivamente, que pueden oxidar a las biomoléculas por vías radicales libres o no radicales. Además se reportó que las MPO y tirosina producen radical tirosilo el cual induce LPO (Niki, 2009).

La oxidación enzimática también genera LPO. La lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasa (COX) oxidan al ácido araquidónico a ácido hidropoxieicosatetraeónico (HPETE), prostanglandinas, prostanciclinas, tromboxanos, y leucotrenos. COX y LOX oxidan lípidos regio-, estereo- y enantioméricamente de manera específica (Niki, 2009).

El efecto oxidante sobre los ácidos nucleicos se debe en mayor medida a la presencia del  $OH^\bullet$ , ya este que puede reaccionar con todos los componentes del ADN, puede dañar tanto bases púricas como pirimidínicas y también a la desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1999). Además el daño puede consistir en

rompimientos de cadena simple o de cadena doble. Uno de los procesos de oxidación del ADN más estudiados es el 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) y se estima que sucede aproximadamente una lesión por cada millón de pares de bases (Sedelnikova *et al.*, 2010).

#### **1.4 YODOACETATO**

El yodoacetato (IAA) es un agente alquilante, que puede modificar a los grupos tiol por unión covalente a las proteínas, mediante un proceso llamado S-carboximetilación. Este proceso se caracteriza por ser irreversible debido a que modifica químicamente a las enzimas, sin establecer un equilibrio con las enzimas libres o con el complejo enzima sustrato (Schmidt y Dringen, 2009; Uto *et al.*, 1995).

El IAA es utilizado ampliamente como un inhibidor de la glucólisis. Este compuesto actúa sobre la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), la cual cataliza la transformación del gliceraldehído 3 fosfato a el 1,2-bifosfoglicerato, un compuesto de alta energía además de la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . El IAA actúa irreversiblemente sobre el grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína en el sitio activo de la enzima con lo que evita la formación del tiohemiacetal. Además este compuesto alquilante inhibe la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima clave en la ruta de las pentosas fosfato (Fahim *et al.*, 2003).

Se ha descrito que altas concentraciones de IAA pueden inhibir la actividad de la glutatión sintetasa, la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática de eritrocitos humanos, la xantina oxidasa (XO) de la leche y también a la glutatión S transferasa (GST) en neuronas granulares de cerebelo (Awasthi *et al.*, 1975; Mosialou *et al.*, 1993; Gali y Board, 1997; Cárdenas, 2007)

## 1.5 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El  $H_2O_2$  es un compuesto que tiene la capacidad de atravesar membranas celulares y aunque químicamente es poco reactivo, no oxida rápidamente a las biomoléculas a menos de que posean grupos tioles (Halliwell y Gutteridge, 1999; Levine *et al.*, 1999). El  $H_2O_2$  es peligroso por su facilidad de conversión a radical  $OH^\bullet$  ante diversos factores como la luz UV o por la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El aumento en la concentración celular de  $H_2O_2$  se puede presentar por diversos factores como infecciones, hemodiálisis, fibrosis pulmonar e inclusive por fumar (Chandramathi *et al.*, 2009; Rysz *et al.*, 2007; Psathakis *et al.*, 2006; Guatura *et al.*, 2000). Pero también el aumento de  $H_2O_2$  puede ser consecuencia de la disminución de enzimas que catalizan su degradación o por un aumento en su producción, lo que hace que las células puedan sufrir daños y alteraciones por la constante oxidación (Miller *et al.*, 2008; Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1999; Dale *et al.*, 2008; López, 2009).

## 1.6 ÁCIDO NORDIHIDROGUAYARÉTICO (NDGA)

El ácido nordihidroguayarético (NDGA) se extrajo originalmente de la planta *Larrea tridentata* conocida como gobernadora o chaparral [Figura 3]. Se ha utilizado en la medicina tradicional mexicana para tratar más de 50 padecimientos como reumatismo, tuberculosis, diabetes, litiasis renal y biliar, cáncer, artritis, inflamación, etc. (Arteaga *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Flor *Larrea tridentata*

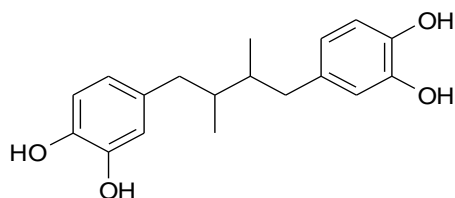
Esta planta es una notable fuente de productos naturales ya que aproximadamente el 50% del peso seco de sus hojas está constituido por metabolitos secundarios a los que se les ha encontrado alguna actividad biológica. La resina que cubre sus hojas produce alrededor de 19 agliconas flavonoides así como muchos lignanos, destacando entre estos últimos el antioxidante NDGA (Konno *et al.*, 1990).

Algunos flavonoides glicosilados, sapogeninas, saponinas, aceites esenciales, alcaloides halogenados, terpenoides, cetonas, esteroides y ceras también se aíslan de *Larrea tridentata* (Argueta, 1994; Romo de Vivar, 1985; Xue *et al.*, 1988; Lara y Márquez, 1996).

El NDGA es aproximadamente entre el 5 y el 10% del peso seco total de las hojas y el 80% de todos los compuestos fenólicos. En un estudio de la distribución de compuestos fenólicos secundarios se ha descrito que las flores, las hojas, tallos verdes y pequeños tallos leñosos contienen NDGA, con una alta concentración en hojas (38.3 mg/g) y en los tallos verdes (32.5 mg/g) (Hyder *et al.*, 2002).

El nombre químico del NDGA es 4-[4-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutil] benceno-1,2-diol, es un compuesto que tiene en su estructura cuatro grupos fenólicos. La

molécula tiene un peso molecular de 302.37 g/mol y un punto de fusión de 184.5°C [Figura 4].



**Fig. 4.** Estructura del NDGA

Se ha reportado que el NDGA tiene alta capacidad antioxidante ya que neutraliza a diversas ERO como son  $\text{ONOO}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HOCl}$  (Tabla 2). Además presenta mejor capacidad neutralizante frente a otros compuestos antioxidantes como: *N*-acetil-cisteína (NAC), glutatión (GSH), ácido úrico, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetiltiourea (DMTU), trolox y manitol (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

**Tabla 2.** Capacidad atrapadora del NDGA y de otros compuestos. Los datos estan expresados en  $\text{Cl}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ).

	$\text{ONOO}^-$	$^1\text{O}_2$	$\text{HO}^\bullet$	$\text{O}_2^{\bullet-}$	$\text{HOCl}$
<b>NDGA</b>	4.0 ± 0.9	151 ± 19	0.15 ± 0.02	15 ± 1	622 ± 42
<b>Ácido Úrico</b>	13.1 ± 1.7				
<b>Penicilamina</b>	31.4 ± 3.2				
<b>Acido lipoico</b>		4.067 ± 174*			858 ± 85
<b>NAC</b>		6.844 ± 585*		3.600 ± 480*	996 ± 76
<b>GSH</b>		7.023 ± 323*		5.400 ± 970*	
<b>DMTU</b>		1.689 ± 289*	106 ± 10*		
<b>Trolox</b>			174 ± 16*		
<b>DMSO</b>			247 ± 14*		5.103 ± 293*
<b>Manitol</b>			3.304 ± 197*		
<b>Tempol</b>				7.100 ± 780*	
<b>DFO</b>				8.200 ± 350*	

NDGA: ácido nordihidroguayarético, NAC: *N*-acetil- cisteína, GSH: glutatión, DFO: deferoxamina, DTMU: dimetil thiourea, DMSO: dimetil sulfóxido. \* $p < 0.001$  contra el NDGA (Tomada de Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

### 1.6.1 Efecto protector del NDGA.

Diferentes grupos de trabajo se han enfocado en el uso de antioxidantes como una nueva herramienta en contra de diferentes patologías como la aterosclerosis,

cáncer, *diabetes mellitus*, hipertensión y enfermedades neurodegenerativas. Es importante recalcar que estas alteraciones han sido vinculadas al estrés oxidante (Harrison *et al.*, 2003; Nishikawa, 2009; MacNee, 2001; Harman, 1992; Dumont y Beal, 2010).

Se ha estudiado el efecto del NDGA en diferentes modelos de carcinogénesis Soriano y colaboradores (1999), descubrieron que el NDGA tiene una actividad quimioprotectora en líneas celulares de cáncer pulmonar, debido a que puede suprimir el crecimiento de éstas. En otro estudio se demostró que la adición de 0.1% de NDGA en el agua de ratones atípicos con tumores de células cancerígenas en pulmón, disminuye significativamente el crecimiento de estas células con respecto a los ratones sin la administración de NDGA, debido a la inhibición de la lipooxigenasa (Moody, 1998).

Otros investigadores han realizado estudios sobre los beneficios que tiene el NDGA sobre desórdenes neurológicos. Cárdenas-Rodríguez y colaboradores (2009) demostraron que el NDGA previene el daño neuronal por estrés oxidante inducido por yodoacetato en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata. En otro estudio realizado con neuronas del hipocampo de ratas se demostró que el NDGA previene lesiones neuronales y acumulación de ERO. También se observó que los cultivos neuronales fueron protegidos contra la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\alpha\beta$ ); la acumulación de ERO y calcio intracelular inducidas por  $\alpha\beta$  fue suprimida (Goodman *et al.*, 1994).

## **1.7 MONOCITOS Y MACRÓFAGOS HUMANOS**

Los monocitos humanos son parte fundamental en la respuesta inmune innata y adquirida, ya que son los precursores de los macrófagos que funcionan como células fagocíticas y presentadoras de antígeno (Baran *et al.*, 2004). Los monocitos son células de origen mieloide producidos en la médula ósea, y derivan de una célula hematopoyética pluripotencial; tienen un tamaño aproximado de 14

µm, con un tiempo de vida muy corto de aproximadamente entre 48-72 h en el cuerpo.

Su función principal es la defensa del organismo contra diferentes microorganismos los cuales son reconocidos a través de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos. Entre estos receptores se encuentran los receptores de manosa, scavenger y los tipo Toll (Beutler, 2002). Al encontrarse con un patógeno, el macrófago lo fagocita y se activa iniciando así diferentes procesos claves para la eliminación del patógeno los cuales incluyen producción de proteasas, ERO y citocinas (Baran *et al.*, 2004).

Los macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígenos en la respuesta inmune adaptativa debido a que expresan el complejo principal de histocompatibilidad tipo II. Cuando son activados por algún patógeno inician la producción de citocinas y ERO. Entre las citocinas producidas por el macrófago activado se encuentran la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), la interleucina 8 (IL-8), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). La MCP-1 induce el reclutamiento de monocitos, IL-8 promueve el reclutamiento de neutrófilos, M-CSF favorece la supervivencia de los monocitos y el TNF-α es una citocina pro-inflamatoria; todo esto es necesario para poder responder de manera orquestada contra el patógeno, sin embargo, pueden ocurrir desbalances en esta respuesta y llegar a producir una enfermedad inflamatoria perjudicial en el sitio afectado (Baran *et al.*, 2004).

Las ERO son parte esencial en el buen funcionamiento de los monocitos humanos, participando en la eliminación de los patógenos fagocitados, sin embargo, no es su único papel, por ejemplo, el óxido nítrico (NO) actúa como una molécula de señalización intracelular en el proceso de apoptosis, participa en la distribución del flujo sanguíneo, la relajación vascular y la angiogénesis (Baran *et al.*, 2004).



## 2. JUSTIFICACIÓN

El NDGA es un potente antioxidante, ya que protege de estrés oxidante a las células en modelos como neuronas granulares de cerebelo de rata y en células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo, además es capaz de neutralizar *in vitro* a diversas especies reactivas de oxígeno como:  $\text{ONOO}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HOCl}$ . Además se ha demostrado *in vivo* que a bajas concentraciones (100  $\mu\text{M}$ ) no tiene efecto citotóxico en células de rata como neuronas y riñón, entre otras. Por otro lado la administración del NDGA en forma intraperitoneal y oral en ratas, tiene efectos quimioprotectores sobre células cancerígenas. Lo anterior ha permitido que se emplee en diversos modelos animales con patologías como Alzheimer, cáncer y aterosclerosis, las cuales se han vinculado con el estrés oxidante.

Sin embargo, el efecto del NDGA sobre las células del sistema inmune con alteraciones como hipoglucemia e hipoxia, aún no se ha reportado. Con el presente trabajo se pretende establecer un modelo químico de estrés oxidante en monocitos humanos generado por yodoacetato y peróxido de hidrógeno y evaluar el efecto protector del NDGA sobre la viabilidad celular y la producción de ERO.

### 3. HIPÓTESIS

Ya que el NDGA tiene gran capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* se espera que este compuesto pueda prevenir la muerte celular y la producción de ERO en la línea celular de monocitos humanos THP-1 incubadas en presencia de IAA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **4. OBJETIVOS**

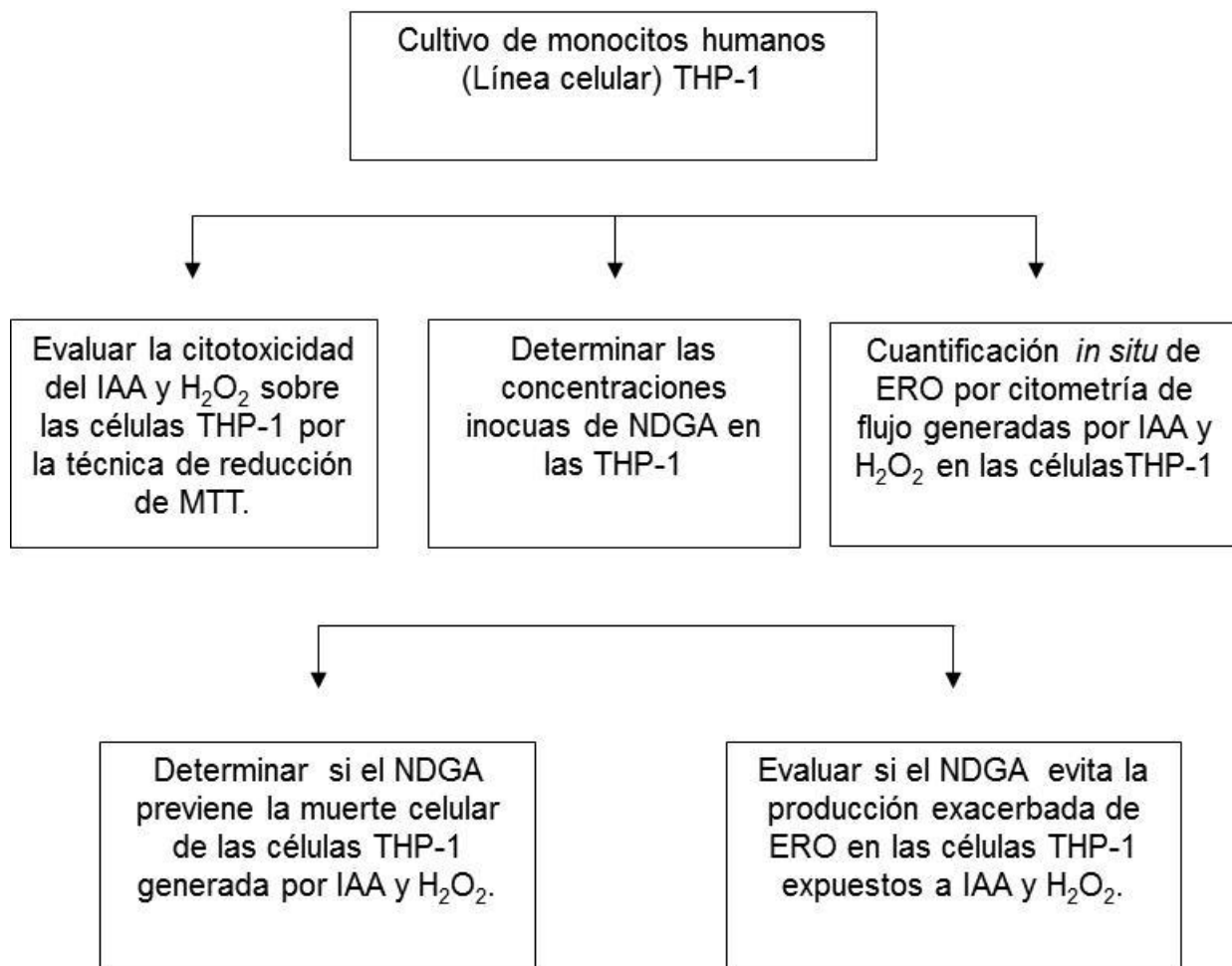
### **4.1 GENERAL**

Determinar el efecto antioxidante del NDGA sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1 cuando son expuestos a condiciones oxidantes generadas por IAA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto del NDGA sobre la viabilidad celular y la generación de ERO en la línea celular THP-1.
- Producir condiciones de estrés oxidante por IAA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células THP1.
- Determinar el efecto del NDGA sobre la muerte celular y la producción de ERO inducidos por IAA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células THP-1.

## 5 ESTRATEGIA GENERAL



## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 REACTIVOS**

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich, ácido nordihidroguayarático (NDGA), yodoacetato (IAA), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difenil-2H- tetrazolio (MTT), medio RPMI 1640, 2-mercapto etanol, dimetil sulfóxido (DMSO). El azul de tripano se obtuvo de Gibco. La solución salina balanceada Hanks (HBSS), la penicilina-estreptomicina, el HEPES y la L-glutamina se obtuvieron de Bio Whittaker. La sonda 2',7'-dichlorofluoresceína diacetato (DFCH-DA) se obtuvo de Invitrogen. El piruvato de sodio y el suero fetal bovino se obtuvieron de Lonza. El 2-propanol y el ácido clorhídrico (HCl) se obtuvieron de Merck.

### **6.2 CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR DE MONOCITOS HUMANOS (THP-1)**

La línea celular de monocitos humanos THP-1 se obtuvo de la colección de cultivo americana (ATCC por sus siglas en inglés American Type Culture Collection) TIB-202. Estas células se aislaron de sangre periférica, de un niño de 1 año de edad con leucemia monocítica.

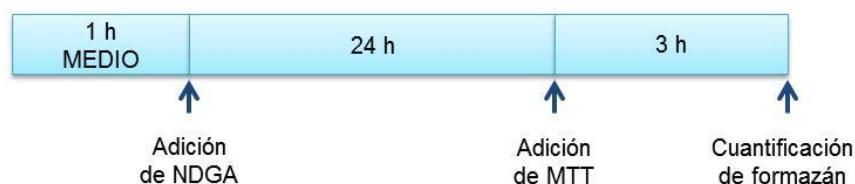
El stock de THP-1 ( $1 \times 10^8$  células/mL) se descongeló a  $37^\circ C$  y se transfirió a un tubo de 50 mL de fondo cónico de propileno con 10 mL de medio RPMI suplementado (Medio THP) (ver apéndice 1). Luego las células se centrifugaron a 500g por 10 min [Beckman TJ-6R rotor TH-4]. El paquete celular se disgregó en el vortex [Fisher Scientific] y se resuspendió en 10 mL de medio THP. Se cuantificó la viabilidad tiñendo las células con azul de tripano y se contaron en la cámara de Neubauer [Superior Marienfeld, Germany]. La suspensión se ajustó a  $0.2 \times 10^6$  células/mL y se cultivaron a  $37^\circ C$  en una atmósfera húmeda con  $CO_2$ , al 5% y  $O_2$ , al 95%. Los cultivos se incubaron hasta alcanzar una densidad de 0.8 a  $1.0 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente las células se lavaron como se describió anteriormente

y se resuspendieron en medio THP y se ajustó la concentración a  $0.6 \times 10^6$  células/mL. Es importante señalar que antes de cada tratamiento las células se dejaron por una hora con el medio THP. Además, cada condición se realizó por triplicado por cada experimento independiente (n).

### 6.3 PRUEBAS DE TOXICIDAD EN LAS CÉLULAS THP-1

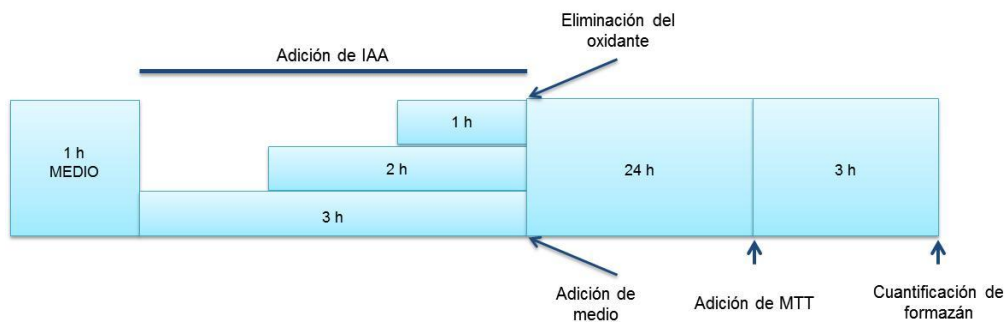
#### 6.3.1 NDGA

Para determinar el efecto del NDGA sobre la viabilidad celular, 0.5 mL de células THP-1 se cultivaron en placas de cultivo de 48 pozos fondo plano de poliestireno en presencia de NDGA a diferentes concentraciones (5-50  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Posteriormente se cuantificó la viabilidad celular por el método de MTT como se describe en una sección posterior. La evaluación se realizó comparando los valores de viabilidad de las células crecidas en medio THP (control) con respecto a las células tratadas con NDGA. Los valores se informaron como índice de viabilidad.



#### 6.3.2 IAA

Para valorar la toxicidad del IAA, 0.5 mL de las células se cultivaron en placas de 48 pozos y se expusieron a concentraciones crecientes (10-100  $\mu\text{M}$ ) durante 1, 2 y 3 h. Transcurrido el tiempo de incubación con IAA, se eliminó el medio THP por centrifugación durante 5 min a 725g, se adicionó medio THP y se incubaron por 24 h más. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular por MTT.



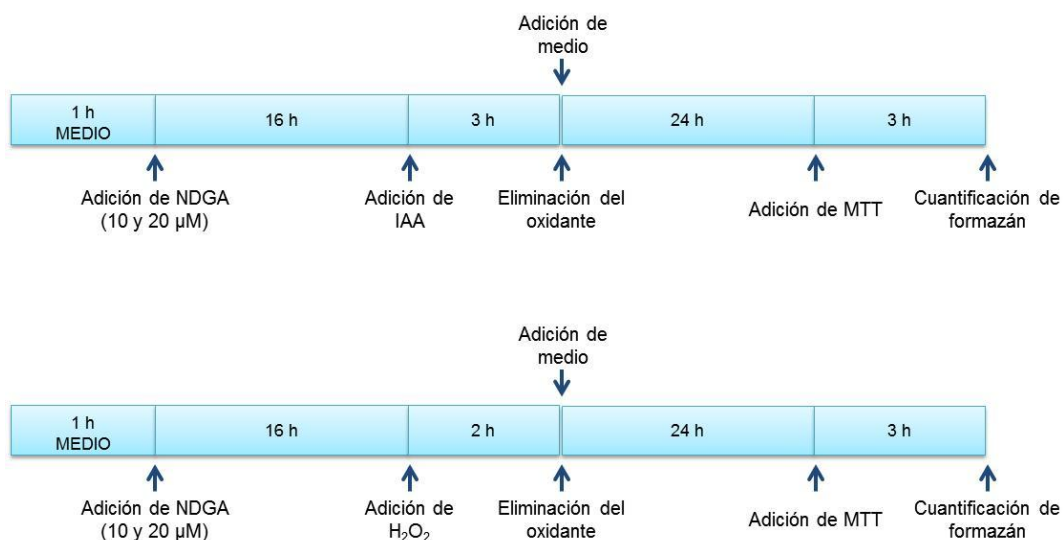
### 6.3.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La toxicidad del peróxido de hidrógeno se evaluó cultivando 0.5 mL de células en placas de 48 pozos y se expusieron durante 2 h a concentraciones crecientes (1-20 mM). Las células se lavaron y se adicionó medio THP y se incubaron por 24 h más. Finalmente, se midió la viabilidad por MTT.



### 6.4 EFECTO DEL NDGA CONTRA LA MUERTE CELULAR GENERADA POR IAA Y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN MONOCITOS HUMANOS

Se cultivaron 0.5 mL de las células THP-1 en placas de 48 pozos, se agregaron 10 y 20  $\mu$ M de NDGA por 16 h, posteriormente se expusieron a concentraciones crecientes de IAA (10-100  $\mu$ M), y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-20 mM), durante 3 y 2 h respectivamente. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio THP centrifugando durante 5 min a 725g, se agregó medio THP y se incubaron por 24 h más. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular.



## 6.5 CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

### 6.5.1 MTT

La cuantificación de la viabilidad celular se basa en la reducción del MTT que es de color amarillo y se transforma a formazán que es de color morado. El cambio de color se debe a la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y se utiliza como índice del estado funcional de la cadena respiratoria y por consiguiente de las células viables. La formación de formazán se puede detectar en el espectrofotómetro (Berridge y Tan, 1993).

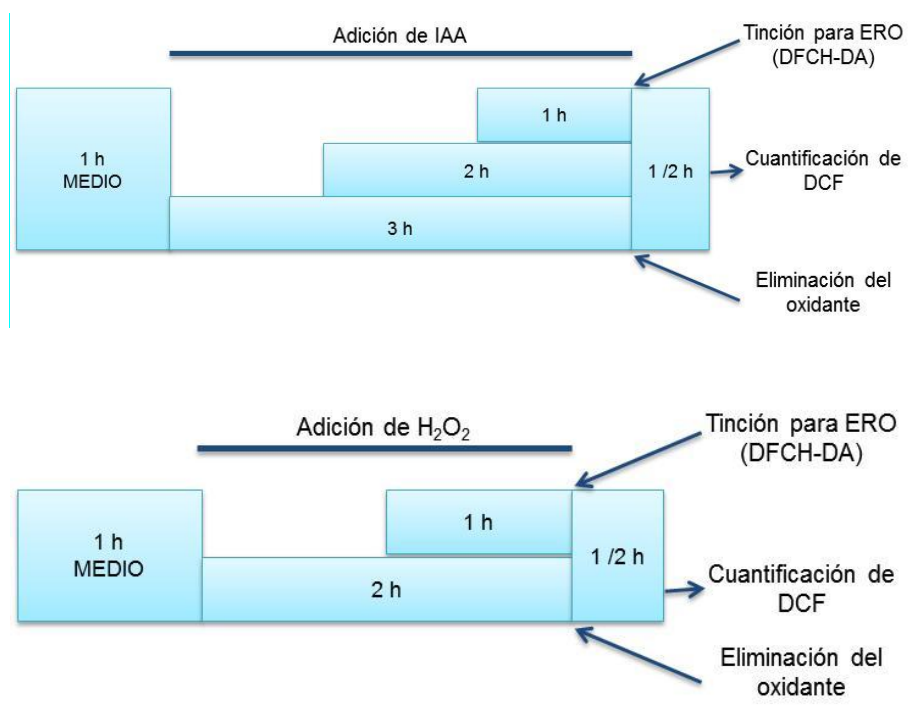
La cuantificación del índice de la viabilidad celular se informó como la proporción de reducción de MTT a formazán del control sin tratamiento contra los diferentes tratamientos. Para ello, se agregaron 150 μg/mL de cultivo de MTT a cada pozo, se incubó por 3 h a 37°C. Posteriormente las células se centrifugaron a 725g por 10 min, se eliminó el medio THP y se adicionó isopropanol ácido (ver anexo) para disolver los cristales de formazán. Posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro, Multiskan Ascent [Thermo] a 540 nm.



## 6.6 PRODUCCIÓN DE ERO EN LAS CÉLULAS THP-1 EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDANTE

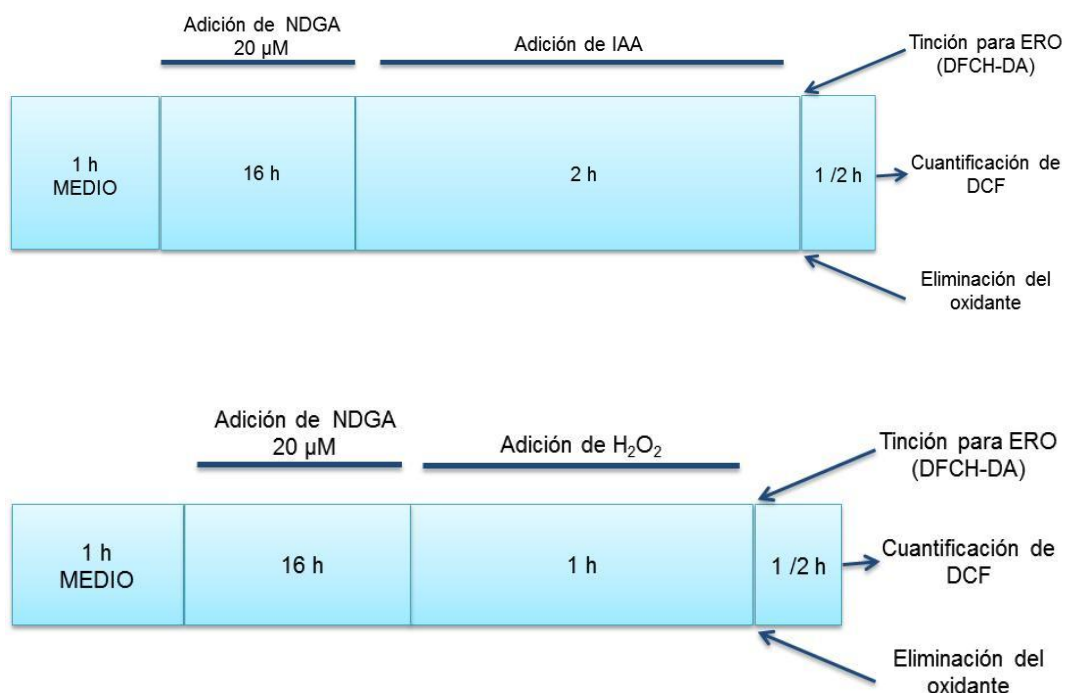
Para los diferentes tratamientos se utilizaron tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 mL para citometría. Se adicionó 1 mL de las células ajustadas ( $1 \times 10^6$  células/mL) en cada tubo y se incubaron por 1 hora, para poder ser utilizadas posteriormente en las condiciones y tiempos requeridos.

La evaluación de las ERO producidas por IAA se realizó con la siguientes condiciones. Se utilizaron concentraciones de 30, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de IAA por 1, 2 y 3 h y de 7.5, 10 y 15 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 1 y 2 h. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio THP centrifugando 5 min a 500g y se lavaron 2 veces con HBSS, posteriormente se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído y finalmente se evaluó la producción de ERO *in situ* por citometría de flujo (comparando con las células cultivadas solo en medio THP, tomadas como control). Como se describe posteriormente en el inciso 6.8.



## 6.7 EFECTO ANTIOXIDANTE DEL NDGA EN CÉLULAS THP-1 EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDANTE

Las células THP-1 se pre-trataron, primero con NDGA 20  $\mu$ M por 16 h y posteriormente se siguió el procedimiento descrito en el inciso 6.6 para evaluar el efecto del NDGA sobre la producción de las ERO.



## 6.8 DETERMINACIÓN DE ERO *IN SITU*

La cuantificación de ERO se realizó *in situ* mediante citometría de flujo. Es una técnica que se basa en el uso de sondas fluorescentes o anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos sobre una suspensión celular, para poder identificar células específicas o elementos intracelulares. La suspensión celular se incubó con las sondas o anticuerpos requeridos para su estudio, posteriormente, se analizan en un citómetro de flujo. Es necesario analizar más de 10,000 eventos de cada tubo para producir información estadísticamente válida. Un evento es el paso de una sola célula por el rayo láser de alto enfoque del

citómetro de flujo. Las sondas o anticuerpos incubados son excitados al momento de pasar por el rayo láser, los cuales emitirán luz de una cierta longitud de onda, la cual será captada por fotodetectores situados específicamente en el citómetro. Los fotodetectores captarán la longitud de onda específica y enviarán una señal a un convertidor digital análogo, el cual la digitalizará y pasará a una computadora para su almacenamiento, visualización y análisis.

Para la detección de ERO se utilizó la sonda 2'-7'-Diclorodihidrofluoreceína diacetato (DCFH-DA) al que son permeables las células. Una vez dentro la DCFH-DA es desacetilada por esterasas formando 2'-7'-Diclorodihidrofluoreceína (DCFH<sub>2</sub>), el cual puede oxidarse en presencia de ERO formando 2'-7'-Diclorofluoreceína (DCF), el cual al ser excitado por el láser del citómetro de flujo fluoresce y se puede detectar para su análisis (Gomes *et al.*, 2005; Curtin *et al.*, 2002; Scherz-Shouval y Elazar, 2009).

Para la determinación de la producción de ERO se adicionó a las células THP-1 la sonda DCFH-DA (20 µM) y se incubó por 30 min a 37°C, pasando el tiempo se centrifugaron y se lavaron las células THP-1 una vez con HBSS, posteriormente se les agregó paraformaldehído para conservar a las células y se hizo la detección en el citómetro de flujo. La producción de ERO se informó cómo veces de producción con respecto al control sin tratamiento.

## **6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se analizaron en el programa estadístico Prisma 5 (California, USA). Los datos se analizaron a través de una ANOVA de una vía, seguido por un análisis de comparación múltiple Dunnett. Los valores con valor de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se expresaron en media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA VIABILIDAD EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1

Para demostrar que el NDGA no tiene efecto sobre los monocitos humanos THP-1 se evaluó su citotoxicidad sobre la línea celular THP-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de NDGA (5, 15, 25, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) por 24 h, para posteriormente medir la viabilidad celular por la formación de formazán. Los valores de absorbencia obtenidos en cada tratamiento se reportaron como índices de viabilidad, todos comparados con respecto al control sin tratamiento (las células cultivadas en medio THP) [Figura 5].

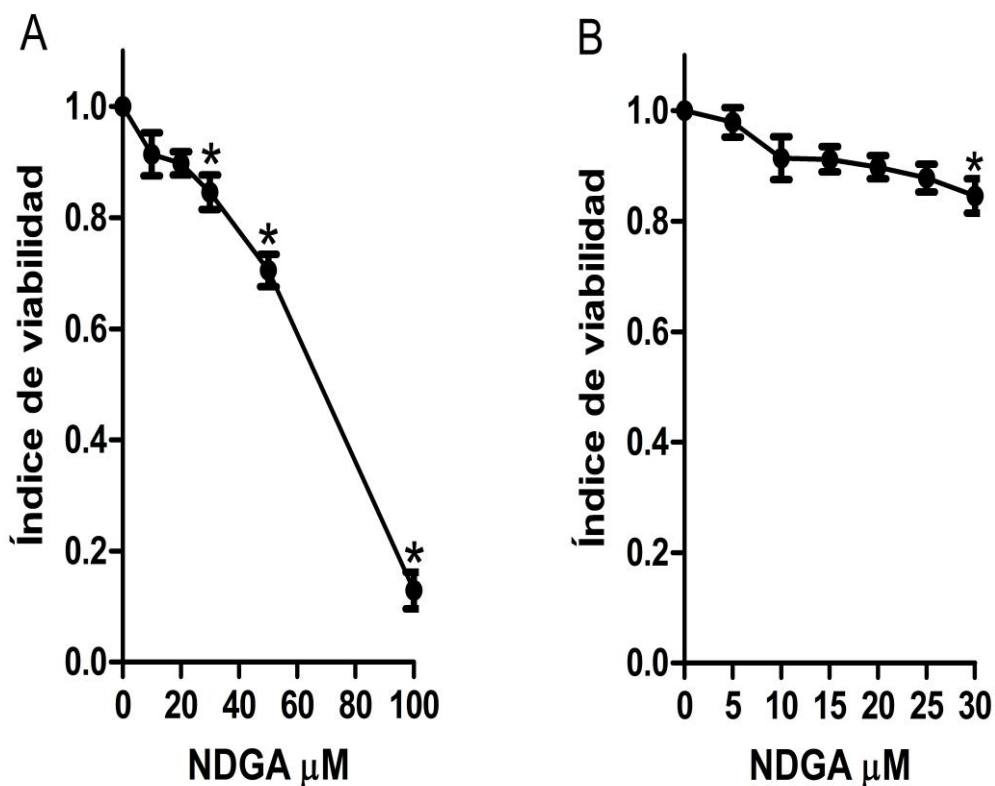


Figura 5. Efecto de la concentración de NDGA en las células THP-1. Las células se dejaron incubando una hora solamente en medio THP. Posteriormente se adicionó el NDGA (5-100  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron durante 24 h, luego se adicionó el MTT, se incubaron 3 horas más y finalmente se monitoreó la generación de

formazán. (A) En la figura se presenta el índice de viabilidad de las THP-1 cultivadas en medio THP con concentraciones altas de NDGA (10-100  $\mu\text{M}$ ), (B) Se presenta el efecto de concentraciones bajas de NDGA (5 a 30  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad celular. Los datos están expresados como la media de 6 experimentos independientes y error estándar. \* $P < 0.001$  vs control.

El NDGA a 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la viabilidad celular con respecto al control sin tratamiento (Figura 5A). El índice de viabilidad disminuyó 0.15, 0.35 y 0.88, respectivamente. Con base en los resultados obtenidos y con el fin de precisar las condiciones no tóxicas, se evaluó el efecto del NDGA a concentraciones menores (5-30  $\mu\text{M}$ ) y se encontró que entre 5 y 25  $\mu\text{M}$  no se afecta la viabilidad celular (Figura 5B). Por lo cual, se decidió utilizar las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de NDGA para asegurar su inocuidad y posteriormente determinar su efecto protector en las células THP-1 cultivadas en condiciones oxidantes generadas por IAA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## **7.2 EFECTO DEL IAA EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1**

### **7.2.1 Efecto del IAA sobre la viabilidad celular**

Con el fin de determinar un modelo de estrés oxidante con IAA en la línea celular THP-1, las células se expusieron a diferentes concentraciones de IAA (10 a 100  $\mu\text{M}$ ) y a diferentes tiempos (1, 2 y 3 h), además se pudo obtener la  $\text{CI}_{50}$  para el IAA a 3 h [Figura 6].

Las células tratadas con IAA (5-100  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h (■) no presentaron cambios significativos en la viabilidad [Figura 6]. Mientras que el tratamiento de las células con IAA, en un rango entre 10 y 50  $\mu\text{M}$  por 2 h (▲), presentó índices entre 1.06 a 1.19, lo cual no representó un cambio significativo en la viabilidad. En cambio la incubación con 75 y 100  $\mu\text{M}$ , durante el mismo periodo de tiempo, el índice disminuyó de manera significativa un 0.2 y 0.6 respectivamente.

Por último, la incubación durante 3 h (◆) en presencia de las concentraciones 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$  de IAA no indujo citotoxicidad, ya que presentan índices de viabilidad

de 1.01, 1.08 y 0.98, respectivamente. Pero, a partir de 40  $\mu\text{M}$  disminuye la viabilidad de manera significativa, ya que se detectaron índices de 0.73, 0.45, 0.23 y 0.21 en las células incubadas con 40, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  con respecto al control sin tratamiento. Finalmente el valor del  $\text{CI}_{50}$  fue de  $52.64 \pm 2.39$   $\mu\text{M}$  de IAA durante 3 h de exposición.

Con base en los resultados se optó por utilizar 30, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de IAA e incubar a las células durante 3 h, con el fin de generar muerte por estrés oxidante.

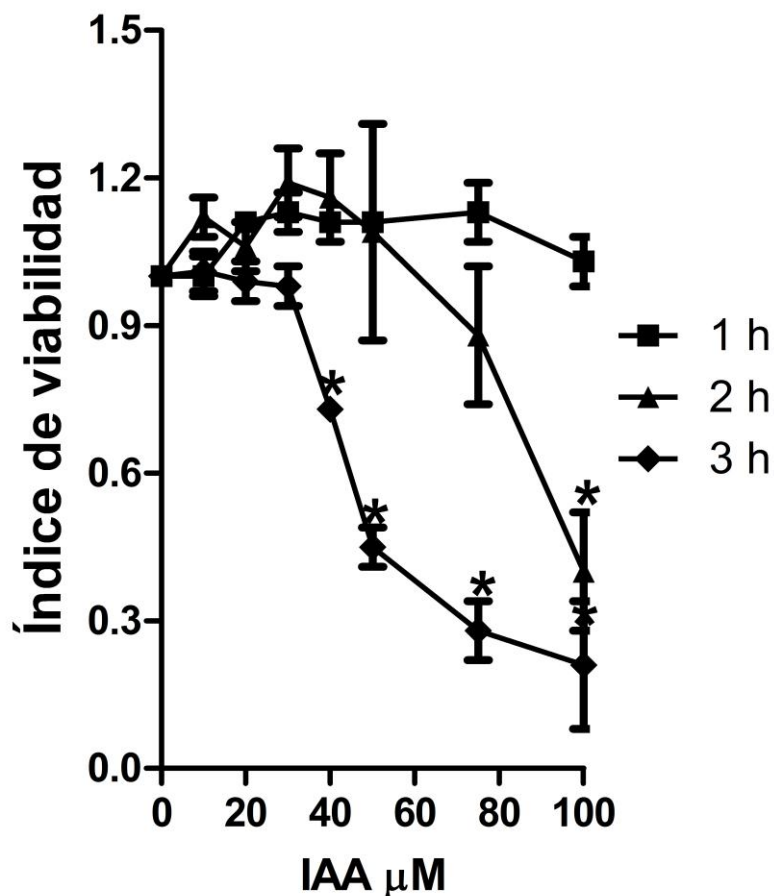


Figura 6. Efecto del IAA sobre la viabilidad celular de las THP-1. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de IAA (10-100  $\mu\text{M}$ ) durante (■) 1, (▲) 2 y (◆) 3 h, se eliminó el oxidante y se cambió el medio por 24 h. Posteriormente se determinó la viabilidad por reducción de MTT. En la figura se presenta la media del índice de viabilidad celular obtenido de seis experimentos independientes en los diferentes tratamientos con IAA. \* $P < 0.001$  vs control.

### 7.2.2 Efecto del IAA sobre la producción de ERO

Para determinar la producción de ERO en presencia de IAA, primero se realizó una cinética de tiempo (1 a 3 h) para establecer el período óptimo de detección [Figura 7]. Para ello, las THP-1 se expusieron durante 1, 2 y 3 h con 30, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de IAA y se cuantificó la generación de ERO por citometría de flujo.

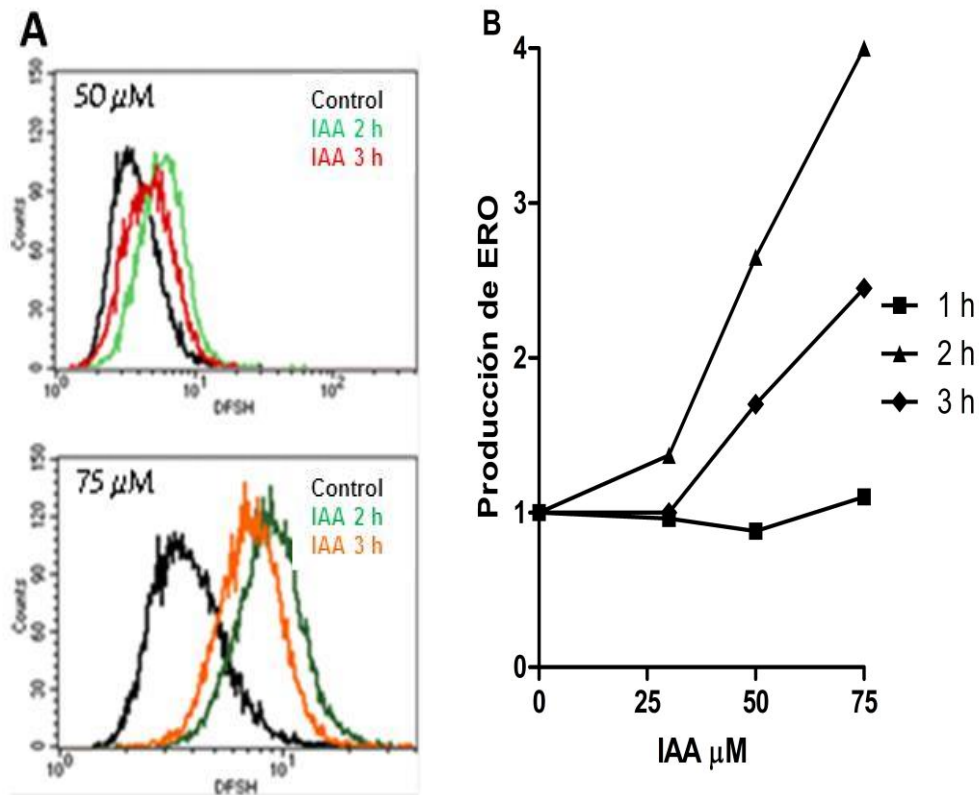


Figura 7. Producción de ERO en las THP-1 expuestas a IAA. Las células THP-1 se dejaron incubando por 1 h solamente con medio THP, después fueron expuestas durante 1, 2 y 3 h con IAA (30, 50 y 75  $\mu\text{M}$ ). Se eliminó el oxidante y realizó la tinción con la DFCH-DA. Posteriormente se cuantificó la oxidación de la sonda por citometría de flujo. (A) histograma representativo de la producción de ERO detectadas. (B) Gráfica del índice de la producción de ERO (n=2).

Se encontró que a una hora de exposición de las células THP-1 con el IAA (30, 50 y 75  $\mu\text{M}$ ), no hubo diferencia significativa en la generación de ERO con respecto al control (sin IAA) [Figura 7]. Sin embargo, la exposición durante 2 horas con IAA incrementa la producción de ERO, ya que las células expuestas a 30, 50 y 75  $\mu\text{M}$

de IAA presentaron 0.4, 1.8 y 3 veces más ERO que el control de las células sin tratamiento.

Cabe resaltar que las células incubadas con IAA 50 y 75  $\mu\text{M}$  durante 3 h, presentaron un incremento significativo en la producción de ERO de 0.6 y 1.7 veces comparadas con el control. De acuerdo con los resultados obtenidos, la generación máxima de ERO fue a las 2 horas de tratamiento con el tóxico [Figura 8]. Por tal razón, se consideró como el tiempo óptimo y las siguientes determinaciones se evaluaron solo en ese período específico.

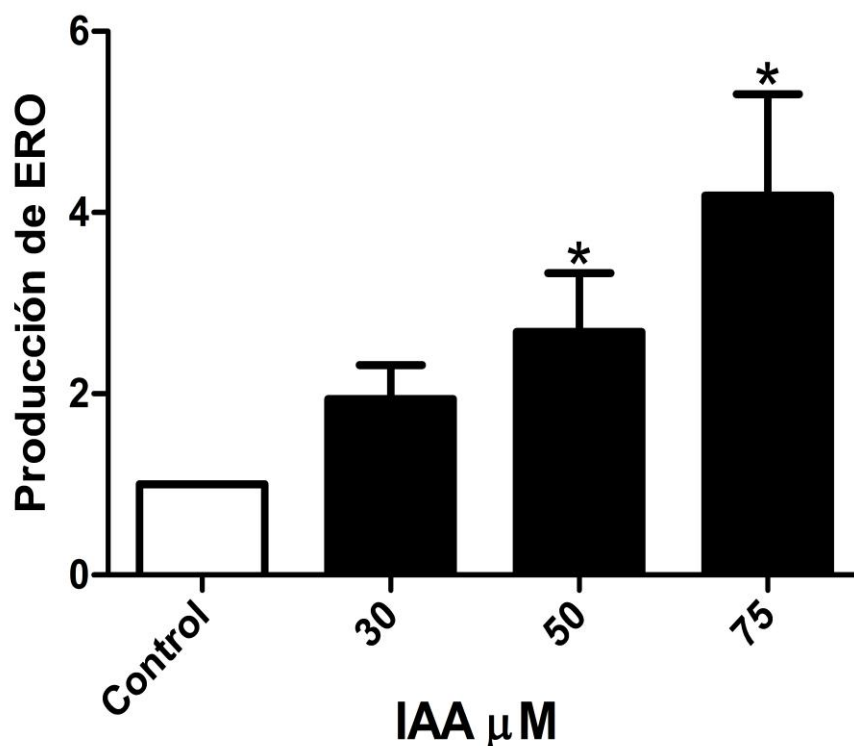


Figura 8. Producción de ERO generadas por IAA en las THP-1 a las 2 h de exposición. Las células se expusieron por 2 h a 30, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de IAA. La producción de ERO se determinó por citometría de flujo con la sonda DFCH-DA, la cual se incubó durante 30 min. \* $P < 0.001$  vs control ( $n=7$ ).

La exposición de las células THP-1 a 30  $\mu\text{M}$  de IAA, no induce un aumento significativo de la producción de ERO, sin embargo cuando la exposición se



realiza a 50 y 75  $\mu\text{M}$  la producción de ERO aumenta en un 1.95 y 3.15 veces más con respecto al control sin oxidante [Figura 8].

### 7.3 EFECTO DEL $\text{H}_2\text{O}_2$ EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1

#### 7.3.1 Efecto del $\text{H}_2\text{O}_2$ sobre la viabilidad celular

Con el fin de determinar un modelo de estrés oxidante generado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la línea celular THP-1, las células se trataron con diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 a 20 mM) por 2 horas. Al final de este tiempo se midió la viabilidad con la técnica de MTT y se calculó la  $\text{IC}_{50}$ .

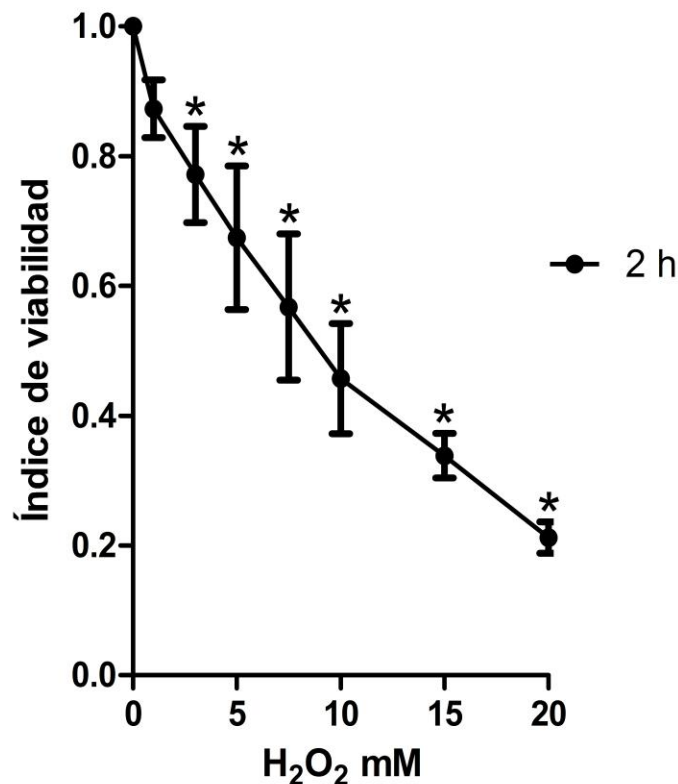


Figura 9. Efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la viabilidad de las células THP-1. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1-20 mM) durante 2 h. La viabilidad se determinó por reducción de MTT. \* $P < 0.001$  vs control

La incubación durante 2 h en presencia de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no induce citotoxicidad, debido a que presenta un índice de viabilidad celular de 0.93. Pero, a partir de 3 mM disminuye la viabilidad celular de manera significativa, debido a la detección de índices de 0.87 a 0.21 en las células THP-1 incubadas con 3 a 20 mM con respecto al control sin tratamiento [Figura 9]. Por último el valor de CI<sub>50</sub> obtenido fue de 9.33 ±1.03 mM durante la exposición del oxidante.

Con base en los resultados se optó por utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración de 5, 10 y 20 mM para incubar a las células durante 2 h. Esto, con el fin de generar muerte celular por estrés oxidante y determinar el efecto protector del NDGA sobre la viabilidad de las células THP-1 y de la producción de ERO.

### **7.3.2 Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la producción de ERO**

De igual forma como se determinó la generación de ERO para IAA, primero se decidió realizar una cinética de tiempo 1 y 2 h para establecer el periodo óptimo de detección en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las células se expusieron a 1 y 2 h con 7.5, 10 y 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se cuantificó la generación de ERO por citometría de flujo.

Al incubar las células THP-1 por 1 h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5, 10 y 15 mM, la producción de ERO incrementa en 1.25, 2.45 y 4.0 veces más con respecto al control. Sin embargo cuando las células THP-1 se incuban por 2 h con las mismas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la producción de ERO incrementa a 1.10, 2.0 y 3.49 veces con respecto al control [Figura 10].

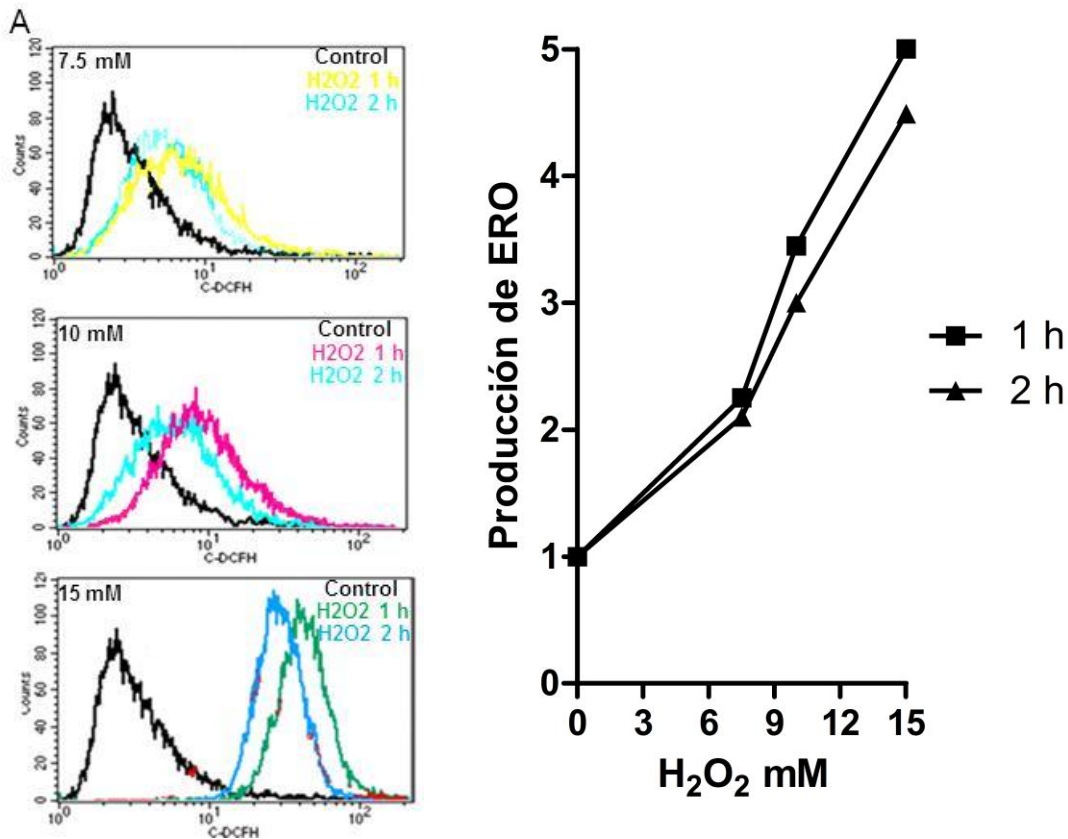


Figura 10. Producción de ERO en las células THP-1 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las células THP-1 se dejaron incubando por 1 h con medio THP, después se expusieron durante 1 y 2 h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7.5, 10 y 15 mM). Se eliminó el oxidante y realizó la tinción con la DFCH-DA. Posteriormente se cuantificó la oxidación de la sonda por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de la producción de ERO detectadas. (B) Cuantificación de la producción de ERO (n=2).

Aunque se observan incrementos significativos en la producción de ERO en ambos tiempos, se decidió utilizar como tiempo óptimo de detección 1 h ya que hay mayor producción de ERO.

La exposición de las THP-1 a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5 mM no induce cambios significativos en la producción de ERO. Sin embargo cuando se utilizaron concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 y 15 mM las ERO incrementaron 1 y 1.8 veces más con respecto a las control [Figura 11].

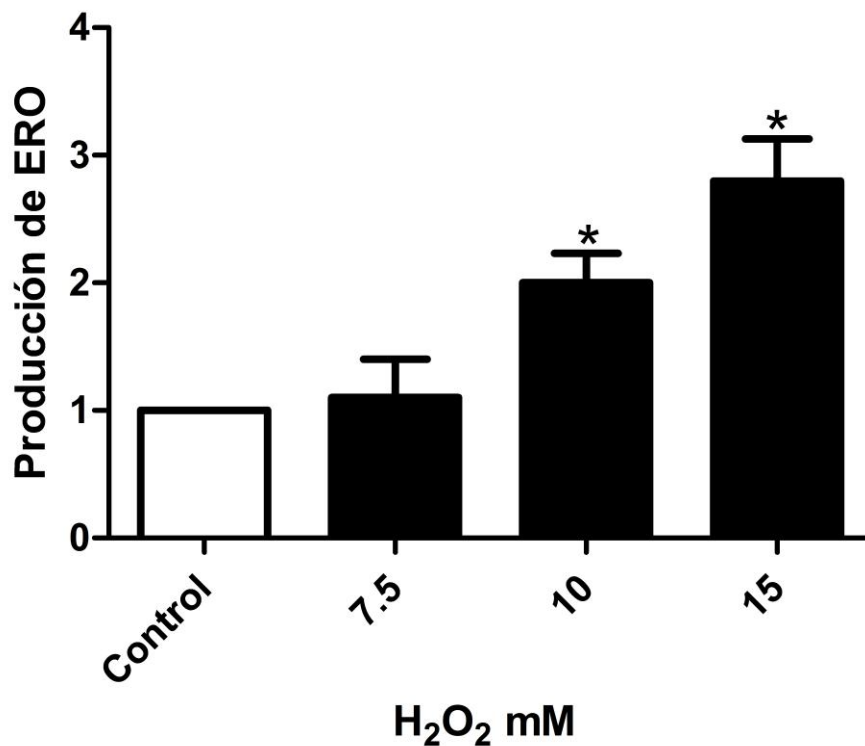


Figura 11. Producción de ERO generadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las THP-1 a la 1 h de exposición. Las células se expusieron por 1 h a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5, 10 y 15 mM. La producción de ERO se determinó por citometría de flujo con la sonda DFCH-DA, la cual se incubó durante 30 min. Se presenta el incremento en la producción de ERO. \*P<0.001 vs control (n=4).

#### **7.4 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR IAA**

Se determinó el efecto del NDGA sobre la muerte celular de las THP-1 expuestas a estrés oxidante generado con IAA. Los monocitos se pre incubaron con NDGA 10 y 20  $\mu$ M por 16 horas. Posteriormente las células se expusieron a concentraciones crecientes de IAA por 3 horas y se midió la viabilidad celular por MTT [Figura 12].

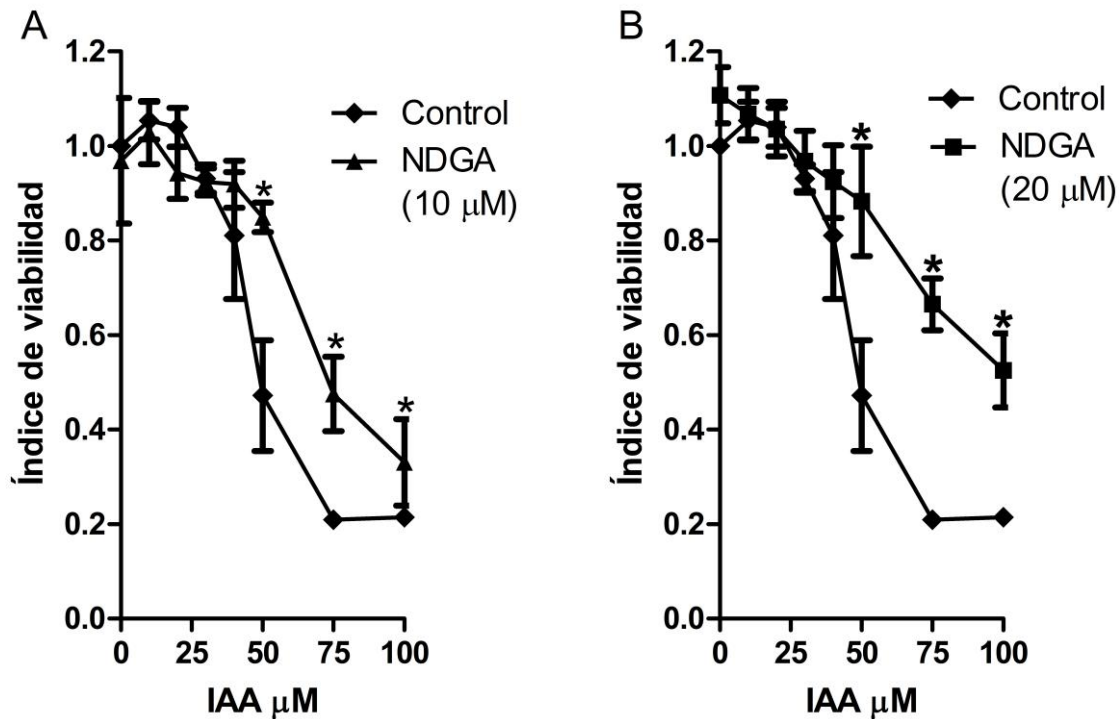


Figura 12. Efecto protector del NDGA contra la muerte celular generada por IAA en las THP-1. Las células se incubaron por 16 h con NDGA (10 y 20 μM). Finalizado el tiempo de incubación se añadió IAA (10-100 μM) durante 3 h. Por último se monitoreó la viabilidad celular con MTT. (A) Índice de viabilidad con 10 μM (▲) de NDGA. (B) Índice de viabilidad con 20 μM (■) de NDGA. \*P<0.001 vs las células tratadas (n=6).

El pre-tratamiento con NDGA 10 μM (▲), indujo incrementos significativos en el índice de viabilidad de 80, 127 y 54% en las células tratadas con 50, 75 y 100 μM de IAA respectivamente contra las células sin el pre-tratamiento [Figura 12A]. Por otro lado cuando el pre-tratamiento es con NDGA 20 μM (■), la viabilidad incrementa en un 87, 217 y 144% en las THP-1 tratadas con IAA (50-100 μM) con respecto a las células sin pre-tratamiento [Figura 12B].

De acuerdo con los resultados de los experimento realizados, se decidió utilizar NDGA 20 μM para asegurar la mayor protección contra la producción de ERO en las THP-1 cultivadas en condiciones oxidantes generadas por IAA.

## 7.5 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR IAA

Se evaluó el efecto del NDGA sobre la producción de ERO generadas por IAA en las células THP-1, por lo que las células se trataron por 16 horas con 20  $\mu\text{M}$  de NDGA. Posteriormente, se añadió IAA (30, 50 y 75  $\mu\text{M}$ ) por 2 h para inducir la generación de ERO. Después se midió la producción de ERO por citometría de flujo descrita anteriormente [Figura 13].

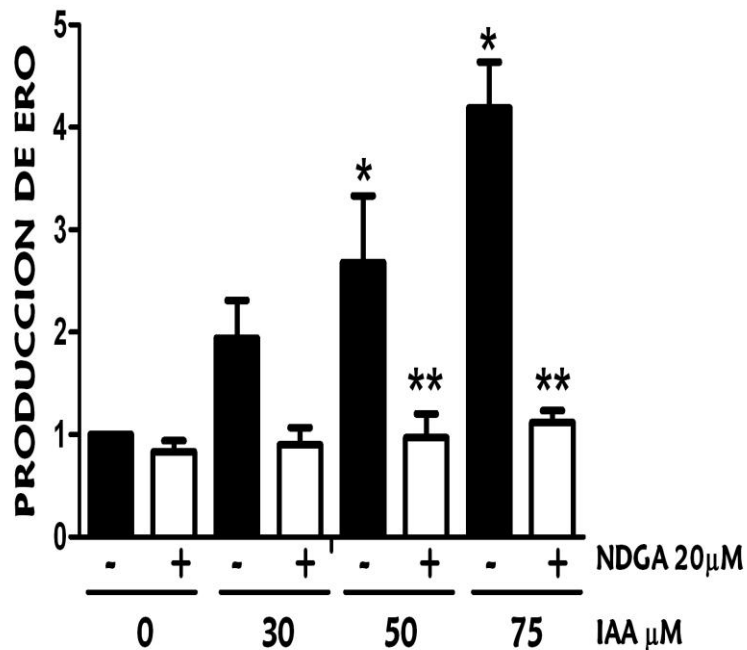


Figura 13. Efecto depurador del NDGA en las THP-1 expuestas a condiciones de estrés oxidante generadas por IAA. Las THP-1 se trataron con 20  $\mu\text{M}$  de NDGA por 16 h. Después se añadió IAA (30, 50 y 75  $\mu\text{M}$ ) por 2 h. Posteriormente se agregó la sonda DCFH-DA por media hora para determinar la producción de ERO por citometría de flujo. \*P<0.005 vs control, \*\* P<0.005 vs células THP-1 sin tratamiento (n=7).

El pre-tratamiento con NDGA 20  $\mu\text{M}$  previene el aumento en la producción de ERO [Figura 13], inducidos por IAA 50 y 75  $\mu\text{M}$  en un 57 y 72% respectivamente.

## 7.6 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Por otro lado también se evaluó el efecto del NDGA sobre la muerte celular generada por estrés oxidante con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los monocitos se pre-incubaban con NDGA 10 y 20  $\mu$ M por 16 horas. Posteriormente se expusieron a concentraciones crecientes del oxidante por 2 horas y por último se monitoreó la viabilidad celular por MTT [Figura 14].

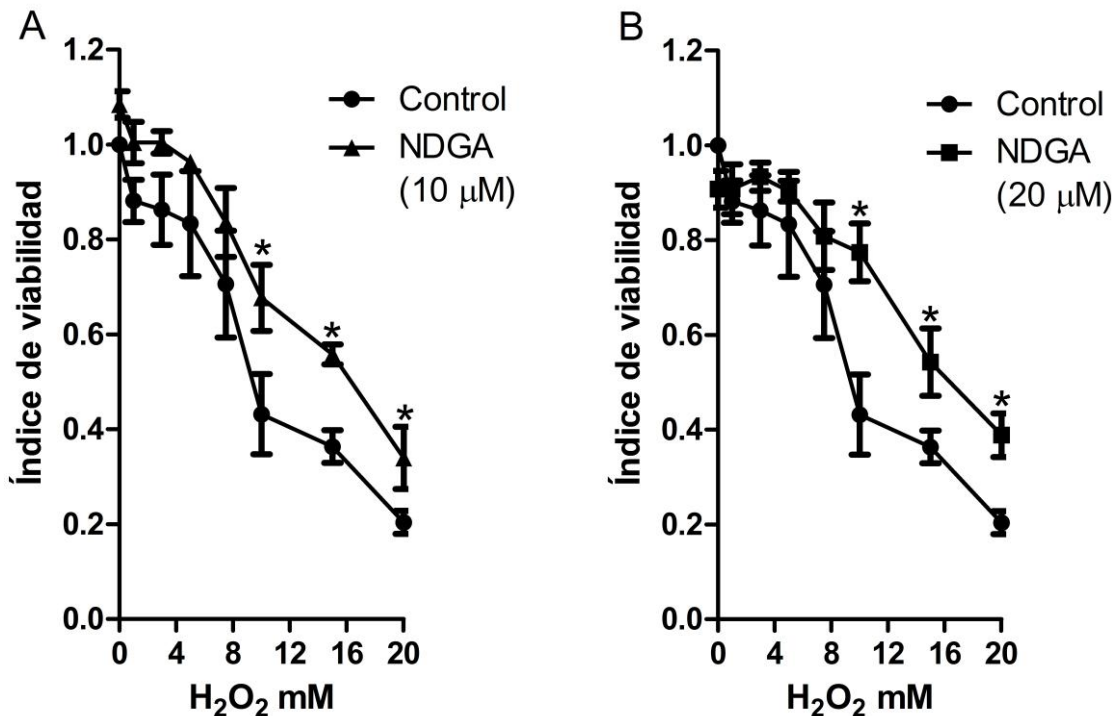


Figura 10. Efecto protector del NDGA contra la muerte celular generada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las THP-1. Las células se incubaron por 16 h con NDGA (10 y 20  $\mu$ M). Finalizado el tiempo de incubación se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-20 mM) durante 2 h. Por último se midió la viabilidad celular con MTT. (A) Índice de viabilidad con NDGA 10  $\mu$ M (▲). (B) Índice de viabilidad con NDGA 20  $\mu$ M (■). \*P<0.001 vs las células tratadas (n=6).

El pre-tratamiento con NDGA 10  $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ), incrementó significativamente el índice de viabilidad en un 57, 53 y 66% cuando son tratados con 10, 15 y 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivamente contra las células sin pre-tratar [Figura 10A]. Por otra parte el pre-tratamiento con NDGA 20  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ), induce un aumento significativo en la viabilidad celular de 79, 49 y 90% cuando se expuso a las concentraciones de 10, 15 y 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con respecto a los monocitos sin tratar.

Conforme a los resultados, se decidió utilizar NDGA 20  $\mu\text{M}$  para asegurar la mayor protección contra la producción de ERO en las THP-1 cultivadas en condiciones oxidantes generadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **7.7 EFECTO DEL NDGA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS MONOCITOS HUMANOS THP-1 EXPUESTOS A ESTRÉS OXIDANTE GENERADO POR $\text{H}_2\text{O}_2$**

Asimismo, se determinó también el efecto depurador del NDGA contra la producción de ERO generadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por lo que las células se trataron por 16 horas con NDGA 20  $\mu\text{M}$  y posteriormente, se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  7.5, 10 y 15 mM por 1 h para inducir la generación de ERO. Después se monitoreó la producción de ERO por citometría de flujo.

La pre-incubación de los monocitos con NDGA 20  $\mu\text{M}$ , indujo una disminución de la producción de ERO, ya que en las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 y 15 mM los niveles de ERO bajaron en 60 y 70% con respecto a las células sin pre-tratamiento [Figura 15].



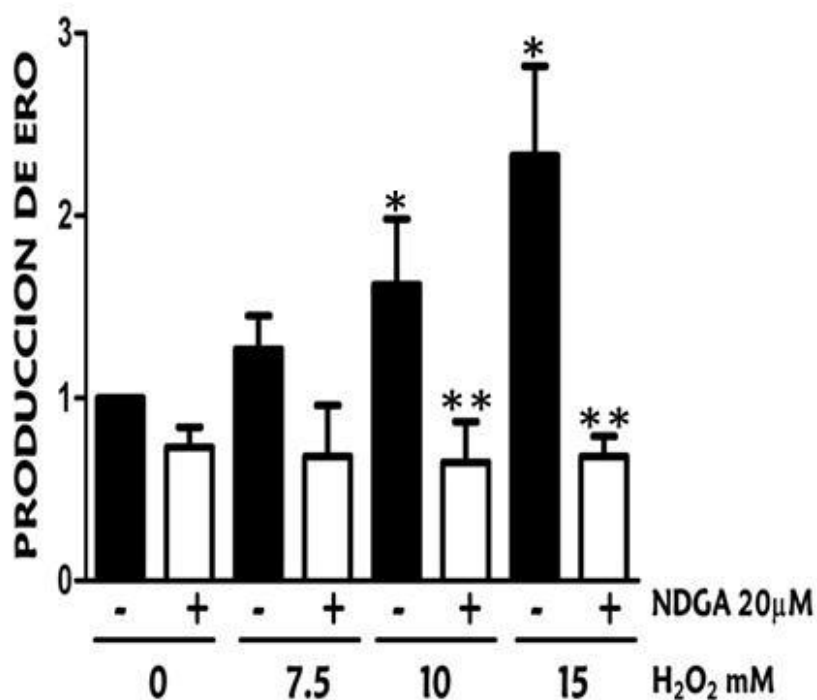


Figura 15. Efecto depurador de ERO del NDGA en las THP-1 expuestas a condiciones de estrés oxidante generadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los monocitos se trataron con NDGA 20 μM por 16 h. Después se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5, 10 y 15 mM por 1 h. Posteriormente se agregó la sonda DCFH-DA por media hora para determinar la producción de ERO por citometría de flujo. \*P<0.005 vs control, \*\* P<0.005 vs células THP-1 sin tratamiento (n=7).

## 8 DISCUSIÓN

Los monocitos humanos son parte fundamental en la respuesta inmune porque son las células predecesoras de los macrófagos; su función principal es la defensa del organismo contra diferentes agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos y sustancias nocivas, entre otras). Otra función es la presentación de antígenos y la producción de citocinas para el reclutamiento de los macrófagos o de las células asesinas naturales (NK), que son células primordiales en la inmunidad (Baran *et al.*, 2004). Como parte de sus funciones fagocíticas, los monocitos producen ERO al interior de los fagosomas. Particularmente las ERO afectan las funciones celulares antes mencionadas de los monocitos (Hunter *et al.*, 2009). Adicionalmente la generación de ERO en los monocitos regula su reclutamiento, su sobrevivencia y su muerte, y también es importante para la comunicación intracelular (Baran *et al.*, 2004). En la línea de investigación en la que se circunscribe este trabajo se quiere estudiar el efecto de las ERO sobre la respuesta inmune contra agentes infecciosos mediada por monocitos, y para ello nos propusimos generar un modelo de estrés oxidante, sobre el cual probar el efecto de sustancias antioxidantes.

Las ERO son elementos esenciales en procesos de señalización como la apoptosis, producción de citocinas, expresión de genes, entre otros (Baran *et al.*, 2004; Bartosz, 2009). Sin embargo un exceso de ERO puede generar daño por oxidación de macromoléculas. Para poder mantener la homeostasis en el sistema redox las células poseen un sistema antioxidante endógeno conformado por superóxido dismutasas, catalasas y la glutatión peroxidasa, entre otras, las cuales disminuyen la concentración de ERO (Valko *et al.*, 2006). De hecho el estrés oxidante se ha vinculado con diversas patologías como el cáncer, diabetes, aterosclerosis, asma, Alzheimer; además la producción de ERO se asocia con el envejecimiento (Nishikawa, 2008; MacNee, 2001; Harrison *et al.*, 2003; Crimi *et al.*, 2006; Dumont y Beal, 2010; Harman, 1992).

Parte importante de este trabajo fue diseñar un modelo de estrés oxidante generado por compuestos químicos en la línea celular de monocitos humanos THP-1, para ello se utilizaron los compuestos IAA y  $H_2O_2$  con el fin de tratar de emular condiciones oxidantes.

El IAA se utilizó para la generación de un modelo químico de estrés oxidante en los monocitos humanos THP-1, puesto que en neuronas de hipocampo de rata se pudo mimetizar daño hipoglicémico moderado con  $50\mu M$  IAA generado por la producción de ERO (Hernández-Fonseca *et al.*, 2008). La adición de compuestos oxidantes a las células puede generar toxicidad, afectando la viabilidad y limitando así el rango de concentraciones a las que se puede utilizar. Se ha reportado que la citotoxicidad generada por IAA ocurre por inhibición de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, generando un déficit en el metabolismo energético, bloqueando parcialmente la glucólisis y la cadena respiratoria, esto se ha demostrado en células granulares de cerebelo de rata (Malcolm *et al.*, 2000). Por lo que se realizó una curva de concentraciones crecientes de IAA para evaluar en nuestras células su citotoxicidad y determinar las concentraciones óptimas que generen ERO.

El otro compuesto que se utilizó para generar estrés oxidante, fue el  $H_2O_2$ . Esta molécula es una ERO *per se*; además posee alta capacidad de inducir la formación de otras especies como el  $OH^\bullet$  que se puede formar en presencia de luz UV o por la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999). Otro estudio en células endoteliales de aorta de cerdo demostró que el  $H_2O_2$  a una concentración de  $60\ \mu mol/L$  provoca citotoxicidad e incrementa la concentración intracelular de  $O_2^{\bullet-}$  (Coyle *et al.*, 2006). Con estos antecedentes, en este trabajo también se evaluó el efecto citotóxico por  $H_2O_2$  y para ello se realizó una curva con concentraciones crecientes de  $H_2O_2$ .

Los resultados obtenidos para el IAA muestran que a 3 h la viabilidad celular disminuye de forma dependiente de la concentración, obteniendo que a  $100\ \mu M$  la viabilidad disminuyera hasta en un 89%. Posteriormente se cuantificó la

producción de ERO y se observaron incrementos de hasta el que 300% con respecto al control sin tratar en las células incubadas con IAA a una concentración de 75  $\mu\text{M}$ .

Y con respecto al  $\text{H}_2\text{O}_2$  se encontró que la viabilidad celular de las THP-1 disminuyó conforme aumentaba su concentración llegando a un 92% de muerte celular con 20 mM, mientras que en la cuantificación de la producción de ERO, se determinó que el incremento también dependió de la concentración.

Para el IAA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  se logró completar el objetivo, ya que con ambos compuesto se pudieron obtener las condiciones de muerte celular por estrés oxidante y además se encontraron las concentraciones donde ambos oxidantes producían ERO.

Con el fin de proponer una alternativa para evitar el daño por oxidación, se decidió utilizar un antioxidante de forma exógena. Por ello el objetivo del trabajo está enfocado en evaluar al NDGA como un antioxidante capaz de proteger o retrasar el daño sobre los monocitos expuestos a condiciones de estrés oxidante. Floriano-Sánchez y colaboradores (2006) demostraron que el NDGA tiene capacidad antioxidante *per se*, debido a que en ensayos *in vitro* puede neutralizar ERO como  $\text{ONOO}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HOCl}$ . Empero, existen reportes de generación de citotoxicidad, donde a partir de 50-100  $\mu\text{M}$ , el NDGA inhibe el transporte vesicular intracelular e interrumpe la vía endocítica en células dendríticas humanas (Drecktrath *et al.*, 1998; Ramoner *et al.*, 1998). También se ha observado que a partir de 30  $\mu\text{M}$  el NDGA bloquea reversiblemente el reciclaje de proteínas entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmico. Sin embargo al adicionar 100  $\mu\text{M}$  se inhibe la producción de proteínas y se altera el aparato de Golgi irreversiblemente (Fujiwara *et al.*, 1998). Por lo antes mencionado se realizó una curva de citotoxicidad a concentraciones crecientes del NDGA para evaluar su efecto sobre la viabilidad, buscando cuales serían la concentraciones óptimas del antioxidante que no afectaran la sobrevivencia.

En este trabajo, se encontró que concentraciones de NDGA menores a 20  $\mu\text{M}$  tienen un efecto protector ya que puede prevenir la muerte celular generada por ambos oxidantes de manera significativa. También se determinó si el antioxidante podría reducir la producción de ERO generadas con los oxidantes y se observó que la pre-incubación por 16 h con NDGA 20  $\mu\text{M}$  disminuye las ERO a niveles basales cuando son expuestas a IAA y disminuye a 0.8 cuando son expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Lo que indica que el NDGA también tiene la capacidad de mantener una homeostasis celular en condiciones de estrés oxidante.

Uno de los mecanismos propuestos por el cual el NDGA pueda proteger a las células, y que se ha estudiado en diferentes modelos, por ejemplo en células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo y en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, es que el NDGA puede inducir el sistema antioxidante endógeno, debido a que logra activar la vía de señalización celular Keap1/Nrf2/ARE involucrada en la expresión de proteínas citoprotectoras de fase II como la hemo oxigenasa 1 (HO-1), las glutatión S transferasas, la glutamil-cisteína ligasa, la NADPH quinona óxido reductasa 1, la ferritina y la SOD entre otras (Itoh *et al.*, 1999; Motohashi y Yamamoto, 2004; Holtzclaw *et al.*, 2004; Guzmán-Beltrán *et al.*, 2008; López, 2009), por lo cual, sugerimos que este mecanismo podría estar activado en monocitos y por ello protege a la línea celular de monocitos humanos THP-1 expuestos a estrés oxidante. Otro de los mecanismos propuestos es que el NDGA es un inhibidor inespecífico de la lipooxigenasa, la cual participa en el metabolismo del ácido araquidónico, en el cual se genera  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Por esta razón el NDGA puede disminuir la generación de ERO (Nanda *et al.*, 2007; Deshpande y Kehrer, 2006; Nieves y Moreno, 2006).

Los datos aquí mostrados son de gran importancia para el estudio de la aterosclerosis donde la producción de ERO es elevada afectando en gran medida a los monocitos, por lo que el compuesto antioxidante utilizado el NDGA

puede ser de gran ayuda en la prevención de los efectos generados por las ERO a los monocitos (Harrison et al., 2003).

Cabe resaltar que el modelo aquí presentado utilizando las células THP-1 puede ser aplicado en otras líneas de investigación que se interesen sobre el efecto biológico de antioxidantes no sólo en el contexto de la inmunología. Por ejemplo, este modelo, tiene algunas ventajas sobre otros modelos para el estudio de las ERO, como el de las células epiteliales de túbulo proximal de cerdo y las neuronas granulares de cerebelo de rata, debido a que su cultivo es de fácil crecimiento en 2 días y solo es necesario el medio RPMI suplementado y una atmósfera adecuada de 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> a 37°C, a diferencia de las células epiteliales del túbulo proximal de cerdo es necesario esperar 1 o 2 días para que lleguen a tener una confluencia del 90% aproximadamente y posteriormente esperar 1 día más para poder usarlas y con las células granulares de cerebelo, donde primero es necesario sacrificar a las ratas y después obtener la parte del cerebelo, posteriormente se necesita esperar 14 días para poder usarlas. Otra ventaja sobre estos modelos es que no se requiere de intervención mecánica (raspados), ni química (tripsinización) para la disgregación de las células de la placa o caja donde son cultivadas, ya que no se adhieren ni agregan (Guzmán-Beltrán *et al.*, 2008; López, 2009).

En suma, los datos aquí presentados muestran que concentraciones bajas de NDGA (20 µM) tienen efecto protector contra la generación de estrés oxidante generada por IAA (10-10 µM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-20 mM), por lo que faltaría abundar más sobre los mecanismos por los cuales el NDGA previene el estrés oxidante evaluando la participación de su inducción del sistema antioxidante endógeno y la vía Keap1/Nrf2/ARE.

## 9 CONCLUSIONES

- ◆ El NDGA no afecta la viabilidad celular de los monocitos humanos THP-1 a concentraciones de 5-20  $\mu\text{M}$ .
- ◆ El IAA afecta la viabilidad celular de los monocitos humanos THP-1 dependiente de la concentración, además de exacerbar la producción de especies reactivas de oxígeno.
- ◆ El  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce muerte celular de los monocitos humanos THP-1 dependiendo de la concentración y exacerba la generación de especies reactivas de oxígeno.
- ◆ El NDGA a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  y con un pre-tratamiento de 16 h tiene un efecto protector en la línea celular de monocitos humanos THP-1 contra la muerte celular generada por IAA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , además de que inhibe la producción exacerbada de ERO que se generaron en condiciones de estrés oxidante.

## 10 REFERENCIAS

- Argueta, V. 1994. Atlas of the Traditional Mexican Medicinal Plants, vol. II. National Indigenous Institute, Mexico, pp. 669–670.
- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. 2005. Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol.* 98(3):231-9.
- Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 250(13):5144-9.
- Babior BM. 2004. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 16(1):42-7.
- Baran CP, Zeigler MM, Tridandapani S, Marsh CB. 2004. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm Des.* 10(8):855-66.
- Bartosz G. 2009. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?. *Biochem Pharmacol.* 77(8):1303-15.
- Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65(18-19):1865-74.
- Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 303(2):474-82.
- Beutler B. 2002. Innate immune sensing of microbial infection: the mechanism and the therapeutic challenge. *Wien Med Wochenschr.* 152(21-22):547-51.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12(1):64-76.
- Cárdenas Rodríguez N. 2007. Neurotoxicidad por yodoacetato en cultivos de neuronas granulares de cerebelo: actividad de enzimas antioxidantes y efecto protector del ácido nordihidroguayarático. Tesis, Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.



- Cárdenas-Rodríguez N, Guzmán-Beltrán S, Medina-Campos ON, Orozco-Ibarra M, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. 2009. The effect of nordihydroguaiaretic acid on iodoacetate-induced toxicity in cultured neurons. *J Biochem Mol Toxicol*. 23(2):137-42.
- Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri A M, Keller J N. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1773(2):93-104.
- Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR. 2009. Elevated levels of urinary hydrogen peroxide, advanced oxidative protein product (AOPP) and malondialdehyde in humans infected with intestinal parasites. *Parasitology*. 136(3):359-63.
- Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN. 2006. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 40(12):2206-13.
- Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, Napoli C. 2006. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*. 40(3):398-406.
- Curtin JF, Donovan M, Cotte TG. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 265(1-2):49-72.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 112(4):935-45.
- Deshpande VS, Kehrer JP. 2006. Oxidative stress-driven mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in FL5.12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 214(3):230-6.
- Drecktrah D, de Figueiredo P, Mason RM, Brown WJ. 1998. Retrograde trafficking of both Golgi complex and TGN markers to the ER induced by nordihydroguaiaretic acid and cyclofenil diphenol. *J Cell Sci*. 111 (Pt 7):951-65.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82(1):47-95.
- Dumont M, Beal MF. 2010. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026.

- Fahim FA, Esmat AY, Mady EA, Ibrahim EK. 2003. Antitumor activities of iodoacetate and dimethylsulphoxide against solid Ehrlich carcinoma growth in mice. *Biol Res.* 36(2):253-62.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40(5): 523-33.
- Fujiwara T, Takami N, Misumi Y, Ikehara Y. 1998. Nordihydroguaiaretic acid blocks protein transport in the secretory pathway causing redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 273(5):3068-75.
- Gali RR, Board PG. 1997. Identification of an essential cysteine residue in human glutathione synthase. *Biochem J.* 321 (Pt 1):207-10.
- Genestra M. 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 19(9):1807-19.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JL. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods.* 65(2-3):45-80.
- Goodman Y, Steiner MR, Steiner SM, Mattson MP. 1994. Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* 654(1):171-6.
- Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML. 2000. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med J.* 118(4):93-8.
- Guzmán-Beltrán S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. 2008. Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 447(2-3): 167-71.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Ed. Oxford, 5era. Ed. Nueva York, EUA.
- Harman D. 1992. Role of free radicals in aging and disease. *Ann NY Acad Sci.* 673:126-41.

- Harrison D, Griending KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 91(3A):7A-11A.
- Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 86(8):1768-80.
- Holtzclaw WD, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2004. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv Enzyme Regul.* 44:335-67.
- Hunter M, Wang Y, Eubank T, Baran C, Nana-Sinkam P, Marsh C. 2009. Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. *Front Biosci.* 14:4079-102.
- Hyder PW, Fredrickson EL, Estell RE, Lucero ME. 2002. Transport of phenolic compounds from leaf surface of creosotebush and tarbush to soil surface by precipitation. *J Chem Ecol.* 28(12):2475-82.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13(1):76-86.
- Konno C, Lu ZZ, Xue HZ, Erdelmeier CA, Meksuriyen D, Che CT, Cordell GA, Soejarto DD, Waller DP, Fong HH. 1990. Furanoid lignans from *Larrea tridentata*. *J Nat Prod.* 53(2):396-406.
- Lara F, Márquez C, 1996. *Medicinal Plants from Mexico: Composition, Uses and Biological Activity.* UNAM, México, pp. 59–61.
- Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. 1999. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 107(3):323-32.
- López Gazcón Zamudio A. 2009. Estudio de la vía Keap1/Nrf2/ARE en la inducción de la proteína citoprotectora hemo oxigenasa-1 por ácido nordihidroguayaráctico. Tesis, Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Facultad de Química, UNAM.
- MacNee W. 2001. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 429(1-3):195-207.

- Malcolm CS, Benwell KR, Lamb H, Bebbington D, Porter RH. 2000. Characterization of iodoacetate-mediated neurotoxicity in vitro using primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Free Radic Biol Med.* 28(1):102-7.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Olalla L, Segura JM, Blanca M. 2000. Allergy to drugs: antioxidant enzymic activities, lipid peroxidation and protein oxidative damage in human blood. *Cell Biochem Funct.* 18(2):77-84.
- Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. 2008. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol.* 52(10):843-50.
- Moody TW, Leyton J, Martinez A, Hong S, Malkinson A, Mulshine JL. 1998. Lipoxygenase inhibitors prevent lung carcinogenesis and inhibit non-small cell lung cancer growth. *Exp Lung Res.* 24(4):617-28.
- Mosialou E, Ekström G, Adang AE, Morgenstern R. 1993. Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 45(8):1645-51.
- Motohashi H, Yamamoto M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med.* 10(11):549-57.
- Nanda BL, Nataraju A, Rajesh R, Rangappa KS, Shekar MA, Vishwanath BS. 2007. PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants--a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem.* 7(8):765-77.
- Nieves D, Moreno JJ. 2006. Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation. *Biochem Pharmacol.* 72(8):1022-30.
- Niki E. 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 47(5):469-84
- Nishikawa T, Nakajima T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y, Yoshikawa T. 2009. Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. *Liver Int.* 29(6):846-56.

- Pedraza-Chaverri J, Cardénas-Rodríguez N. 2005. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*. 17(2):164-173.
- Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 1999. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med*. 27(3-4):245-53.
- Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, Siafakas NM, Bouros D. 2006. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest*. 36(5):362-7.
- Ramoner R, Rieser C, Bartsch G, Thurnher M. 1998. Nordihydroguaiaretic acid blocks secretory and endocytic pathways in human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 64(6):747-52.
- Rocha Mendoza DI. 2005. Estudio de la capacidad del ácido nordihidroguayarático y de la S-alilcisteína para atrapar especies reactivas de oxígeno. Tesis, licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Romo de Vivar, A., 1985. Natural products of the Mexican flora. Limusa, México, 56 pp.
- Rysz J, Stolarek RA, Pedzik A, Fijalkowska J, Luczynska M, Sarniak A, Kasielski M, Makowka A, Nowicki M, Nowak D. 2007. Increased exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and impaired lung function in patients undergoing bioincompatible hemodialysis. *Int J Artif Organs*. 30(10):879-88.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z. 2009. Monitoring starvation-induced reactive oxygen species formation. *Methods Enzymol*. 452:119-30.
- Schmidt MM, Dringen R. 2009. Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics*. 1:1.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. 2010. Role of oxidatively induced ADN lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 704(1-3):152-9.
- Seifried HE. 2007 A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 18(9):567-79.

- Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr, Chou TC. 1999. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 59(24):6178-84.
- Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossmann KA. 1995. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J Neurochem.* 64(5):2185-92.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.
- Wientjes FB, Segal AW. 1995. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol.* 6(6):357-65.
- Xue H, Lu Z, Konno C, Soejarto D, Cordell G, Fong H, Hodgson W. 1988. 3 $\beta$ -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 $\beta$ -(4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27, 233–235.

## 11 APÉNDICE

### MEDIO RPMI SUPLEMENTADO PARA THP-1 (Medio THP)

Producto	Volumen
Medio RPMI 1640 (Sigma)	500 mL

Suplementos:

Concentración del stock	Producto	Volumen del stock
1 mM	Piruvato de sodio (Lonza)	5 mL
1000 µg/mL-100µg/mL	Penicilina-Estreptomicina (Bio-Whittaker)	5 mL
10 mM	Hepes (Bio-Whittaker)	5 mL
2 mM	L-Glutamina (Bio-Whittaker)	5 mL
2.8 mM	2-mercapto etanol 1:1000 p (Sigma)	1 µL por cada 1 mL de medio

Se retiró 50 mL del medio suplementado y se agregó

Producto	Volumen
Suero fetal bovino (Lonza)	50 mL

### Solución stock de MTT

Producto	Cantidad/Volumen
MTT (Sigma)	5 µg
Agua desionizada	1 mL

### Solución de isopropanol acidificado con HCl (25:1)

Producto	Cantidad/Volumen
2-propanol (isopropanol)	192 mL
HCl 0.1 M	8 mL

**Ácido clorhídrico 0.1 M**

Producto	Cantidad/Volumen
HCl (Merck)	3.646 g
Agua desionizada	1000 mL

**NDGA stock**

Producto	Cantidad/Volumen
NDGA (Sigma)	3.02 mg
DMSO (Sigma)	1 mL
HBSS (Bio-Whittaker)	9 mL

**IAA stock 1 mM**

Producto	Cantidad/Volumen
IAA (Sigma)	2.08 mg
HBSS (Bio-Whittaker)	10 mL

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 M**

Producto	Cantidad/Volumen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Sigma)	114 µL
Agua estéril	886 µL