



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL ÁCIDO NORDIHIROGUAIARÉTICO EN CÉLULAS EPITELIALES  
RENALES TRATADAS CON CISPLATINO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

Alejandra Lira León

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Soledad Funes Argüello

Instituto de Fisiología Celular

Dra. Ana María Salazar Martínez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, Enero 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri, en el Laboratorio 315 de Bioquímica de antioxidantes en el 3er. piso del edificio F1, perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por las siguientes personas:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra. María Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Ana María Salazar Martínez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Esta tesis fue apoyada por el proyecto # 220046 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el proyecto 5000-9105 del Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) y por el proyecto IN201316 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

La tesista recibió durante los estudios de maestría y el desarrollo del presente trabajo una beca otorgada por el CONACYT.

El jurado del examen estuvo conformado por:

Presidente	Dra. Lena Ruíz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Elizabeth Langley McCarron	Instituto Nacional de Cancerología
Vocal	Dra. Patricia García López	Instituto Nacional de Cancerología
Vocal	Dra. Claudia María García Cuéllar	Instituto Nacional de Cancerología
Secretaria	Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Pedraza Chaverri por dejarme formar parte de su grupo de investigación, al igual por su paciencia, apoyo y asesoría para el desarrollo de este trabajo de maestría. También al M en C Omar Noel Medina Campos por su orientación, conocimiento y calma con la ayuda técnica como teórica.

A los compañeros del laboratorio 315: Lauuu, Alfred, Jaz, Emiliano, Angela, Sabino, Clau, Gus, Diane, Tania, Bibi y Pedrito son un gran equipo y los quiero mucho, gracias a cada uno por sus consejos, bromas, críticas, ánimo y porras, lecciones, alegría, confianza y amistad. Sé que lograrán ser grandes científicos y bulleadores. A Lety y a Lalo por el apoyo en el material y su confianza.

A los compañeros que conocí durante los cursos: Sam, Gaby, Antonio, Sacni, Renata Erick, Caro, Isa, Tadeo, Héctor, Esteban y Bere. Gracias por sus advertencias, consejos y buena vibra. A cada uno lo aprecio y sé que serán buenos M en C.

A mis colegas biólogos de la FES Iztacala, que aunque el camino nos ha separado, me alegra saberlos bien y superándose cada día. Los recuerdo con mucho cariño y los admiro.

A Tecilli, me ayudaste muchísimo antes de que esta etapa comenzara pero sin tu apoyo y guía esto no hubiese iniciado. Te quiero mucho amiga.

## DEDICATORIA

Principalmente a mi familia, a mis papás Alfonso y Rossy que por todo su apoyo, dedicación, esfuerzo, tolerancia, paciencia y cariño me han permitido avanzar hasta este punto; gracias por creer en mí y aceptarme como soy. ¡Los amo demasiado!

A mis hermanas Gaby y Laura, sin su locura, alegría, apoyo, cariño y regaños no hubiesen cumplido su rol de sistas. Gracias por escucharme cuando lo necesito y siempre estar ahí. Somos un gran equipo y vamos mejorando. Las amo aunque las desesperé a veces :D.

A mi novio Norberto, por tu compañía, amor, mucha paciencia, atención, respeto y aceptación, me has ayudado a culminar esta etapa también. Gracias por caminar conmigo este tiempo. Te amo enormemente.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>II. ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>III. ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>IV. RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Cisplatino (CDDP)</i>	13
1.2 <i>Los mecanismos de la nefrotoxicidad inducida por CDDP</i>	14
1.3 <i>La autofagia</i>	15
1.4 <i>Especies reactivas de oxígeno (ERO) y antioxidantes</i>	18
1.5 <i>Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)</i>	22
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
2.1 <i>El efecto del NDGA en modelos de estrés oxidante renal</i>	23
2.1.1 <i>Modelo in vitro</i>	23
2.1.2 <i>Modelo in vivo</i>	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>25</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
5.1 <i>Objetivo general</i>	26
5.2 <i>Objetivos particulares</i>	26
<b>6. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>27</b>
6.1 <i>Materiales</i>	27
6.2 <i>Metodología</i>	28
6.2.1 <i>Cultivo celular</i>	28
6.2.2 <i>Preparación del NDGA</i>	28
6.2.3 <i>Preparación del CDDP</i>	28
6.2.4 <i>Ensayo de viabilidad</i>	28
6.2.5 <i>Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>)</i>	29
6.2.6 <i>Esquema de citoprotección del NDGA ante el CDDP</i>	29
6.2.7 <i>Extracción de proteínas totales en células LLC-PK<sub>1</sub></i>	30
6.2.8 <i>Cuantificación de proteínas totales</i>	30

6.2.9 <i>Western blot</i>	31
6.2.10 <i>Análisis estadístico</i>	31
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
7.1 <i>Determinación de la <math>CI_{50}</math> de CDDP</i>	33
7.2 <i>Esquema citoprotector del NDGA contra el efecto del CDDP</i>	36
7.3 <i>Evaluación de la lipoperoxidación por la inmunodetección de 4-HNE</i>	39
7.4 <i>Evaluación del flujo autofágico</i>	41
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>47</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>53</b>
12.1 <i>Evaluación de la estabilidad y pureza del NDGA</i>	53
12.2 <i>Evaluación de la citoprotección del NDGA ante el CDDP</i>	55

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
– <b>Figura 1.</b> Mecanismo de acción del CDDP sobre el ADN.	13
– <b>Figura 2.</b> Etapas del flujo autofágico.	17
– <b>Figura 3.</b> Sistema de señalización sensible al estado redox intracelular <i>Nrf2/Keap1/ARE</i> .	21
– <b>Figura 4.</b> Estructura química del NDGA.	22
– <b>Figura 5.</b> Efecto del CDDP (A) y del NDGA (B) sobre la viabilidad de las células LLC-PK <sub>1</sub> (determinación de la CI <sub>50</sub> ).	33
– <b>Figura 6.</b> Micrografías de células LLC-PK <sub>1</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CDDP después 24 h de tratamiento.	34
– <b>Figura 7.</b> Micrografías de células LLC-PK <sub>1</sub> tratadas con diferentes concentraciones de NDGA después 24 h de tratamiento.	35
– <b>Figura 8.</b> El pretratamiento con NDGA citoprotege frente a CDDP.	38
– <b>Figura 9.</b> El pretratamiento con NDGA disminuye la lipoperoxidación (4-HNE) inducida por CDDP a partir de las 6 h.	40
– <b>Figura 10.</b> El pretratamiento con NDGA disminuye la autofagia inducida por CDDP a partir de las 6 h.	42
– <b>Figura 11.</b> El tratamiento con NDGA disminuye los niveles de p62-SQSM1 indicando degradación autofágica a las 24 h.	43
– <b>Figura 1A.</b> Análisis de resonancia magnética nuclear del NDGA.	53
– <b>Figura 1.1A.</b> Análisis de resonancia magnética nuclear del masoprocol.	54
– <b>Figura 2A.</b> El pretratamiento con NDGA por 6 h no protegió contra el CDDP en incubación por 24 h.	55
– <b>Figura 3A.</b> El pretratamiento con NDGA por 24 h no protegió contra el CDDP en incubación por 24 h.	56
– <b>Figura 4A.</b> El pretratamiento con NDGA por 30 min no protegió contra el CDDP en coincubación por 24 h	57
– <b>Figura 5A.</b> El pretratamiento con NDGA por 6 h no protegió contra el CDDP en coincubación por 24 h.	58
– <b>Figura 6A.</b> El pretratamiento con NDGA por 30 min no protegió contra el CDDP en coincubación por 24 h.	59
– <b>Figura 7A.</b> El pretratamiento con NDGA por 24 h no protegió contra el CDDP en incubación por 24 h.	60

## II. ÍNDICE DE TABLAS

• <b>Tabla 1.</b> Estrategias para la evaluación del efecto del NDGA ante la citotoxicidad del CDDP.	30
--	----



### III. ABREVIATURAS

°C	Grados celsius
·OH	Radical hidroxilo
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete
3-NT	3-nitrotirosina
4-HNE	4-hidroxinonenal
8-oxodG	8-oxo—7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
AB	Antibiótico penicilina/estreptomicina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANADEVA	Análisis de varianza
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ASB	Albúmina sérica bovina
Atg12-Atg5-Atg16	Sistema de conjugación –ubiquitinación
Atg5	Proteína 5 asociada a la autofagia
Atg9	Proteína 9 asociada a la autofagia transmembranal
CDDP	Cisplatino
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50%
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Radical carbonato
CTRL	Grupo control
Cu <sup>2+</sup>	Cobre (II)
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Diacetato de fluoresceína
Fe <sup>2+</sup>	Hierro (II)
Fe-NTA	Nitrilotriacetato férrico

GSH	Glutación
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HOCl	Hipoclorito
HSP	Proteínas de choque térmico
IR	Isquemia-reperfusión
Keap1	Proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH
LC3-II	Cadena ligera 3 de las proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B conjugada a fosfatidiletanolamina
LLC-PK <sub>1</sub>	Células renales de epitelio de túbulo proximal de cerdo
MDA	Malondialdehído
MEFs	Células embrionarias de fibroblastos de ratón
mTORC1	Complejo 1 de la diana de rapamicina de mamífero
NDGA+CDDP	Grupo pretratado con NDGA en coincubación con CDDP
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NO <sup>•</sup>	Radical de óxido nítrico
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
OCTs	Transportadores orgánico catiónicos
-OH	Grupo hidroxilo
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
p62-SQSTM1	Proteína adaptadora 62 o sequestrosoma
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PE	Fosfatidiletanolamina

PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa clase III
RIPA	Amortiguador de radioinmunoprecipitación para lisis de células
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
Ub	Ubiquitina
ULK	Complejo descoordinado-51 cinasa
VPS34	Proteína vacuolar de clasificación 34

## IV. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El cisplatino es un agente antineoplásico utilizado para el tratamiento de tumores sólidos. Sin embargo, el estrés oxidante inducido por cisplatino (CDDP, *cis*-diaminodicloroplatino) en células epiteliales del túbulo proximal afecta al ADN formando aductos, disminuye los niveles de glutatión (GSH) y de enzimas antioxidantes, aumenta la lipoperoxidación, promueve la disfunción mitocondrial, aumenta la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y conduce a la muerte celular conocida como apoptosis. La autofagia es un mecanismo de defensa y sobrevivencia en condiciones de estrés y daño para mantener la homeostasis celular degradando macromoléculas dañadas. El CDDP induce este mecanismo antes de conducir a la apoptosis, lo que indica un mecanismo nefroprotector. Una forma de contrarrestar el estrés oxidante es el empleo de compuestos fenólicos de origen natural como el ácido nordihidroguaiarético (NDGA). Este compuesto presenta capacidad antioxidante directa (como atrapador de radicales libres) e indirecta (como activador de la vía del factor transcripcional 2 relacionado con el factor nuclear eritroide (Nrf2) asociada a la expresión de enzimas antioxidantes).

**JUSTIFICACIÓN:** Debido a que el empleo del CDDP en la clínica como agente anti-neoplásico causa que alrededor del 25-35% de los pacientes desarrollen nefrotoxicidad, es de interés buscar estrategias que reduzcan este efecto adverso. El daño oxidante inducido por CDDP conduce a la activación de la autofagia como mecanismo de sobrevivencia pero el estrés oxidante persiste conduciendo hacia la apoptosis. Dicho esto, el uso de antioxidantes naturales, como el NDGA, se propone como una estrategia para evitar el daño oxidante y así mantener el nivel basal de la autofagia para atenuar el efecto nefrotóxico del cisplatino.

**HIPÓTESIS:** El daño oxidante generado por el CDDP conduce a la activación de la autofagia, por lo que la capacidad antioxidante del NDGA prevendrá el daño de manera que la autofagia no incremente y se mantenga a nivel basal.

**OBJETIVO GENERAL:** Evaluar el efecto del NDGA en la lipoperoxidación y sobre la autofagia en células LLC-PK<sub>1</sub> tratadas con cisplatino.

**MÉTODOS:** Con células LLC-PK<sub>1</sub> cultivadas se formaron 4 grupos: control (CTRL), CDDP, NDGA y NDGA + CDDP en los que, mediante viabilidad celular, se determinaron la  $CI_{50}$  del CDDP y las condiciones de citoprotección debida al NDGA. También se evaluó la lipoperoxidación mediante la detección de 4-hidroxinonenal (4-HNE) así como el flujo autofágico mediante la expresión de LC3-II y p62-SQSTM1 a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h).

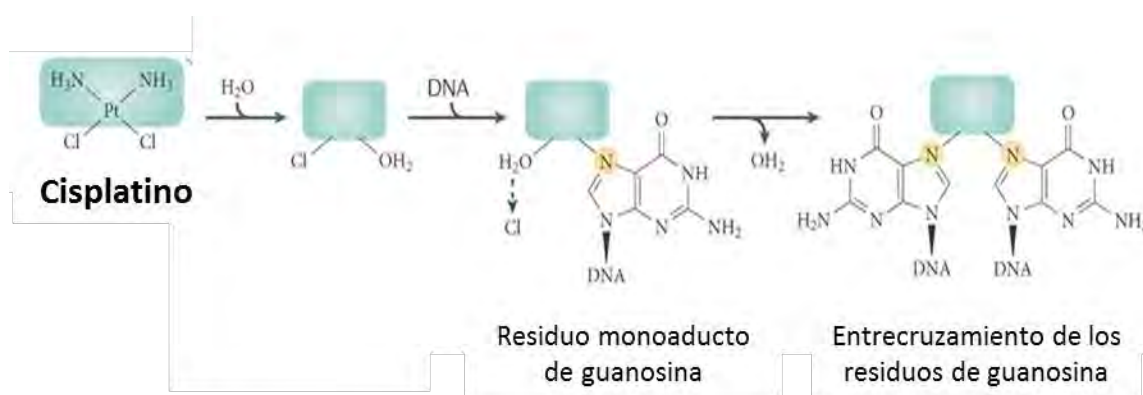
**RESULTADOS:** A una densidad de 75,000 cél/cm<sup>2</sup>, la CI<sub>50</sub> del CDDP fue de 30.70 ± 13.53 μM. El esquema de citoprotección fue el pretratamiento con NDGA 0.8 μM por 6 h en coincidencia con CDDP 25 μM por 24 h. El CDDP incrementó la lipoperoxidación a las 6 h, mientras que el pretratamiento con NDGA presentó la disminución de este parámetro. En el mismo periodo, el CDDP aumentó la expresión de LC3-II y el pretratamiento con NDGA lo disminuyó a un 50%. Por otro lado, el NDGA disminuyó significativamente la expresión de p62 en un 76% durante las 24 h en comparación a los grupos CTRL, CDDP y NDGA+CDDP donde éste aumentó un 13% (\*p<0.05).

**CONCLUSIÓN:** La protección del NDGA ante la nefrotoxicidad del CDDP está asociada a la disminución de la lipoperoxidación y de la autofagia inducidas por ese antineoplásico.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cisplatino (CDDP)

El cisplatino (CDDP) es un antineoplásico inorgánico metal fármaco formado por un átomo de platino (II) unido a dos átomos de cloro y a dos grupos amonio en posición *cis* (**Figura 1**) que se usa en el tratamiento de pacientes con cáncer que presenten tumores sólidos. El mecanismo de acción del CDDP es la formación de complejos con las bases nitrogenadas del ADN después de la disociación de uno de los átomos de cloro. La interacción del CDDP con el ADN genera entrecruzamientos entre las bases de las dos hebras (*interstrand*) o dentro de las bases de la misma hebra (*intrastrand*) probablemente entre el nitrógeno (N<sup>7</sup>) de las guaninas (**Figura 1**).



**Figura 1. Mecanismo de acción del CDDP sobre el ADN.**

\*Imagen modificada de Deans y West, 2011.

La formación de estos entrecruzamientos en el ADN tiene como resultado templados defectuosos, alteraciones en los procesos de síntesis y replicación del ADN y daño irreversible que induce la muerte celular conocida como apoptosis [Pabla y Dong, 2008]. Adicionalmente, el CDDP también genera efectos secundarios como nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad digestiva y toxicidad hematológica [Dasari y Bernard, 2014; Ramón *et al.*, 2012].

La nefrotoxicidad ocurre en el sistema tubular de la nefrona (que es la unidad funcional del riñón), principalmente en los túbulos proximales cuya función primordial es reducir en un 60-70% la carga filtrada mediante la recuperación de

agua, sales, glucosa, aminoácidos, bicarbonato y fosfato. Este tejido epitelial tiene un alto contenido mitocondrial debido a su gran actividad metabólica [Hernández-Tresguerres, 2010].

## **1.2 Los mecanismos de la nefrotoxicidad inducida por CDDP.**

Los túbulos proximales renales expresan transportadores orgánicos catiónicos (OCTs, por sus siglas en inglés) por los cuales se introduce el CDDP. Una vez dentro de las células el CDDP ocasiona estrés oxidante por varios mecanismos. En solución acuosa, el CDDP reacciona rápidamente con los grupos tioles del glutatión (GSH) y de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa, hemo oxigenasa-1, tioredoxina reductasa, entre otras), con lo que reduce la capacidad antioxidante y permite la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) endógenas y el consecuente daño oxidante a macromoléculas [Pabla y Dong, 2008]. Además, el CDDP induce disfunción de la cadena transportadora de electrones mitocondrial lo que aumenta la producción de ERO, principalmente del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) [Pabla y Dong, 2008].

El metabolismo energético mitocondrial es reconocido como la fuente principal de la producción de ERO y esta producción es un proceso requerido para la regulación de varios procesos celulares. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) está involucrado en la regulación del ciclo celular, la respuesta al estrés, el metabolismo energético, el balance redox y daño al ADN [Hamanaka y Chandel, 2010]. Se ha propuesto que las concentraciones de ERO regulan diversas vías de señalización: 1) niveles bajos de  $O_2^{\cdot -}$  mitocondrial se requieren para la proliferación y la diferenciación celular; 2) el estrés celular moderado induce niveles de  $O_2^{\cdot -}$  que activa sistemas adaptativos, incluyendo la regulación activa de genes antioxidantes; 3) a altos niveles, las ERO activan los procesos iniciales de la senescencia y la muerte celular [Hamanaka y Chandel, 2010].

Además de los efectos antes mencionados del CDDP, Yang y colaboradores, (2008) describieron la activación de autofagia entre las 2 a 4 h después de la exposición a CDDP 50  $\mu$ M en células LLC-PK<sub>1</sub> evaluando marcadores como el complejo beclina-1, la proteína 5 asociada a la autofagia (Atg5) y la cadena ligera 3 de las proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B conjugada a fofatidiletanolamina (LC3-II). Mientras tanto, entre las 8-24 h inicia el proceso de apoptosis, esto demostrado por la activación de la caspasa-3 [Kaushal *et al.*, 2001]. En el mismo modelo *in vitro*, la inhibición de la formación del autofagosoma con wortmanina promovió directamente la apoptosis. Por lo tanto, los autores sugirieron que la autofagia es un mecanismo de supervivencia celular en respuesta al daño por CDDP.

### 1.3 La autofagia

La autofagia es un proceso altamente conservado en organismos pluricelulares que mantiene la homeostasis intracelular mediante la degradación y el reciclaje de macromoléculas y organelos dañados que son rodeados por estructuras de doble membrana llamados autofagosomas los cuales se fusionan con los lisosomas (autofagolisosomas) para la digestión hidrolítica de éstos [Green y Levine, 2014; Kaushal y Shah, 2015].

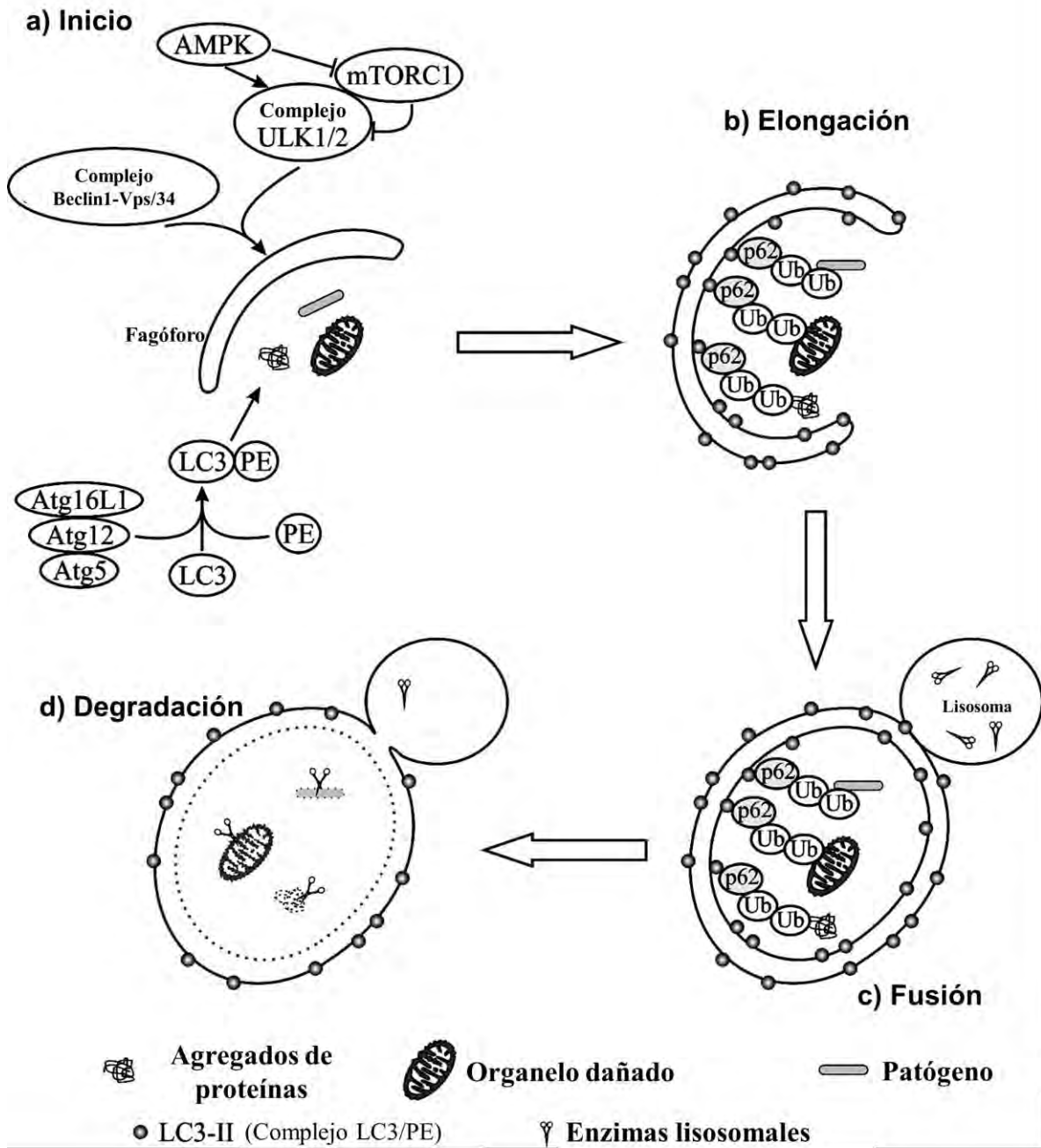
El flujo autofágico se describe como el proceso dinámico de la síntesis del autofagosoma, la fusión del autofagosoma con el lisosoma y la degradación lisosomal [Mizushima *et al.*, 2010]. Las señales que activan este proceso provienen de diferentes condiciones de estrés como lo son el ayuno, la hipoxia, el estrés oxidante, estrés del retículo endoplásmico y otros [Dikic y Eleazar, 2018].

El ayuno es la condición mejor comprendida donde la inhibición del complejo diana a rapamicina en mamíferos (mTORC, por sus siglas en inglés) conduce a la activación de la autofagia por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), proteína sensorial de los niveles de ATP intracelulares (**Figura 2**). La formación de autofagosomas inicia con la activación de los complejos proteicos de autofagia: el



complejo descoordinado-51 cinasa (ULK)1/ULK2; el complejo beclina-1/ fosfatidilinositol-3 cinasa clase III (PI3K); proteínas transmembranales como la proteína 9 asociada a la autofagia transmembranal (Atg9) y la proteína vacuolar de clasificación 1 (VPS34); el sistema de conjugación–ubiquitinación Atg12-Atg5-Atg16 y la lipidación de la cadena ligera (LC)-3 con fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-II.

La asociación del complejo ULK1/2 y del complejo beclina-1/PI3K con la membrana del fagóforo promueve el inicio de la formación del autofagosoma y la interacción de estos complejos modifica la membrana del fagóforo brindándole estabilidad, elongación y curvatura. Varias membranas celulares, incluyendo la membrana plasmática, mitocondrial, de endosomas de reciclaje y el aparato de Golgi, contribuyen a la elongación de la membrana del autofagosoma por la donación de este material que es almacenado y dirigido por las vesículas de Atg9 hacia el fagóforo [Dikic y Elazar, 2018]. La asociación de los dos últimos complejos: Atg12-Atg5-Atg6 y LC3-II conducen a la elongación y expansión para el cierre del autofagosoma. Por último, la fusión entre el lisosoma y el autofagosoma conduce a la degradación de la carga autofágica (organelos dañados, agregados proteicos, patógenos) por las enzimas hidrolasas (**Figura 2**) [Kaushal y Shah, 2015].



**Figura 2. Etapas del flujo autofágico.** PE: fosfatidiletanolamina; Ub: proteína ubiquitinada; p62: o SQSTM1, proteína adaptadora de la carga. \*Imagen modificada de Zenkov *et al.*, 2016.

La autofagia regula la muerte celular tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones patológicas. En condiciones basales este proceso mantiene la homeostasis celular mientras que en condiciones patológicas provee capacidad de sobrevivencia a la célula, sin embargo, la autofagia crónica o la activación inadecuada de este proceso resulta en la muerte celular [Yang *et al.*, 2008]. Un ejemplo de esto, es el estrés oxidante [Kaushal y Shah, 2015].

#### 1.4 ERO y antioxidantes

El estrés oxidante es el desequilibrio entre la producción de las ERO y los sistemas antioxidantes celulares. Esta condición sucede cuando las enzimas antioxidantes y los antioxidantes no enzimáticos como el GSH, la biliverdina, la bilirrubina, el ácido úrico, las vitaminas C y E, transferrina, ferritina y ceruloplasmina, no son suficientes para neutralizar o reducir la cantidad de estas moléculas reactivas. por lo que las ERO se acumulan y reaccionan con las macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos ribonucleicos) alterando sus propiedades estructurales y funcionales. Esta situación se denomina daño oxidante [Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006; Egea *et al.*, 2017].

Las ERO se clasifican en dos tipos: los radicales libres y los no radicales. Los primeros son especies químicas que pueden existir de forma independiente y que contienen en su último orbital uno o más electrones desapareados lo cual les confiere mayor reactividad. Algunos ejemplos son:  $O_2^{\cdot-}$ , el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) y el radical carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ). Mientras los no radicales son derivados de la reducción molecular del oxígeno y son muy reactivos, como el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el hipoclorito ( $HOCl^-$ ) [Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006].

Las ERO actúan como reguladores celulares pero pueden convertirse en tóxicos y nocivos si el daño oxidante que causan es intenso, duradero y que no logra ser revertido o reparado. Este desbalance se ha asociado con la aparición y el

desarrollo de patologías que implican estrés oxidante e inflamación como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, hipertensión y enfermedades neurodegenerativas (Figueira *et al.*, 2013).

El daño oxidante puede detectarse y evaluarse mediante la medición de la producción de ERO de ciertas fuentes usando moléculas fluorescentes, midiendo la actividad y expresión de enzimas antioxidantes, y por último, mediante la detección de los productos de la oxidación de lípidos, como son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonal (4-HNE); de proteínas, como la 3-nitrotirosina (3-NT) y de los ácidos nucleicos como 8-oxo—7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) [Egea *et al.*, 2017].

Por este motivo, el uso de antioxidantes ha sido una alternativa para contrarrestar estas alteraciones especialmente los de origen natural que se encuentran en frutos, vegetales y semillas. La investigación de compuestos fenólicos de estas fuentes alimentarias ha permitido evaluar la capacidad y actividad de forma directa e indirecta cuyo efecto proteja del estrés oxidante.

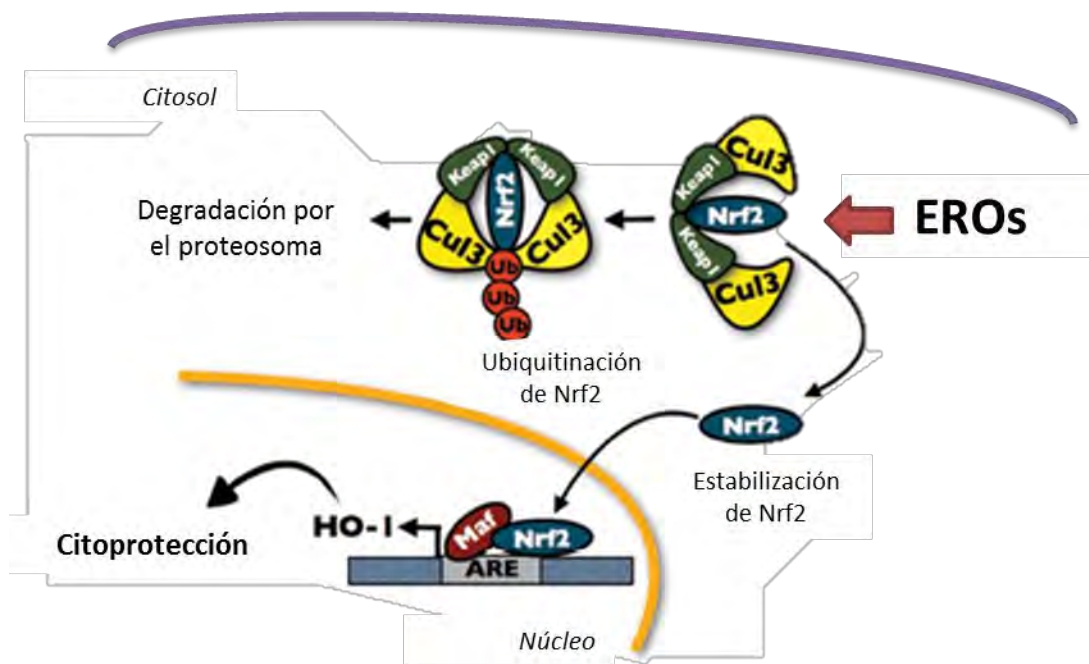
Un antioxidante es cualquier molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de un sustrato biológico. Los antioxidantes se clasifican de acuerdo a Halliwell y Gutteridge [1999] en:

- (a) Enzimas antioxidantes, o agentes antioxidantes de alto peso molecular, remueven las ERO, como superóxido dismutasa, la catalasa, las peroxidases, y otras enzimas específicas para el grupo tiol (tioredoxina reductasas).
- (b) Proteínas que abaten la disponibilidad de los prooxidantes, tal como los iones de hierro ( $Fe^{2+}$ ) y cobre ( $Cu^{2+}$ ), como la ferritina, transferrina y ceruloplasmina.
- (c) Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño por otros mecanismos, como las proteínas de choque térmico (HSP) o chaperonas que se localizan en el retículo endoplásmico, citoplasma y periplasma. Éstas evitan el mal plegamiento de las proteínas.

- (d) Antioxidantes no enzimáticos, o agentes antioxidantes de bajo peso molecular, que atrapan todo tipo de especies reactivas.

El mecanismo de acción de los antioxidantes es la interacción directa con los radicales libres, esto es, tienen la capacidad de actuar como atrapadores o “scavengers” de estas especies reactivas. Los antioxidantes son capaces de transferir un electrón o un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón) al radical para estabilizarlo electrónicamente y pierda su reactividad; por lo tanto, los antioxidantes también se oxidan a una forma de baja o nula reactividad hacia su entorno [Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006]. De esta manera, el antioxidante evitará el inicio y/o propagación de procesos oxidantes que afecten a las biomoléculas. Estos agentes antioxidantes provienen de la dieta y tienen una estructura química que presenta ciertos grupos funcionales como el hidroxilo (-OH) característico de los polifenoles y tocoferoles [Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006].

Otro mecanismo descrito en el efecto de antioxidantes es el sistema de señalización sensible al estado redox intracelular *Nrf2/Keap1/ARE*. Este sistema se compone por el factor transcripcional 2 relacionado con el factor nuclear eritroide (Nrf2) que regula la expresión de genes que contienen en su promotor la secuencia ARE (por sus siglas en inglés Antioxidant Respon(si)ve Element). En condiciones basales, Nrf2 está unido a Keap1 (proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH) y a Culina 3 y esta asociación mantiene bajos niveles de Nrf2 a través de su ubiquitinación (marcaje para ir a degradación en el proteosoma) e inhibe su translocación al núcleo (**Figura 3**). La estrecha relación de estos 4 componentes resulta en el mantenimiento de la homeostasis intracelular bajo las condiciones de inducción de la apoptosis, cáncer y estrés oxidante [Zenkov *et al.*, 2016].



**Figura 3. Esquema de sistema de señalización sensible al estado redox intracelular *Nrf2/Keap1/ARE*.** \*Imagen modificada de Hernández-Damián *et al.*, 2014.

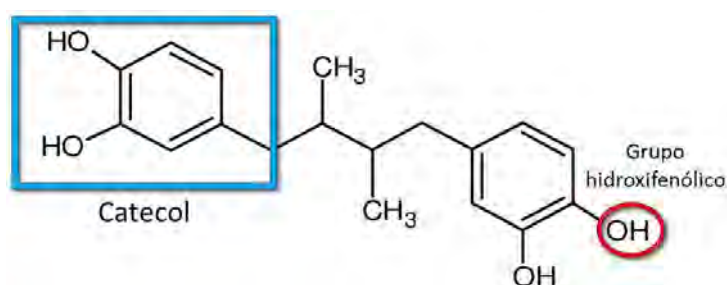
La secuencia ARE controla la expresión de más de 500 genes, entre los cuales se identifican dos grupos importantes de enzimas antioxidantes. El primero incluye a la hemo oxigenasa-1 (HO-1), la glutatión peroxidasa 2, la glutamato-cisteína ligasa, la glutatión reductasa, tiorredoxina reductasa, entre otras. Y el segundo grupo se denomina como enzimas de la segunda fase de la detoxificación de xenobióticos que incluye la glutatión-S- transferasa, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH<sup>+</sup>):quinona oxidoreductasa 1, UDP-glucuronosiltransferasa, entre otras [Zenkov *et al.*, 2016].

La inducción del sistema antioxidante *Nrf2/Keap1/ARE* por compuestos fenólicos brinda protección a la célula de forma indirecta ante el estrés oxidante. Pero también se ha mencionado que este grupo de compuestos pueden inducir la autofagia, ejemplos de ello son la curcumina y el resveratrol [Zenkov *et al.*, 2016]. La activación de la autofagia por la curcumina favorece a diferentes niveles, principalmente, la inhibición de la vía Akt/mTORC1 [Han *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2012; Aoki *et al.*, 2007], la fosforilación de AMPK [Xiao *et al.*, 2013] y el

aumento en la expresión de beclina-1 y LC3-II [Mosieniak *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2009]. Por otra lado, el resveratrol también induce la autofagia por la inhibición de la vía Akt/mTOR [Zhang *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2010; Scarlatti *et al.*, 2008] y la activación de la vía AMPK/SIRT1 [Zhang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2010]. Otro compuesto perteneciente a este grupo, es el ácido nordihidroguaiarético [Zhang *et al.*, 2012; Guzmán-Beltrán *et al.*, 2016].

### 1.5 Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)

El NDGA es un metabolito obtenido de las hojas de *Larrea tridentata*, el contenido de esta molécula es de aproximadamente entre el 10-15% del peso seco [Tyler, 1994]. El NDGA tiene una estructura química formada por dos catecoles a los extremos de una cadena corta de alcanos (**Figura 4**); sus grupos hidroxifenólicos son capaces de ceder electrones lo que lo convierte en una molécula antioxidante capaz de atrapar radicales libres y ERO tales como el  $^1\text{O}_2$ , el radical  $\text{OH}^\bullet$  y el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [Floriano-Sánchez *et al.*, 2006]. El NDGA también promueve actividad antioxidante de las células a partir de la activación de la vía *Nrf2/Keap1/ARE* en modelos de isquemia-reperfusión [Zúñiga-Toalá *et al.*, 2013] y de estrés oxidante [Rojo *et al.*, 2012].



**Figura 4. Estructura química del NDGA.**

También se ha demostrado que el NDGA presenta un efecto citoprotector ante diversas patologías (diabetes, cáncer, artritis, daño renal y enfermedades neurodegenerativas) [Lü *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2014].

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 El efecto del NDGA en modelos de estrés oxidante renal**

#### **2.1.1 Modelo *in vitro***

En el estudio de Rojo y colaboradores (2012) en células LLC-PK<sub>1</sub> pretratadas con 15 µM de NDGA por 6 h y después expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (como agente inductor de daño) durante 2 h se observó un efecto citoprotector que se reflejó en el mantenimiento de la viabilidad celular. Este efecto se asoció a la activación de la enzima hemo oxigenasa-1 y a la disminución significativa de ERO respecto al grupo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pues cuando la actividad de la HO-1 se inhibió los niveles de ERO aumentaron.

#### **2.1.2 Modelos *in vivo***

El nitrilotriacetato férrico (Fe-NTA) es un carcinogénico renal que induce daño renal y hepático a través de la formación de radicales libres (principalmente OH<sup>•</sup>) lo que causa un incremento en la lipoperoxidación medido éste como presencia de 4-HNE. En el riñón, el Fe-NTA actúa sobre el túbulo proximal ocasionando apoptosis y/o necrosis (dependiendo de la dosis del tóxico), esto se explica por un aumento de la concentración de Fe<sup>+2</sup> libre en suero (reacción de Fenton) además de daño al ADN donde se detectó la ruptura de una o de las dos hebras, entrecruzamiento ADN-proteína y formación de 8-OH-dG [Umemura *et al.*, 1990]. Sin embargo, el pretratamiento de NDGA (2 mg/ratón/día durante 1 semana) en un modelo de ratones Swiss albino macho tratados con Fe-NTA, revirtió estos efectos dañinos tanto en hígado como en riñón [Ansar *et al.*, 1999].

La diabetes mellitus se caracteriza por la condición de hiperglicemia la cual se ha reportado produce un incremento en el estrés oxidante a través de la generación de radicales libres [Trachtman *et al.*, 1993]. En asociación a esto, en un modelo de nefropatía diabética inducido por estreptozotocina en ratas Sprague Dawley macho, el tratamiento con NDGA (10 mg/kg/día inyección subcutánea) durante 4 semanas después a la inducción (a partir de la cuarta semana) causó



una mejoría en la función renal asociada a la atenuación del aumento del estrés oxidante ya que los niveles de GSH y la actividad de enzimas antioxidantes se restauraron y se atenuaron las alteraciones morfológicas en el riñón por lo que se concluyó que el NDGA protegió al riñón de los efectos dañinos de la hiperglicemia [Anjaneyulu y Chopra, 2004].

En un modelo de isquemia-reperfusión (IR) renal en ratas Wistar macho, la administración de NDGA (10 mg/Kg/día) durante 3 días previno el daño renal pues evitó el aumento de los marcadores de función renal (nitrógeno ureico en la sangre y creatinina) y la actividad de las enzimas antioxidantes y la función mitocondrial no se alteraron. Además la muerte celular necrótica disminuyó en el tejido renal respecto al grupo IR. Por lo tanto, el NDGA protegió del daño renal inducido por IR [Zúñiga-Toalá *et al.*, 2013].

Por otro lado, la combinación de NDGA y cisplatino en un modelo de cáncer de mama en ratas hembra Sprague-Dawley disminuyó la nefrotoxicidad inducida por el antineoplásico pues el daño a la función renal se atenuó al igual que la pérdida de peso corporal y del peso del riñón. Esto se confirmó en la restauración de la actividad de la catalasa y superóxido dismutasa y del contenido de GSH en el tejido renal además de la conservación histológica de los túbulos renales. También se describió una mejoría en la actividad antitumoral del cisplatino percibido en la disminución del volumen del tumor y la diferenciación del tejido celular mamario [Mundhe *et al.*, 2015].

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que el empleo en la clínica del CDDP como agente anti-neoplásico causa que alrededor del 25-35% de los pacientes desarrollen nefrotoxicidad, es de interés buscar estrategias que reduzcan este efecto adverso. El daño oxidante inducido por CDDP conduce a la activación de la autofagia como mecanismo de sobrevivencia pero si el estrés oxidante persiste conduce hacia la apoptosis. Con base a esto, el uso de antioxidantes naturales como el NDGA, se propone como una estrategia para prevenir el daño oxidante, como la lipoperoxidación, y así mantener la autofagia a nivel basal con el fin de atenuar el efecto nefrotóxico del cisplatino. En este estudio, se utilizó un modelo *in vitro* ocupando la línea celular LLC-PK<sub>1</sub>, la cual se caracteriza por derivar de células epiteliales de túbulo proximal de cerdo. La línea es fácil de crecer, mantener y conserva las funciones básicas de un epitelio renal. Además, es el modelo de estudio más utilizado para evaluar los mecanismos inducidos por cisplatino para el desarrollo de la nefrotoxicidad.

### **4. HIPÓTESIS**

El daño oxidante a lípidos generado por el CDDP conduce a la activación de la autofagia, por lo que la capacidad antioxidante del NDGA prevendrá el daño de manera que la autofagia se mantenga en niveles basales.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del NDGA en la lipoperoxidación y en la autofagia de células LLC-PK<sub>1</sub> tratadas con cisplatino.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular por CDDP.
- Determinación del esquema citoprotector por el NDGA ante la toxicidad del CDDP.
- Evaluación de la lipoperoxidación y el flujo autofágico a través del tiempo ante el esquema citoprotector por el NDGA ante la toxicidad del CDDP.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIALES

Las células epiteliales de túbulo proximal de cerdo (LLC-PK<sub>1</sub>) se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA). El *cis*-Diamino dicloro-platino (cisplatino, P4394 II), el diacetato de fluoresceína (FDA), dimetil sulfóxido (DMSO), tween 20, dodecil sulfato de sodio (SDS), 4-nonil-fenil-poli-etilenglicol (NP-40), desoxicolato de sodio, 2-mercaptoetanol, fluoruro de sodio (NaF), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el cocktail de inhibidores de proteasas, ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), pirofosfato de sodio, glicerolfosfato, glicerol, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), tripsina-EDTA, albúmina sérica bovina (ASB) y el NDGA se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomina (AB) se adquirieron de Biowest (Riverside, MO, EUA). El cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato de sodio monobásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato de sodio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), carbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) disódico, alcohol isopropílico y ácido clorhídrico se adquirieron de JT Baker (Center Valley, PA, EUA). El cloruro de potasio (KCl) se obtuvo de Mallinckrodt pcl (St. Louis, MO, EUA). Las membranas de nitrocelulosa se adquirieron de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Los anticuerpos primarios para anti- $\alpha$ -tubulina, anti-LC3-II y anti-p62-SQSTM-1 se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El anticuerpo anti 4-HNE se adquirió de Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800CW y IRDye 680RD se adquirieron de LI-COR (Lincoln, NE, EUA). El marcador de peso molecular de amplio rango Dual Color Standards #1610374 se adquirió de Bio-Rad (Hercules, California, EUA).

## 6.2 METODOLOGÍA

### 6.2.1 Cultivo celular

La línea celular LLC-PK<sub>1</sub> obtenida del epitelio renal porcino se cultivó con medio DMEM suplementado con SFB al 10%, bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 0.33% y antibiótico penicilina/estreptomina (AB) al 1%. Las células se incubaron a una temperatura de 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. El manejo de las células se llevó a cabo en una campana de seguridad biológica clase II. Para los ensayos se utilizó una densidad celular de 75,000 cél/cm<sup>2</sup>. Las células se ocuparon entre el número de pases 10-30.

### 6.2.2 Preparación del NDGA

Se preparó un stock de NDGA 1 mM de la siguiente manera: Se pesaron 3.02 mg de NDGA y se disolvieron en 0.05 ml de DMSO, luego se añadieron 9.95 ml de agua destilada y esta solución se esterilizó usando filtros de 0.22 µm manteniéndose además protegida de la luz.

### 6.2.3 Preparación del CDDP

Para la preparación de la solución de CDDP se evitó en todo momento su contacto con material metálico. El CDDP se disolvió en solución salina (NaCl 0.9%) a una concentración final de 1.67 mM (0.5 mg / mL) y la solución se mantuvo protegida de la luz hasta su uso.

### 6.2.4 Ensayo de viabilidad

Se determinó la viabilidad celular a través del ensayo de fluorescencia de FDA basado en la hidrólisis de éste por parte de las esterasas contenidas en las células vivas. Los ensayos de viabilidad celular se realizaron en placas de 48 pozos (Corning, NY, EUA). Después de que las células LLC-PK<sub>1</sub> estuvieron 24 h en la incubadora fueron expuestas por separado a diferentes concentraciones de CDDP (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 100 µM) y de NDGA (0, 1, 2.5, 3, 10, 15, 30 y 60 µM) por 24 h en DMEM con SFB al 1%. Cada tratamiento se realizó 4 veces.

Veinticuatro horas después de la exposición a CDDP y a NDGA las células se lavaron 3 veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 y después se añadieron a cada pozo 2 µg/mL de FDA en 300 µL de DMEM con SFB al 1% y se incubó por 5 min a 37°C. Se lavó con PBS y se determinó la fluorescencia a una excitación de 485 nm y a una emisión a 520 nm en un lector multimodal de microplacas Synergy HT (BioTek; Winooski, VT EUA). Los valores de fluorescencia obtenidos se convirtieron a porcentaje de viabilidad (%) considerando al grupo control como el 100%.

#### *6.2.5. Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>)*

La CI<sub>50</sub> para cada tratamiento se calculó por un análisis de regresión lineal entre el log<sub>10</sub> de cada concentración vs el % de viabilidad por cada experimento. Se obtuvo la ecuación lineal ( $y = mx + b$ ), en la que los valores de  $m$  y  $b$  se sustituyeron en la siguiente ecuación:  $\log CI_{50} = \frac{(50-b)}{m}$ ; y por último, se calculó el antilog ( $\log CI_{50}$ ) de cada experimento para promediarlos y obtener la desviación estándar.

#### *6.2.6 Esquema de citoprotección del NDGA ante el CDDP*

El esquema de citoprotección del NDGA contra el CDDP se realizó con 4 grupos experimentales: (1) células control (CTRL); (2) células expuestas a cisplatino (CDDP); (3) células expuestas a NDGA más cisplatino (NDGA + CDDP) y (4) células expuestas a NDGA (NDGA). Se evaluaron diferentes esquemas de tratamientos (**Tabla 1**) midiendo la viabilidad celular por el ensayo por FDA.

**Tabla 1.** Estrategias para la evaluación del efecto del NDGA ante la citotoxicidad del CDDP.

#	Tratamientos
1	Pretratamiento con <b>5, 10 y 15</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por <b>6 h</b> e <b>incubación</b> de CDDP <b>30</b> $\mu\text{M}$ durante 24 h.
2	Pretratamiento con <b>5, 10 y 15</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por <b>24 h</b> e <b>incubación</b> de CDDP <b>30</b> $\mu\text{M}$ durante 24 h.
3	Pretratamiento con <b>1, 3, 5, 10, 15 y 30</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por <b>30 min</b> y <b>coincubación</b> de CDDP <b>30</b> $\mu\text{M}$ durante 24 h.
4	Pretratamiento con <b>1, 3, 5, 10, 15 y 30</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por <b>6 h</b> y <b>coincubación</b> de CDDP <b>30</b> $\mu\text{M}$ durante 24 h.
5	Pretratamiento con <b>0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por <b>30 min</b> y <b>coincubación</b> de CDDP <b>25</b> $\mu\text{M}$ y <b>30</b> $\mu\text{M}$ durante 24 h.
6	Pretratamiento con <b>0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por <b>6 h</b> y <b>coincubación</b> de CDDP <b>25</b> $\mu\text{M}$ durante 24 h.
7	Pretratamiento con <b>0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 3, 5, 10, 15 y 30</b> $\mu\text{M}$ de NDGA por 24 h e <b>incubación</b> de CDDP <b>25</b> $\mu\text{M}$ durante 24h.

#### 6.2.7 Extracción de proteína total en células LLC-PK<sub>1</sub>

Las células tratadas se lavaron con PBS frío dos veces y se agregaron 400  $\mu\text{L}$  del amortiguador de lisis celular RIPA (Tris 50 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%, NaCl 150 mM y EDTA 2 mM) frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa: NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1X; se dejó incubar por 3 minutos. Las células se despegaron usando un gendarme después de añadir 1 ml de tripsina-EDTA al 0.25% y se colocaron en un tubo para centrifuga de 1.5 ml. Posteriormente, las muestras se dejaron a 4°C por 30 min en agitación y se centrifugaron a 15,000 x g por 10 min a 4°C para obtener el sobrenadante o fracción citosólica.

#### 6.2.8 Cuantificación de proteínas totales

Se preparó 1 ml de fracción citosólica diluida 1:100 y se preparó una curva estándar de ASB con las concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL. Se siguió la metodología descrita por Lowry *et al.*, [1951].

### 6.2.9 Western blot

Treinta  $\mu\text{g}$  de proteínas totales se mezclaron con el amortiguador de Laemmli (Tris 375 mM, SDS al 9%, glicerol al 50%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.03% a pH 6.8) 6X en una proporción 10:1 (v/v). Las muestras se desnaturalizaron en agua a 90°C por 5 minutos y fueron sometidas, al igual que 1  $\mu\text{L}$  de "Precision Plus Protein™ Dual Color Standards" (Biorad, Hercules, CA, EUA) a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 10-15%, aplicando una corriente de 50-80 volts durante 3 h.

La transferencia en cámara húmeda se realizó usando membranas de nitrocelulosa y de polivinilideno fluorado para fluorescencia (PVDF-FL de 0.45  $\mu\text{m}$  tamaño de poro, Millipore Immobilon). Las membranas se bloquearon por 1 h en TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris 19 mM, Tween al 0.1%) con leche semidescremada (Svelty) al 5%. Después, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C en agitación.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-**4-hidroxinonenal** (4-HNE), dilución 1:3,000; anti-**LC3-II**, dilución 1:1,500; anti-**p62-SQSTM1**, dilución 1:1,000 y anti- **$\alpha$ -tubulina**, dilución 1:6,000. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron de ratón, cabra y conejo, y cada uno se utilizó a una dilución 1:10,000. La detección de la fluorescencia se hizo en el fotodocumentador Licor Odyssey Sa a 700 y 800 nm. El software Image Studio Lite Ver 5.2 se utilizó para las densitometrías; la señal de la proteína de interés se normalizó con la señal de la  $\alpha$ -tubulina (control de carga).

### 6.2.10 Análisis estadístico

Los datos expresan el promedio  $\pm$  EEM (error estándar). Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANADEVA) de una vía seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para determinar si había diferencias entre las concentraciones de NDGA y CDDP en los ensayos de viabilidad para el esquema



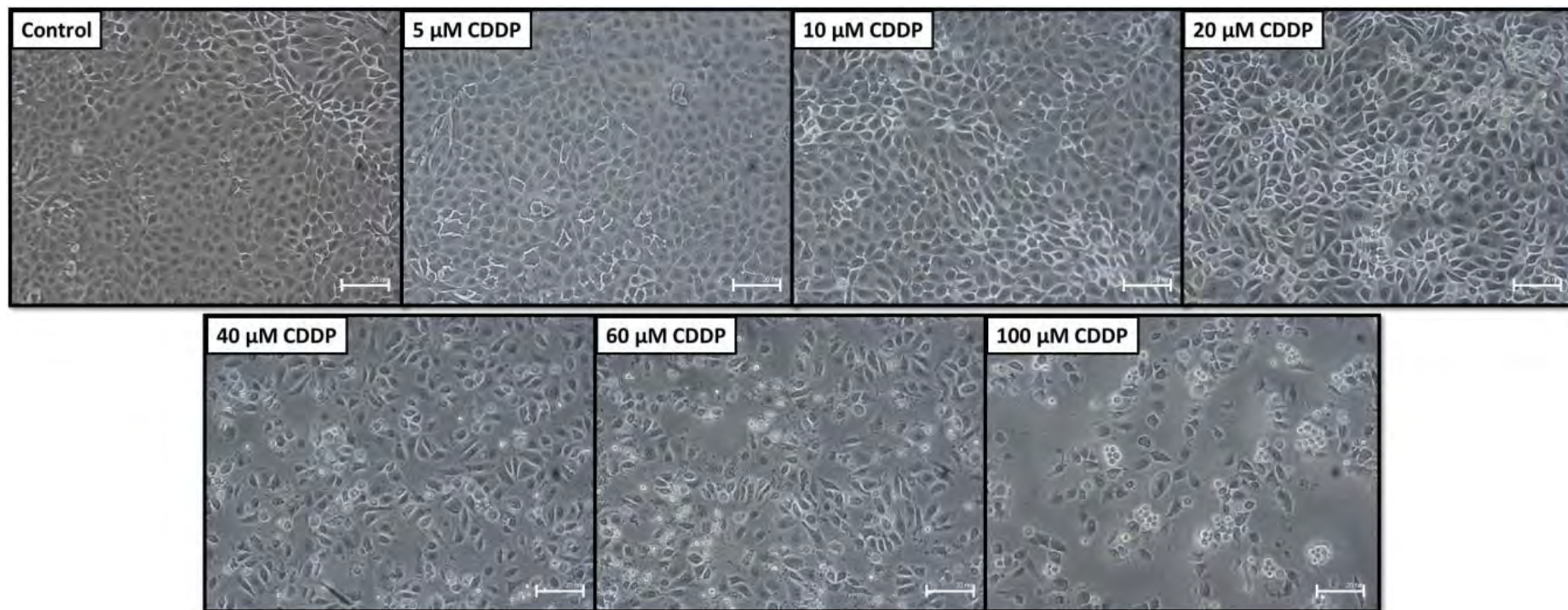
de citoprotección. Para la evaluación de la expresión de las proteínas en el flujo autofágico se realizó la prueba ANADEVa de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6 (La Joya, CA, EUA).

## 7. RESULTADOS

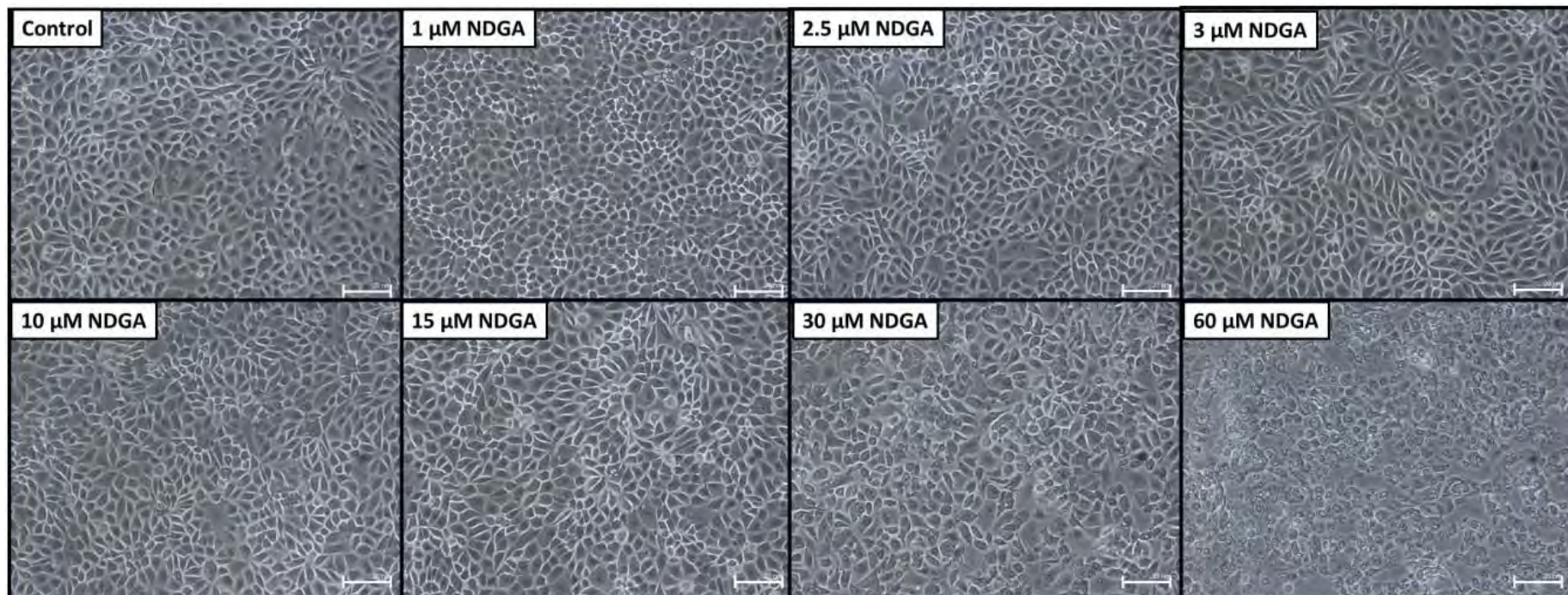
### 7.1 Determinación de la $CI_{50}$ de CDDP

La  $CI_{50}$  del CDDP fue de  $30.7 \pm 13.5 \mu\text{M}$  a una densidad celular de 75,000 cél/cm<sup>2</sup>. En la **Figura 5A** se aprecia una diferencia significativa a 20 (\* $p \leq 0.05$ ), 40, 60 y 100  $\mu\text{M}$  (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) en comparación al control (0  $\mu\text{M}$ ). Además, la viabilidad de las células LLC-PK<sub>1</sub> disminuyó en una manera dependiente de la concentración. Esto también se aprecia en la **Figura 6** en la cual la densidad celular se mantuvo a concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$  de CDDP, pero algunas células se observaron pequeñas y conforme aumentó la concentración del tóxico hubo alteración del tamaño, estructura y número de células.

**Figura 5. Efecto del CDDP (A) y del NDGA (B) sobre la viabilidad de las células LLC-PK<sub>1</sub> (determinación de la  $CI_{50}$ ).** Posterior a las 24 h de incubación con CDDP, la viabilidad de las células disminuyó de forma dosis dependiente. Con NDGA, la viabilidad no disminuyó a concentraciones  $\leq 15 \mu\text{M}$  de NDGA, pero sí a concentraciones de 30 y 60  $\mu\text{M}$  siendo ésta última significativa. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM,  $n = 4$ . La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p \leq 0.05$  vs 0  $\mu\text{M}$ .



**Figura 6. Micrografías de células LLC-PK<sub>1</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CDDP después 24 h de tratamiento. Microscopía óptica campo claro. Aumento 10X.**



**Figura 7. Micrografías de células LLC-PK<sub>1</sub> tratadas con diferentes concentraciones de NDGA después 24 h de tratamiento.** Microscopía óptica campo claro. Aumento 10X.

Por otro lado, se determinó la  $CI_{50}$  del NDGA la cual fue de  $44.48 \pm 6.85 \mu\text{M}$  a la densidad celular mencionada y hubo una disminución significativa en la viabilidad celular a  $60 \mu\text{M}$  ( $****p < 0.0001$ ) respecto al control (**Figura 5B**), esto se corroboró con la micrografía en la que a la misma concentración de NDGA se observaron alteraciones morfológicas y reducción de la densidad celular (**Figura 7**). Aunque a  $30 \mu\text{M}$  también se presentaron estos cambios en forma moderada. Es importante mencionar que se evaluó la estabilidad y pureza del NDGA (**Anexo 12.1**).

## 7.2 Esquema citoprotector del NDGA contra el efecto del CDDP

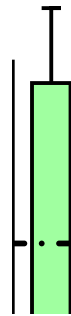
Se evaluaron diferentes condiciones para determinar el efecto citoprotector del NDGA ante el efecto del CDDP (**Tabla 1 y Anexo 12.2**); aunque únicamente se muestra la condición en que el NDGA protegió contra la citotoxicidad del antineoplásico.

La **Figura 8A** muestra que usando diferentes concentraciones menores a  $10 \mu\text{M}$  de NDGA no hubo diferencias significativas en la viabilidad celular mientras que la **Figura 8B** muestra la citotoxicidad de CDDP  $25 \mu\text{M}$  ( $****p < 0.0001$ ) que disminuyó aproximadamente un 60% la viabilidad respecto al CTRL. También entre los tratamientos con DMSO/NDGA + CDDP ( $****p < 0.0001$ ;  $**p < 0.01$  y  $*p \leq 0.05$ ), hubo diferencias significativas en comparación al CTRL con excepción de los tratamientos  $5$  y  $10 \mu\text{M}$  de NDGA + CDDP. Al comparar la viabilidad del grupo expuesto a CDDP  $25 \mu\text{M}$  con la de los grupos tratados con  $0.8$ ,  $1$ ,  $5$  y  $10 \mu\text{M}$  de NDGA se observa que ésta fue mayor (de  $28 \pm 3.3\%$ ,  $32 \pm 3.3\%$ ,  $49 \pm 23.7\%$  y  $50 \pm 24.6\%$ , respectivamente) alcanzando diferencias significativas ( $\#p < 0.05$  vs CDDP  $25 \mu\text{M}$ ) por lo que se puede atribuir al pretratamiento con NDGA un efecto citoprotector.

De acuerdo a estos resultados, el esquema o modelo de citoprotección consistió en el pretratamiento con NDGA  $0.8 \mu\text{M}$  por  $6$  h y la coincubación con CDDP  $25 \mu\text{M}$  por  $24$  h. Por lo tanto, los grupos experimentales para los análisis subsecuentes fueron los siguientes:

- 1) CTRL (vehículos);
- 2) CDDP 25  $\mu$ M (pretratamiento con vehículo (DMSO) por 6 h y CDDP por 24h);
- 3) NDGA + CDDP (pretratamiento con NDGA 0.8  $\mu$ M por 6 h y con CDDP 25  $\mu$ M por 24 h);
- 4) NDGA 0.8  $\mu$ M (durante 6 h y vehículo (NaCl) por 24 h).

Se utilizó la concentración de NDGA 0.8  $\mu$ M debido a que altas concentraciones de este compuesto se han relacionado con daño hepático y renal en humanos como lo son el daño hepático fulminante y el carcinoma renal [Smith *et al.*, 1994; Sheihk *et al.*, 1997; Stickel *et al.*, 2000].

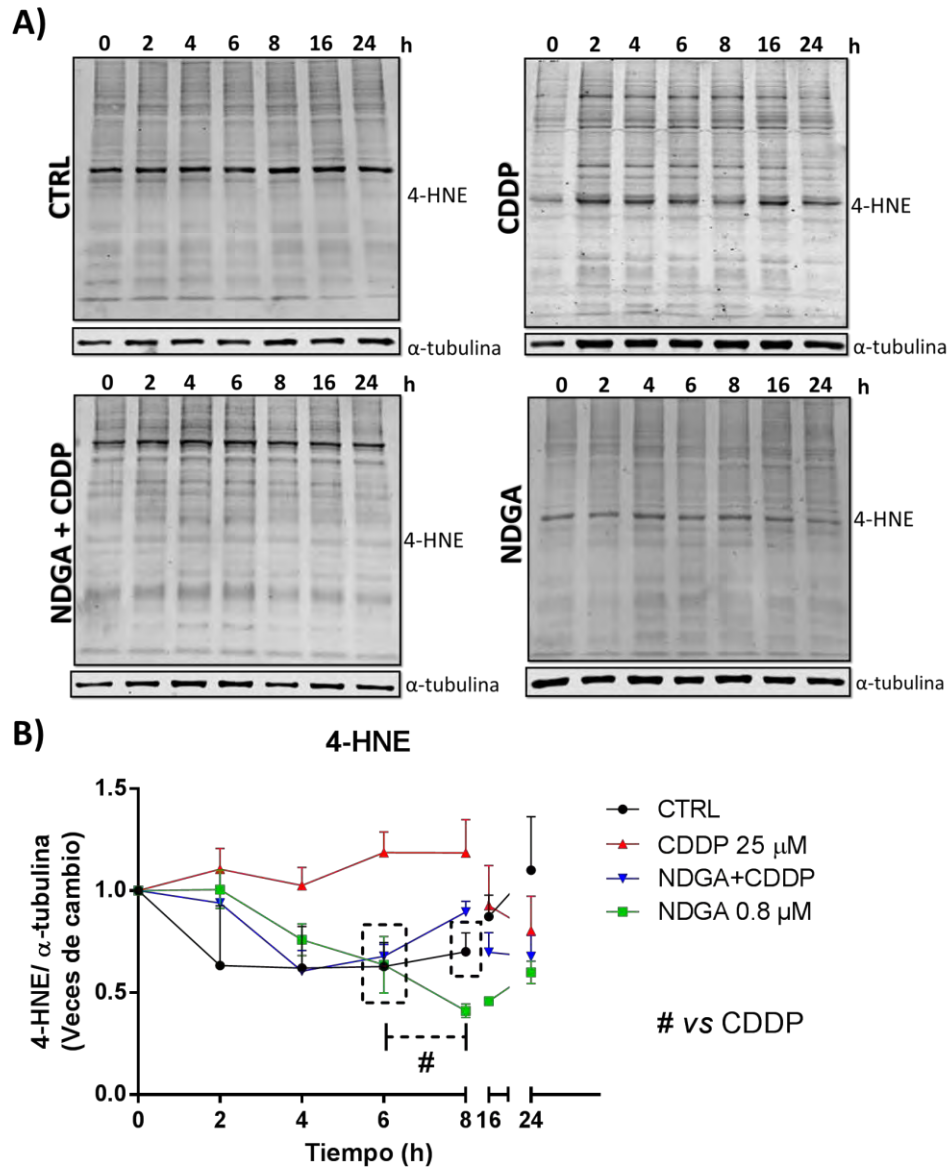


**Figura 8. El pretratamiento con NDGA citoprotege frente a CDDP. (A)** Las células fueron pretratadas por 6 h con DMSO (vehículo del NDGA) y con  $\leq 1$ , 5 y 10  $\mu\text{M}$  de NDGA, posteriormente se coincubó con NaCl (vehículo del CDDP) por 24 h; la viabilidad celular no disminuyó. **(B)** El tratamiento fue el mismo que en A, pero se coincubó con CDDP 25  $\mu\text{M}$  en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y 0.1-1  $\mu\text{M}$  de NDGA+CDDP respecto al CTRL. Sin embargo, el pretratamiento con NDGA (0.8 - 10  $\mu\text{M}$ ) durante 6 h disminuyó la citotoxicidad causada por la exposición a CDDP por 24 h recuperando la viabilidad celular por arriba del 50% de forma significativa. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM,  $n= 3-7$  por concentración. La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett.

### 7.3 Evaluación de la lipoperoxidación por la inmunodetección de 4-HNE.

Como se ha mencionado, el CDDP genera estrés oxidante el cual se puede ver reflejado en un daño celular como la lipoperoxidación. La lipoperoxidación comprende diferentes productos como es el 4-HNE. El 4-HNE es producto de la lipoperoxidación del ácido linoleico, el ácido araquidónico (membranas celulares), y la cardiolipina (membrana interna mitocondrial) [Zhong y Yin, 2015]. Este lípido electrofílico modula procesos de señalización a través de la formación de aductos covalentes con grupos funcionales nucleofílicos en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana. Los aductos de 4-HNE en proteínas es lo que se observó en la **Figura 9A**. En la **Figura 9B** se observa que el CDDP causó un aumento de  $1.18 \pm 0.1$  veces los niveles de 4-HNE a partir de las 6 h en comparación a los grupos CTRL, NDGA y NDGA+CDDP ( $0.62 \pm 0.11$  veces,  $0.63 \pm 0.13$  veces y  $0.67 \pm 0.05$  veces, respectivamente) lo cual fue significativo ( $*p \leq 0.05$ ). También el CDDP aumentó  $1.18 \pm 0.16$  veces a las 8 h respecto al CTRL ( $0.7 \pm 0.09$  veces) lo cual fue significativo ( $*p \leq 0.05$ ). A las 16 y 24 h ya no se observaron diferencias entre los grupos, lo que indica que el daño oxidante causado por el CDDP ocurre en los tiempos iniciales pero disminuye a tiempos posteriores de este modelo.





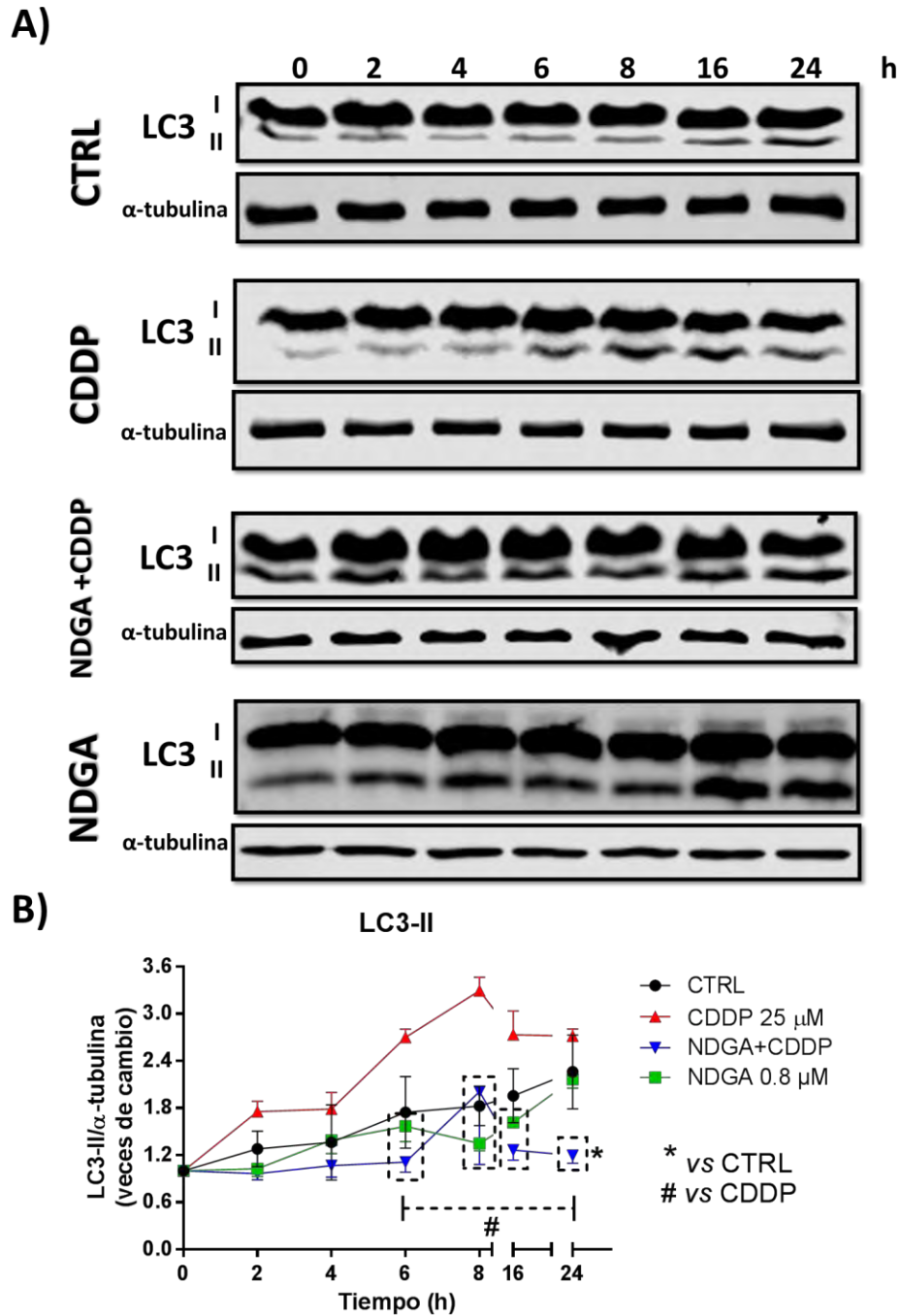
**Figura 9. El pretratamiento con NDGA disminuye la lipoperoxidación (4-HNE) inducida por CDDP a partir de las 6 h. (A)** Western blots representativos del daño oxidante a lípidos (4-HNE) a diferentes tiempos en cada grupo experimental. **(B)** Análisis densitométrico (veces de cambio) de los blots obtenidos. Los datos expresan promedio  $\pm$  EEM;  $n=3$  por tiempo. ANADEVIA de dos vías *post hoc* Tukey. #indica diferencia significativa respecto a CDDP ( $p<0.5$ ).

#### 7.4 Evaluación del flujo autofágico.

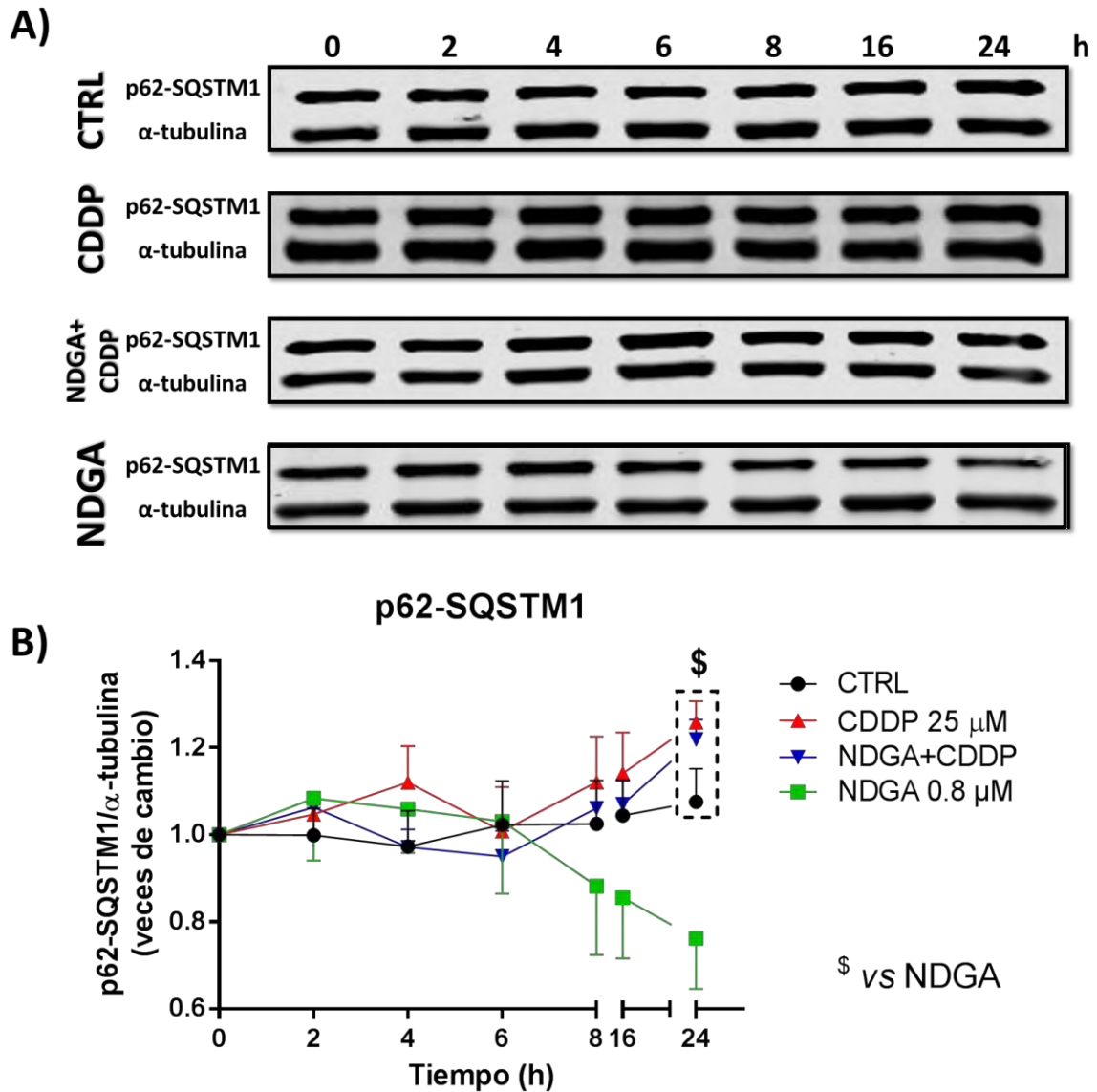
La proteína LC3-II es una proteína esencial en las membranas autofágicas para la elongación y cierre del fagóforo y se localiza en la membrana de dicha estructura [Kaushal y Shah, 2015; Dikic y Elazar, 2018]. En la **Figura 10B**, el CDDP indujo un incremento significativo de la expresión de LC3-II (forma conjugada de LC3-I) a las 6 h y 8 h ( $2.7 \pm 0.10$  y  $3.3 \pm 0.18$  veces, respectivamente) en comparación a los demás grupos ( $*p \leq 0.05$ ). Sin embargo, a las 16 y 24 h en el grupo NDGA+CDDP se observa una disminución significativa con respecto al grupo CDDP ( $*p \leq 0.05$ ). Los datos sugieren que la autofagia inducida por CDDP a tiempos tempranos como largos disminuye con el pretratamiento de NDGA (**Figura 10A y B**).

Por otro lado, p62-SQSTM1 es un receptor o proteína adaptadora de la carga (macromolécula dañada) dirigida al autofagosoma en donde es degradado al fusionarse con el lisosoma (autofagolisosoma) [Kaushal y Shah, 2015; Dikic y Elazar, 2018], por lo que es un marcador de la última etapa (degradación) del flujo autofágico. En la **figura 11B**, la expresión de p62-SQSTM1 disminuyó  $0.76 \pm 0.12$  veces de forma significativa a las 24 h en el grupo NDGA en comparación de los 3 grupos restantes ( $*p \leq 0.05$ ). Mientras tanto, en el resto de los grupos la expresión de esta proteína aumentó (CTRL:  $1.07 \pm 0.07$  veces; CDDP:  $1.25 \pm 0.04$  veces y NDGA+CDDP:  $1.21 \pm 0.04$  veces).

Hasta este punto del análisis, los marcadores autofágicos sugieren que posiblemente la autofagia se encuentre activa por el aumento de LC3-II entre las 6 y 8 h por CDDP, pero a las 16 y 24 h comienza a decaer. La estrategia experimental para confirmar la activación y/o alteración del flujo autofágico tanto a las 6 h como 24 h es ocupar un inhibidor de la degradación lisosomal como es la cloroquina.



**Figura 10.** El pretratamiento con NDGA disminuye la autofagia inducida por CDDP a partir de las 6 h. **(A)** Western blots representativos de las proteínas LC3-I (18 kDa) y LC3-II (16 kDa) a diferentes tiempos en cada grupo experimental. **(B)** Análisis densitométrico (veces de cambio) de los blots obtenidos; únicamente se normalizó entre LC3-II y  $\alpha$ -tubulina. Los datos expresan promedio  $\pm$  EEM;  $n=3$  por tiempo. ANADEVIA de dos vías *post hoc* Tukey. \*  $p \leq 0.05$  vs CTRL. #  $p \leq 0.05$  vs CDDP..



**Figura 11. El tratamiento con NDGA disminuye los niveles de p62-SQSTM1 indicando degradación autofágica a las 24 h. (A)** Western blots representativos de la proteína adaptadora de la carga p62-SQSTM1 (62 kDa) a diferentes tiempos en cada grupo experimental. **(B)** Análisis densitométrico (veces de cambio) de los blots obtenidos; se normalizó entre p62-SQSTM1 y  $\alpha$ -tubulina. ANADEVIA de dos vías *post hoc* Tukey. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM;  $n = 3-5$  por tiempo. \$  $p \leq 0.05$  vs NDGA.

## 8. DISCUSIÓN

El CDDP induce daño renal por los diferentes mecanismos mencionados en la introducción, sin embargo, usando antioxidantes como la vitamina C contra este antineoplásico se ha visto un efecto nefroprotector [Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del NDGA sobre la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en una línea celular de túbulo proximal de cerdo (LLC-PK<sub>1</sub>), el principal tipo celular del riñón que más daño presenta ante el tóxico [Pabla y Dong, 2008].

La viabilidad de las células tratadas con CDDP 25  $\mu$ M fue de  $30 \pm 13.5$  % a las 24 h de tratamiento. En el grupo tratado con CDDP, el 4-HNE y la proteína LC3-II presentaron un aumento significativo a las 6 h, esto indicó que en este tiempo hubo un aumento del daño oxidante conduciendo a la activación del flujo autofágico para remover aquellas biomoléculas dañadas. Hay antecedentes que indican que con CDDP 50  $\mu$ M la autofagia se activa a las 4 h debido al aumento en la expresión de beclina-1 y a las 8 h ocurre apoptosis indicado por el incremento en la expresión de la caspasa 3 activa [Yang *et al.*, 2008]. En nuestro modelo no se evaluaron beclina-1 ni caspasa 3 pero sí observamos el aumento de la proteína LC3-II a tiempos tempranos y la caída a tiempos largos (16 y 24 h, **Figura 10A**) lo que sugiere la activación de la autofagia. Esto puede también confirmarse mediante la detección de los autofagosomas por microscopía de fluorescencia [Mizushima *et al.*, 2010]. Por otro lado, al evaluar p62-SQSTM1, un marcador de la etapa de degradación del flujo autofágico, el grupo CDDP no mostró cambios significativos a través del tiempo. Aunque la expresión de p62-SQSTM1 disminuyó a las 6 h, en los demás tiempos fue aumentando donde solo fue significativo a las 24 h respecto al grupo NDGA. Medir otra proteína adaptadora de la carga sería otra alternativa para determinar si el flujo está activo. Hasta este punto, ambos marcadores sugieren que a tiempos tempranos el flujo autofágico está funcionando correctamente pero a tiempos largos la autofagia está alterada con el tratamiento de CDDP en el túbulo proximal.

El NDGA es un metabolito secundario del tipo lignano que compone entre el 10-15% del peso seco de las hojas de *Larrea tridentata* [Tyler, 1994]. Este compuesto se caracteriza por sus diversos efectos como antineoplásico, antioxidante y antiinflamatorio [Hernández-Damián *et al.* 2014]. En el estudio *in vitro* de Rojo *et al.*, (2012) se observó que a partir de concentraciones  $<20 \mu\text{M}$  de NDGA, no se afectó la viabilidad de las células LLC-PK<sub>1</sub>, lo cual concuerda con la gráfica de la curva de concentración de NDGA, pues a la concentración de  $30 \mu\text{M}$  disminuyó la viabilidad pero a  $60 \mu\text{M}$  fue significativo y la  $\text{CI}_{50}$  fue de  $44.48 \pm 6.85 \mu\text{M}$  (**Figura 5B**) lo que indica toxicidad. Las micrografías de células tratadas con NDGA  $30 \mu\text{M}$ , muestran alteración estructural y disminución de la densidad celular y con NDGA  $60 \mu\text{M}$  estos cambios fueron más evidentes (**Figura 7**). Por otra parte, el NDGA induce hepatotoxicidad y nefrotoxicidad [Smith *et al.*, 1994; Sheihk *et al.*, 1997; Stickel *et al.*, 2000], por lo que es relevante buscar aquellas concentraciones menores donde exista un efecto citoprotector. Tal resultado se obtuvo en este trabajo en un modelo *in vitro* de daño al nivel de túbulo proximal. El pretratamiento con NDGA  $0.8 \mu\text{M}$  evitó la disminución en la viabilidad ante el CDDP pues el metabolito causó una recuperación de alrededor del  $28 \pm 3.3\%$  en la viabilidad después de 24 h de tratamiento. Por otro lado, el pretratamiento de NDGA  $0.8 \mu\text{M}$  durante 6 h redujo los niveles de 4-HNE (**Figura 9A**) y el aumento de LC3-II (**Figura 10A**) a las 6 h posteriores al tóxico. No se puede afirmar cuál mecanismo esté involucrado en la citoprotección; sin embargo, la literatura señala que el NDGA es un excelente atrapador de varios radicales libres tales como  $\text{HO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [Floriano-Sánchez *et al.*, 2006]. También, se conoce que el NDGA estabiliza al factor Nrf2 lo que genera un cambio conformacional del co-represor Keap1 permitiendo que Nrf2 sea liberado y se transloque al núcleo uniéndose a la secuencia ARE en los genes que expresan a las enzimas antioxidantes. Respecto a esto, en un modelo *in vitro* de fibroblastos (MEFs) tratados con NDGA  $15 \mu\text{M}$ , se observó que el factor transcripcional Nrf2 se acumuló en el núcleo [Rojo *et al.*, 2012]. Estas dos propiedades podrían explicar el efecto citoprotector del NDGA contra el CDDP. Como comentario, sería importante evaluar la expresión de Nrf2

en la fracción nuclear para conocer si el NDGA 0.8  $\mu$ M induce el mismo mecanismo durante el pretratamiento de 6 h.

Por otro lado, uno de los mecanismos por cuales el NDGA protege a las células renales es induciendo la autofagia. Se ha demostrado que el NDGA es capaz de inducir autofagia en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y esto inhibe el crecimiento bacteriano [Guzman-Beltrán *et al.*, 2016]. De igual manera se ha demostrado la capacidad del NDGA para inhibir la proliferación de células de cáncer de mama mediante la inhibición directa del mTORC1 [Zhang *et al.*, 2012]. La relevancia de esto radica en que se ha descrito que la inhibición de mTORC1 conduce a la activación de la autofagia. En nuestro caso, únicamente se observó que p62-SQSTM1 disminuyó significativamente a las 24 h respecto a los demás grupos, esto indicaría que el flujo autofágico esté activo.

## **9. CONCLUSIONES**

La protección del NDGA está asociada a la prevención del aumento en la lipoperoxidación y la autofagia inducidas por cisplatino.

## **10. PERSPECTIVAS**

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el pretratamiento con NDGA es una forma de evitar la nefrotoxicidad inducida por cisplatino por lo que sería importante evaluar en un modelo animal el efecto citoprotector del NDGA contra el daño renal inducido por cisplatino y describir los mecanismos celulares participantes.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Anjaneyulu M. y Chopra K. 2004 Nordihydroguaiaretic Acid, a lignin, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology*. 72:42–50.
- Ansar S., *et al.* 1999 Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferricnitrilotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis*. 20: 599–606
- Aoki, H., *et al.* 2007 Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal regulated kinase signaling pathways. *Molecular Pharmacology*. 72: 29-39.
- Cárdenas-Rodríguez N y Pedraza-Chaverri J. 2006 Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 7:161-173.
- Chirino Y. I., Pedraza-Chaverri, J. 2009 Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 61: 223-242. Review
- Dasari S., Bernard P. 2014 Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 740:364-378.
- Deans AJ, West SC. 2011 DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 11:467-80. Review.
- Dikic I, Elazar Z. 2018 Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19:349-364. Review.
- Egea J, *et al.* 2017 European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology*. 13: 94-162 Review.

- Figueira, T. R., *et al.* 2013 Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & Redox Signaling*. 18: 2029-2074. Review.
- Floriano-Sánchez E, *et al.* 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 Radical Research*. 40:523-533.
- Ghosh, HS, *et al.* 2010 SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One*. 5: e9199.
- Green, DR. y Levine, B. 2014 To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*. 157:65-75. Review.
- Guzmán-Beltrán S, *et al.* 2016 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and  $\alpha$ -mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *International Immunopharmacology*. 31:149-157.
- Halliwell, B., Gutteridge, M., Free Radicals in Biology and Medical Consequences. CRC Press, Nueva York, USA, 3<sup>rd</sup> Ed., 1999
- Hamanaka, R. y Chandel, N. 2010 Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends of Biochemical Science*. 35:505-513. Review.
- Han, J., *et al.* 2012 Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage. *Autophagy*. 8: 812-825.
- Hernández- Tresguerres, J. A. Fisiología humana 4ta ed. China: McGraw Hill. 2010 ISBN: 978-607-25-0349-7
- Hernández-Damián J, *et al.* 2014 Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid. *Archiv de Pharmazie Chemistry in Life Science (Weinheim)*. 347:685-697. Review.

- Jia, Y. *et al.* 2009 Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells, *Journal of Asian Natural Products Research*. 11: 918-928.
- Kaushal GP, *et al.* 2001 Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney International*. 60:1726–1736.
- Kaushal, GP. y Shah, SV. 2015 Autophagy in acute kidney injury. *Kidney International*. 89:779-791. Review.
- Lowry, O.H., *et al.* 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Lü JM, *et al.* 2010 Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update. *Medical Science Monitor*. 16:RA93-RA100.
- Mizushima N, *et al.* 2010 Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140:313-326.
- Mosieniak, G., *et al.* 2012 Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. *Mechanisms of Ageing Development*. 133: 444-455.
- Mundhe NA, *et al.* 2015 Nordihydroguaiaretic acid ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity and potentiates its anti-tumor activity in DMBA induced breast cancer in female Sprague-Dawley rats. *International Immunopharmacology*. 28:634-642.
- Pabla N, Dong Z. 2008 Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International*. 73:994-1007. Review.
- Ramón A., *et al.* 2012 Farmacocinética poblacional de cisplatino aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Revista Elsevier Farmacia Hospitalaria*. 5:392-402.

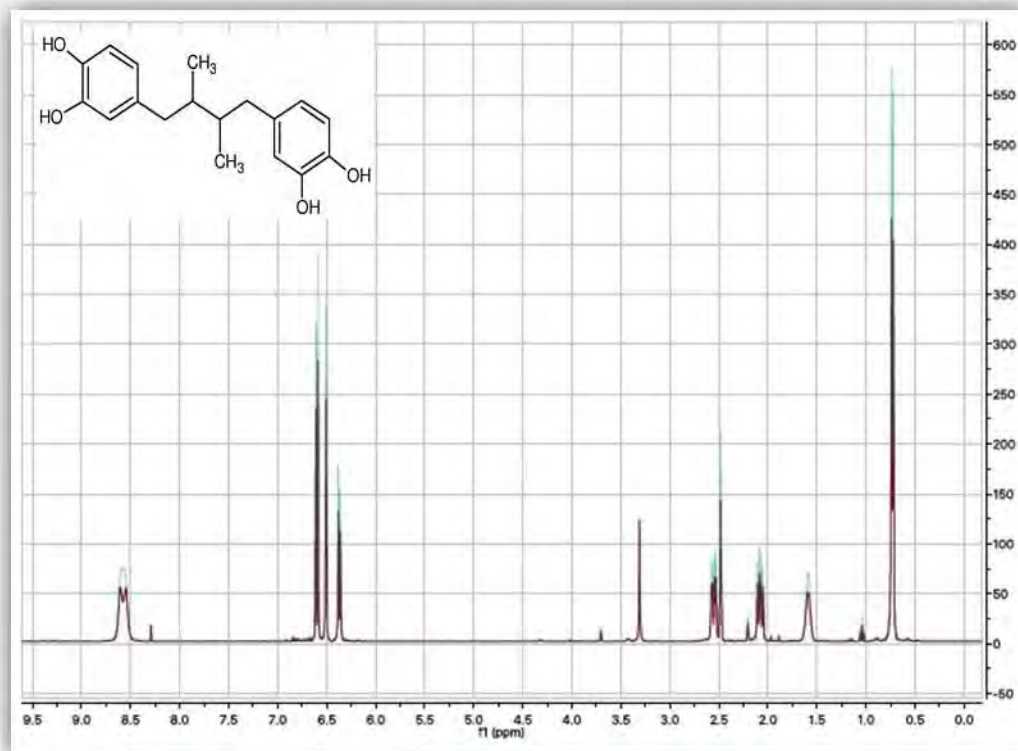
- Rojo AI, *et al.* 2012 Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3. *Free Radical Biology and Medicine*. 52:473-487.
- Scarlatti, F., *et al.* 2008 Role of non-canonical beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death & Differentiation*. 15: 1318- 1329.
- Sheikh, N M, *et al.* 1997. Chaparral-associated hepatotoxicity. *Archives of Internal Medicine*. 157: 913–919.
- Smith, A.Y, *et al.* 1994. Cystic renal cell carcinoma and acquired renal cystic disease associated with consumption of chaparral tea: a case report. *Journal of Urology*. 152: 2089–2091.
- Stickel, F *et al.* 2000. Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health and Nutrition*. 3: 113–124.
- Trachtman H., *et al.* 1993. Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. *Biochemical Biophysics Research Communications*. 199:759-765
- Tyler, V.E., 1994. The Honest Herbal, a Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies, *Pharmaceutical Products Press*. 375 pp.
- Umemura *et al.* 1990 Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate. *Carcinogenesis*. 11:345-347.
- Xiao, K., *et al.* 2013 Curcumin induces autophagy via activating the AMPK signaling pathway in lung adenocarcinoma cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. 123: 102-109.

- Yang C, *et al.* 2008 Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *American Journal Physiology- Renal Physiology*. 294:F777-F787.
- Zenkov NK, *et al.* 2016 Plant Phenols and Autophagy. *Biochemistry (Mosc)*. 81:297-314. Review
- Zhang Y, *et al.* 2012 mTORC1 is a target of nordihydroguaiaretic acid to prevent breast tumor growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*. 136:379-388.
- Zhang, J., *et al.* 2013 Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca<sup>2+</sup>/AMPK/mTOR pathway in A549 cells. *Biochemical Pharmacology*. 86: 317-328.
- Zhang, Y., *et al.* 2015 Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*. 59:1443-1457.
- Zhong H, y Yin H. 2014 Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biology*. 4:193-199. Review.
- Zhuang, W., *et al.* 2012 Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. *Cancer Science*. 103: 684-690.
- Zúñiga-Toalá A, *et al.* 2013 Nordihydroguaiaretic acid induces Nrf2 nuclear translocation in vivo and attenuates renal damage and apoptosis in the ischemia and reperfusion model. *Phytomedicine*. 20:775-779.

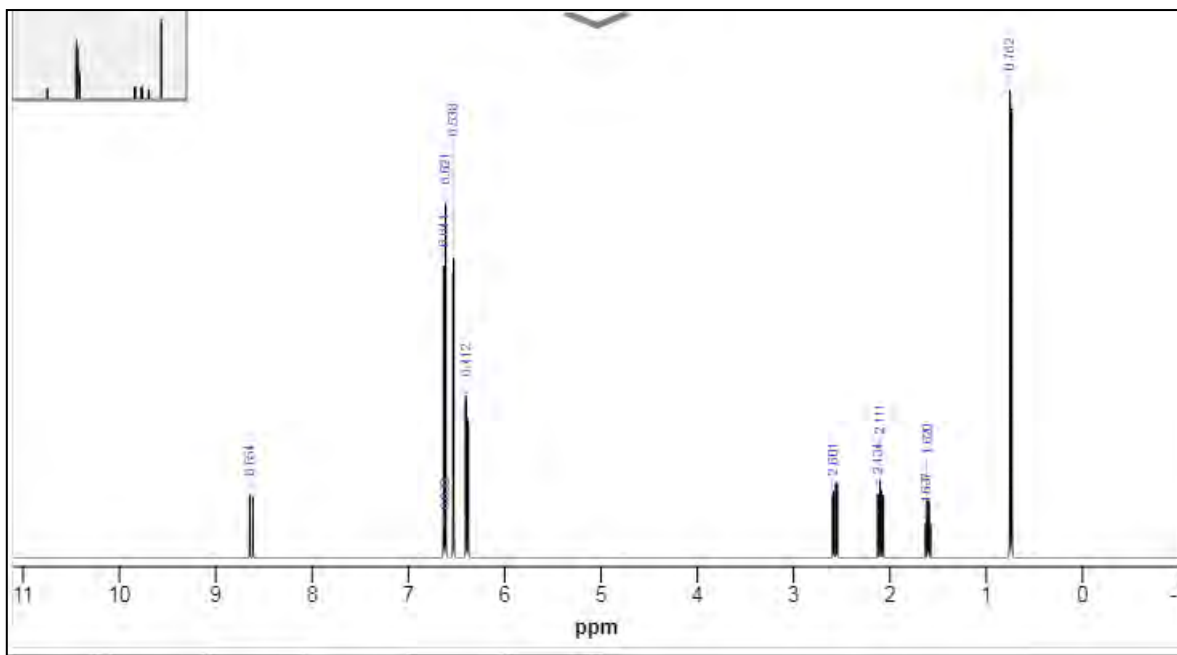
## 12. ANEXOS

### 12.1 Evaluación de la estabilidad y pureza del NDGA

Se evaluó la estabilidad y pureza del NDGA por “resonancia magnética nuclear de protón” ( $^1\text{H}$  NMR). En la **Figura 1** se muestra el espectro resultante de dos lotes diferentes del antioxidante (espectro en azul y el otro en rojo), donde los picos coinciden con el espectro reportado en Human Metabolome Database (HMDB; [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)) con el ID: HMDB0014325 (**Figura 1.1A**). Esto indica que el reactivo es estable. El pico alrededor de 3.4 ppm corresponde al disolvente DMSO.



**Figura 1A.** Espectro del NDGA (lote 017K7020) disuelto en DMSO.  $^1\text{H}$  NMR. Frecuencia 400 MHz



**Figura 1.1A** Espectro del Masoprocol en DMSO (obtenido de HMDB; ID: HMDB0012325). 1H NMR. Frecuencia 400 MHz.

## **12.2 Condiciones evaluadas para determinar el efecto citoprotector del NDGA ante el CDDP**

En el trabajo de Rojo *et al.*, (2012) se observó que a partir de concentraciones  $<15 \mu\text{M}$  de NDGA hubo afectaciones en la viabilidad de las células LLC-PK<sub>1</sub> y que hubo un aumento de la expresión de la enzima hemo oxigenasa-1, blanco del factor de transcripción Nrf2) después de 6 h de tratamiento con  $15 \mu\text{M}$  de NDGA. Bajo esta perspectiva se definieron las condiciones de trabajo que fueron: un pretratamiento de 6 h con 5, 10 y  $15 \mu\text{M}$  de NDGA seguido del tratamiento de CDDP  $30 \mu\text{M}$  por 24 h. La concentración de CDDP se determinó calculando la  $\text{CI}_{50}$ .

**B)**

**Figura 2A. El pretratamiento con NDGA por 6 h no protegió contra el CDDP en incubación por 24 h. (A)** Las células fueron pretratadas por 6 h con DMSO (vehículo del NDGA) y con 5, 10 y  $15 \mu\text{M}$  de NDGA, posteriormente se coincubó con NaCl (vehículo del CDDP) por 24 h; la viabilidad celular no disminuyó. **(B)** El tratamiento fue el mismo que en A, pero se coincubó con CDDP  $30 \mu\text{M}$  en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y 5-15  $\mu\text{M}$  de NDGA+CDDP respecto al CTRL. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM,  $n= 3$  por concentración. La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett. \*\*\*\* $p<0.0001$  vs CTRL.



En la **Figura 2A-(A)**, se observó que la viabilidad no fue afectada por las diferentes concentraciones de DMSO y NDGA mientras que en la **Figura 2A-(B)**, los pretratamientos con NDGA no evitaron la toxicidad inducida por CDDP 30  $\mu\text{M}$  posterior a su incubación por 24 h, aunque sí hubo diferencia entre estos grupos y el grupo control (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Se realizaron evaluaciones adicionales de la viabilidad celular usando las mismas concentraciones de NDGA pero el pretratamiento en esta ocasión fue de 24 h y luego se añadió el CDDP 30  $\mu\text{M}$ . Las diferencias obtenidas (**Figuras 3A-(A) y 3A-(B)**) fueron similares a las condiciones de trabajo anteriores (**Figura 2A**). Sin embargo, en este esquema el CDDP disminuyó la viabilidad un 50% pero no hubo recuperación en la viabilidad celular con el pretratamiento con NDGA; por lo tanto, es este esquema el antioxidante no protegió de la toxicidad del CDDP.

R \

**Figura 3A. El pretratamiento con NDGA por 24 h no protegió contra el CDDP en incubación por 24 h. (A)** Las células fueron pretratadas por 24 h con DMSO (vehículo del NDGA) y con 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  de NDGA, posteriormente se coincubó con NaCl (vehículo del CDDP) por 24 h; la viabilidad celular no disminuyó. **(B)** El tratamiento fue el mismo que en A, pero se coincubó con CDDP 30  $\mu\text{M}$  en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y 5-15  $\mu\text{M}$  de NDGA+CDDP respecto al CTRL. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM,  $n = 3$  por concentración. La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett. \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs CTRL.

Hasta este punto, los diferentes tiempos de pretratamientos con las concentraciones 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  de NDGA no protegieron contra CDDP. Sin embargo, se observó que las células pretratadas con 5  $\mu\text{M}$  de NDGA, la viabilidad fue más alta respecto a las concentraciones restantes, por lo que se decidió ocupar las siguientes concentraciones de NDGA: 0, 1, 3, 5, 10, 15 y 30  $\mu\text{M}$  vs CDDP 30  $\mu\text{M}$ .

El pretratamiento fue de 30 minutos con las concentraciones de NDGA arriba mencionadas, seguido del estímulo con CDDP por 24 h. En la **Figura 4A-(A)** se observó, nuevamente, que a 30  $\mu\text{M}$  de NDGA disminuyó la viabilidad, además de mostrar diferencias significativas respecto al control (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Por otro lado, en la **Figura 4A-(B)** se observó que los grupos pretratados con NDGA no hubo diferencia respecto al grupo tratado con CDDP aunque sí contra el control (\*\*\*\* $p < 0.001$ ).

21

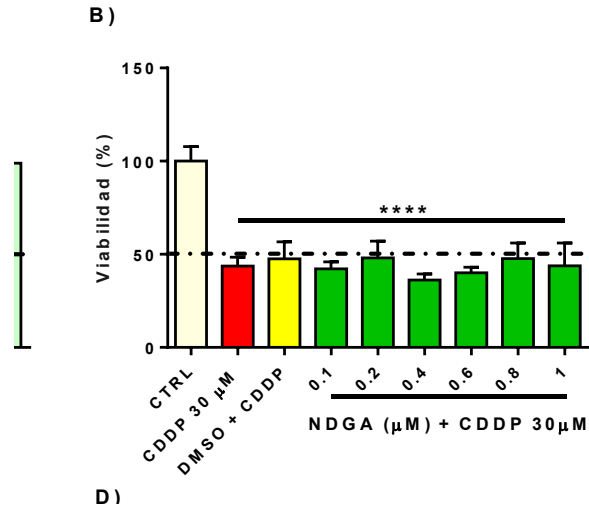
**Figura 4A. El pretratamiento con NDGA por 30 min no protegió contra el CDDP en coincubación por 24 h. (A)** Las células fueron pretratadas por 30 min con DMSO y con 1, 3, 5, 10, 15 y 30  $\mu\text{M}$  de NDGA, posteriormente se coincubó con NaCl por 24 h; la viabilidad celular disminuyó significativamente con 30  $\mu\text{M}$  de NDGA. **(B)** El tratamiento fue el mismo que en A, pero se coincubó con CDDP 30  $\mu\text{M}$  en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y NDGA+CDDP respecto al CTRL. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM,  $n = 4$  por concentración. La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett. \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs CTRL.

Cuando el pretratamiento con NDGA fue de 6 h, se observó la misma respuesta (**Figura 5A-(B)**) que en el pretratamiento de 30 minutos, esto es, no hubo diferencia significativa entre los grupos tratados NDGA+CDDP vs CDDP. Fue notorio que en los grupos NDGA+CDDP al aumentar la concentración a partir de 1  $\mu\text{M}$  de NDGA la viabilidad disminuyó, al parecer la combinación de estas concentraciones y CDDP fueron más tóxicas, mientras que el grupo pretratado con 1  $\mu\text{M}$  NDGA, a ambos tiempos, se mantuvo cerca del 50% de viabilidad (**Figuras 4A-(B) y 5A-(B)**).

**Figura 5A. El pretratamiento con NDGA por 6 h no protegió contra el CDDP en coincubación por 24 h.** (A) Las células fueron pretratadas por 6 h con DMSO y con 1, 3, 5, 10, 15 y 30  $\mu\text{M}$  de NDGA, posteriormente se coincubó con NaCl por 24 h; la viabilidad celular disminuyó significativamente con 30  $\mu\text{M}$  de NDGA. (B) El tratamiento fue el mismo que en A, pero se coincubó con CDDP 30  $\mu\text{M}$  en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y NDGA+CDDP respecto al CTRL. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM,  $n= 3$  por concentración. La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett. \*\*\*\* $p<0.0001$  vs CTRL.

Por lo anterior, se decidió trabajar con concentraciones de NDGA menores a 1  $\mu\text{M}$  y evaluar con 25 y 30  $\mu\text{M}$  de CDDP con pretratamiento de 30 min y 6 h. En las **Figuras 6A-(A) y 6A-(C)** se observó que las concentraciones 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1  $\mu\text{M}$  de NDGA no afectaron la viabilidad de las células LLC-PK<sub>1</sub>, solamente el grupo tratado con 25 y 30  $\mu\text{M}$  CDDP disminuyó el 54.10%  $\pm$  6.0 y 43.72%  $\pm$  2.7 de viabilidad, respectivamente. Mientras que en los grupos pretratados con NDGA

por 30 min no hubo diferencia +CDDP (**Figuras 6A-(B) y 6A-(D)**) respecto al grupo tratado solamente con CDDP pero sí respecto al control ( $***p<0.001$  y  $****p<0.0001$ ).



**Figura 6A. El pretratamiento con NDGA por 30 min no protegió contra el CDDP en coincubación por 24 h. (A y C)** Las células fueron pretratadas por 30 min con DMSO y con 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1  $\mu$ M de NDGA, posteriormente se coincubó con NaCl por 24 h; la viabilidad celular no disminuyó. **(B)** El tratamiento fue el mismo que en A, pero se coincubó con CDDP 30  $\mu$ M en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y NDGA+CDDP respecto al CTRL. Mientras en **(D)** el tratamiento fue el mismo que en C, pero se coincubó con CDDP 25  $\mu$ M en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y NDGA+CDDP respecto al CTRL. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM,  $n=4$  por concentración. La prueba estadística utilizada fue ANADEVa de una vía con post hoc Dunnett.  $****p<0.0001$ ,  $***p<0.001$  vs CTRL.

Se evaluó otra condición donde a las células LLC-PK<sub>1</sub> fueron pretratadas con diferentes concentraciones de NDGA por 24 h y se incubaron con CDDP 25  $\mu$ M, Después de 24 h se midió la viabilidad. En la **Figura 7A-(B)**, se observa que el pretratamiento con NDGA de 24 h no protegió contra CDDP 25  $\mu$ M.

B)  
150  $\mu$

**Figura 7A. El pretratamiento con NDGA por 24 h no protegió contra el CDDP en incubación por 24 h. (A)** Las células fueron pretratadas por 24 h con DMSO y con 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 5, 10, 15 y 30  $\mu$ M de NDGA, posteriormente se incubó con NaCl por 24 h; la viabilidad celular no disminuyó. **(B)** El tratamiento fue el mismo que en A, pero se incubó con CDDP 25  $\mu$ M en vez del vehículo. La viabilidad celular disminuyó significativamente con CDDP, DMSO+CDDP y 0.1, 1 a 30  $\mu$ M de NDGA+CDDP respecto al CTRL. La prueba estadística utilizada fue ANADEVIA de una vía con post hoc Dunnett. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p \leq 0.05$  vs CTRL.