



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEL ÁCIDO  
NORDIHDROGUAYARÉTICO Y DE LA S-ALILCISTEÍNA  
PARA ATRAPAR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

DIANA IVONNE ROCHA MENDOZA



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

2005

m. 345594



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.

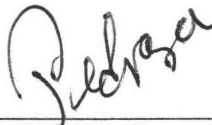
autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Diana Ivonne Rocha  
MENDOZA  
FECHA: 20-JUNIO-2005  
FIRMA: D Rocha

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Gloria Gutiérrez Venegas.
Vocal	Prof. José Pedraza Chaverri.
Secretario	Prof. Alberto Gómez Gutiérrez.
1er. Suplente	Prof. Tzvetanka Dimitrova Dinkova.
2do. Suplente	Prof. Iliana Elvira González Hernández

El desarrollo de este trabajo tuvo lugar en el laboratorio 209 de Bioquímica Clínica del Departamento de Biología. Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM, México D.F.

Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 40009-M).



Dr. José Pedraza Chaverri  
Asesor de tema



M. en C. Omar Noel Medina Campos  
Supervisor técnico



Diana Ivonne Rocha Mendoza  
Sustentante

## DEDICATORIAS

*A ti Mami*

*Por tu infinito amor, tus desvelos dedicados a mí, por tu perseverancia, tus inagotables deseos de superación y por ser mi principal ejemplo a seguir.*

*A ti papi*

*Por haberme dado la vida, por haberme amado tanto, porque sigues conmigo y te encuentro en mis sueños.*

*A mis hermanitos*

*David y Diego, por su inmenso cariño, por todo su apoyo, por todo lo que he aprendido de ustedes, por todo el tiempo que me han dedicado y sobre todo por haberme provocado tantas sonrisas.*

*Ni con las más grandes riquezas podría pagarles todo lo que me han dado.*

*Mi triunfo es también suyo.*

*LOS AMO.*

## AGRADECIMIENTOS

### A DIOS

*A mi segundo hogar la UNAM y a la Honorable Facultad de Química, por el orgullo de ser universitario.*

*Al Doctor Pedraza, por haberme dado la oportunidad de trabajar con usted.*

*A todos mis amigos con los que compartí tantas cosas, con los que forme mi segunda familia en la universidad. De todos ustedes me llevo más que lindos recuerdos, me llevo su cariño, amistad y diversiones. Esto es por ustedes y para ustedes: Érika "Pirata", Israel "Chiquitín", Susana "Gusa", Margarita "Margara" y Dulce "Pollo" (Mis brujitas), Amílcar "Albóndiga", Griselda, Edgar, Rodrigo, Aldo, Cristian "Capi", Pedro, Claudia M., Belem "Choco", Luis "Rata", Alejandra, Claudia I. Y Cristian Vásquez. Gracias por haber hecho tan maravillosa mi estancia en la universidad.*

*A Israel García Cano, por tu sonrisa, por tu alegría, por dar fuerza a mis latidos, por todo el tiempo que hemos sonreído juntos, gracias por existir TE AMO.*

*A Érika Pineda Ramírez, por ser una gran amiga, por tu sencillez y porque siempre das lo mejor de ti. Te admiro muchísimo, gracias amigui por estar a mi lado.*

*A Ricardo Jasso, por ser el profesor más divertido que he tenido, por tu amistad y confianza. Osea super gracissssss.*

*A Diana Oviedo y Betito por ofrecerme su amistad, su apoyo y por los consejos que me dieron cuando más los necesite.*

*A mi hermanita Claudia Adriana, por formar una parte importante de mi vida y por los doce años que has estado a mi lado a pesar de la distancia.*

*A Griselda Muñoz, por ser parte de mi familia.*

*A Herlinda Grimaldo, por todo su cariño y apoyo brindado cuando más lo necesité.  
Mil gracias.*

*A mis primas Abi, Jocelyne, Frida, Ursula, Carolina, Nayeli, Elizabeth y Adriana por su cariño.*

*A mis compañeros del laboratorio, por su apoyo en todos los sentidos y por su valiosa amistad: Salvador, Mechita, Bere, Adriana, Jenny y Omar.*

*A mi Carmen, por crecer juntas, por su compañía y cariño durante 13 años.*

*A los gloriosos PUMAS de la universidad.*

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	3
<b>1. ANTECEDENTES</b>	4
1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en organismos aerobios	4
1.1.1 El oxígeno como precursor de ERO	4
1.1.2 Sistemas enzimáticos generadores de ERO	6
1.1.3 Reacción de Fenton y ciclo de Haber Weiss	7
1.2 Dualidad fisiológica de las ERO	8
1.3 Enfermedades asociadas a las ERO	9
1.4 Sistema de defensa antioxidante	9
1.4.1 Antioxidantes enzimáticos	9
1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos	10
1.5 <i>Larrea tridentata</i> y el ácido nordihidroguayarético (NDGA)	14
1.5.1 Actividad antioxidante del NDGA	15
1.5.2 Actividad anti-tumorigénica del NDGA	15
1.5.3 Actividad antiviral del NDGA	16
1.6 S-alilcisteína (SAC)	16
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>3. HIPÓTESIS</b>	19
<b>4. OBJETIVOS</b>	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
5.1 Reactivos	20
5.2 Técnicas usadas para la evaluación de capacidad atrapadora de las ERO	21
5.3 Determinación de la capacidad atrapadora sobre el anión superóxido ( $O_2^-$ )	22
5.4 Determinación de la capacidad de degradar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	24

5.5	Determinación de la capacidad atrapadora sobre el radical hidroxilo (OH)	26
5.6	Determinación de la capacidad atrapadora sobre el ácido hipocloroso (HOCl)	28
5.7	Determinación de la capacidad atrapadora sobre el singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ )	30
5.8	Análisis estadístico	32
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
6.1	Anión superóxido	33
6.2	Peróxido de hidrógeno	38
6.3	Radical hidroxilo	41
6.4	Ácido hipocloroso	45
6.5	Singulete de oxígeno	49
<b>7.</b>	<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>57</b>



## RESUMEN

En la medicina botánica se conoce un gran número de plantas que han sido utilizadas como medicamentos para combatir diversas enfermedades. En varias culturas y a lo largo de los años se ha recurrido a la medicina botánica como una alternativa de la medicina moderna. Se ha manejado que las preparaciones hechas a base de hierbas son alternativas naturales y seguras en comparación con los medicamentos tradicionales. La popularización de estas plantas puede explicar en parte el uso y el abuso en su consumo. Por ejemplo, el ajo y “la gobernadora” se conocen desde hace mucho tiempo, y a ambos se les han atribuido propiedades terapéuticas, las cuales están ligadas al efecto que ejercen uno o algunos de los compuestos encontrados en cada planta. Se piensa que las propiedades benéficas que presentan el ajo y la gobernadora pueden deberse a sus compuestos con carácter antioxidante, en la planta *Allium sativum* “el ajo”, la S-alilcisteína (SAC) y en la gobernadora el ácido nordihidroguayarético (NDGA).

La planta *Larrea tridentata* (comúnmente conocida como “la gobernadora”), ha sido utilizada como un medicamento para combatir enfermedades como tuberculosis, cáncer y artritis. El componente más abundante encontrado en la planta es el NDGA, que ha sido estudiado en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* y posee muchas propiedades, entre ellas la de ser un antioxidante. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito cuales son las especies reactivas de oxígeno (ERO) que el NDGA puede atrapar. Por otro lado, la SAC es el principal compuesto organosulfurado presente en el ajo envejecido. Se sabe que es capaz de atrapar algunas ERO como anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), pero no se ha reportado si es capaz de atrapar otras ERO además de las ya reportadas.

En este trabajo se evaluó la capacidad del NDGA y de la SAC para atrapar *in vitro*  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ , ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) y singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ).

Al mismo tiempo se evaluaron diferentes antioxidantes para comparar su capacidad atrapadora con la del NDGA y la de la SAC en el modelo experimental utilizado. No todos los antioxidantes fueron utilizados en cada ensayo, se escogieron los compuestos ya reportados con capacidad de atrapar cada ERO. Los compuestos evaluados en este trabajo fueron: ácido lipoico, ácido úrico, ácido ascórbico, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetiltiourea (DMTU), deferoxamina (DFO), glutatión (GSH), N-acetilcisteína (NAC), manitol, piruvato de sodio, tempol y trolox.

Se utilizó espectrofotometría VIS/UV para medir la capacidad de los diferentes antioxidantes para atrapar  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $HOCl$  y  $^1O_2$ . Para medir la capacidad atrapadora sobre el  $O_2^-$  se midió la reducción del azul de nitrotetrazolio a 560 nm, para medir el efecto sobre el  $H_2O_2$  se determinó la

formación del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -naranja de xilenol a 560 nm, para medir la capacidad atrapadora sobre el  $\text{OH}^\cdot$  se cuantificó la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico a 532 nm, para evaluar la capacidad atrapadora sobre el  $\text{HOCl}$  se midió la oxidación del ácido tionitrobenzoico a 412 nm y para determinar el efecto sobre el  $^1\text{O}_2$  se midió la oxidación de la dimetilnitrosoanilina a 440 nm. Se calculó el valor de  $\text{IC}_{50}$  para cada antioxidante.

Se encontró que el NDGA es capaz de atrapar el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\text{IC}_{50} = 0.015$  mM), el  $\text{OH}^\cdot$  ( $\text{IC}_{50} = 0.00015$  mM), el  $^1\text{O}_2$  ( $\text{IC}_{50} = 0.15$  mM) y el  $\text{HOCl}$  ( $\text{IC}_{50} = 2.05$  mM), pero no atrapa  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además fue el mejor atrapador de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$  y  $^1\text{O}_2$  en comparación con el resto de los antioxidantes evaluados. Sin embargo, su capacidad atrapadora para el  $\text{HOCl}$  es menor que la del GSH ( $\text{IC}_{50} = 0.26$  mM), la NAC ( $\text{IC}_{50} = 0.060$  mM) y el ácido ascórbico ( $\text{IC}_{50} = 0.31$  mM) pero mayor que a la del ácido lipoico ( $\text{IC}_{50} = 2.3$  mM) y la SAC ( $\text{IC}_{50} = 2.8$  mM).

Por otro lado, la SAC es capaz de atrapar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\text{IC}_{50} = 14.5$  mM),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{IC}_{50} = 68$  mM),  $\text{HOCl}$  ( $\text{IC}_{50} = 2.8$  mM) y  $^1\text{O}_2$  ( $\text{IC}_{50} = 1.9$  mM). Sin embargo, su capacidad antioxidante para  $\text{O}_2^{\cdot-}$  es menor que la de la NAC ( $\text{IC}_{50} = 3.65$  mM), el GSH ( $\text{IC}_{50} = 5.46$  mM), el tempol ( $\text{IC}_{50} = 7.12$  mM) y el DFO ( $\text{IC}_{50} = 8.17$  mM). Por otro lado su capacidad antioxidante para  $^1\text{O}_2$  es menor que la del NDGA ( $\text{IC}_{50} = 0.15$  mM) y DMTU ( $\text{IC}_{50} = 1.68$  mM), pero mayor para el ácido lipoico ( $\text{IC}_{50} = 4.1$  mM), la NAC ( $\text{IC}_{50} = 6.8$  mM) y el GSH ( $\text{IC}_{50} = 7$  mM). La SAC no atrapó  $\text{OH}^\cdot$ .

La importancia en la herbolaria de la planta *Larrea tridentata* radica en su capacidad antioxidante debida a su principal componente el NDGA, de ahí que la planta haya sido utilizada comúnmente para combatir enfermedades como la artritis reumatoide, relacionadas con las ERO.

El ajo, además de formar parte importante en la dieta de diferentes culturas, también es reconocido por sus propiedades antioxidantes debidas a sus componentes entre ellos la SAC, es por ello que sigue vigente su uso en la herbolaria para combatir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalasa
DFO	Deferoxamina
DMTU	Dimetiltiourea
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMNA	Dimetilnitrosoanilina
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
LOX	Lipooxigenasa
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
NAC	N-acetilcisteína
NADP <sup>+</sup>	Dinucleotico de nicotinamida adenina fosfato
NADPH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NDGA	Ácido nordihidroguayarético
SAC	S-alilcisteína
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMPO	Tetrametoxipropano
TNB	Ácido tionitrobenzóico
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TPA	Acetato-beta-forbol de tetradecanol
XOR	Xantina oxido reductasa

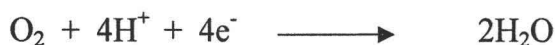
## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en organismos aerobios.

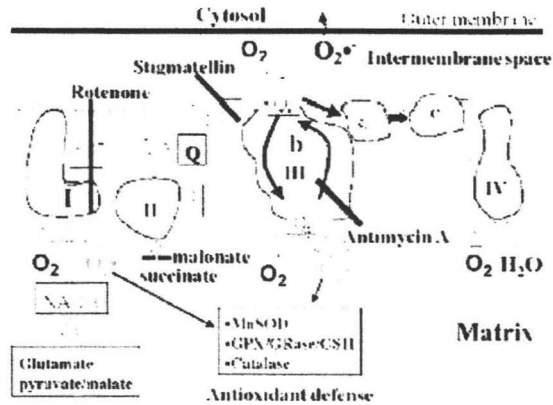
#### 1.1.1 El oxígeno como precursor de ERO.

El oxígeno es indispensable para la supervivencia de los organismos aeróbicos, se encuentra en el aire que respiramos a una concentración aproximadamente del 21%. Sin embargo, en altas concentraciones resulta tóxico para cualquier organismo. Además en situaciones donde hay una disminución del aporte de oxígeno, tales como infarto al miocardio, trasplante de órganos y choque circulatorio (isquemia), el daño de los tejidos se agrava por el retorno del oxígeno transportado en la sangre durante la reperusión después de la isquemia, debido al aumento en la concentración de oxígeno y la producción masiva de ERO (Rauen *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 2005).

La mayor parte del oxígeno consumido por el organismo es reducido a agua por el complejo IV (citocromo c oxidasa) (Figura 1) en la cadena respiratoria mitocondrial según la siguiente reacción global:

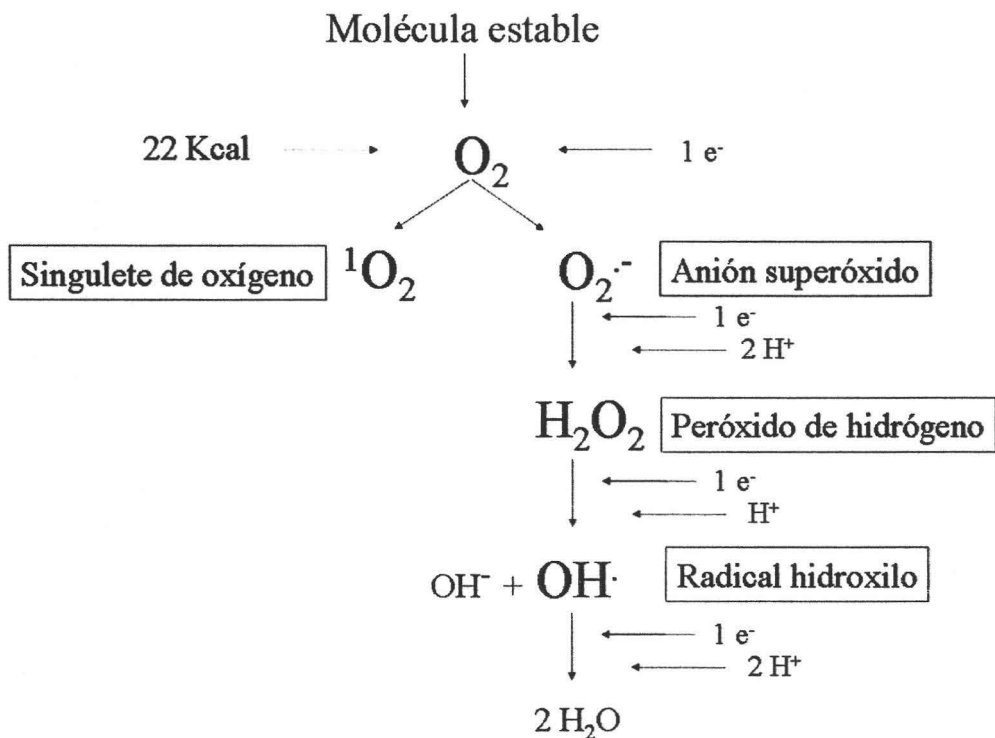


En la figura 1 esta representada la descripción de la cadena transportadora de electrones y la producción de ERO. En el complejo I (NADH deshidrogenada) y el sitio Q<sub>1</sub> del complejo III libera ERO hacia la matriz mitocondrial. Se muestra parte de la defensa antioxidante de la célula: manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). En contraste, el sitio Q<sub>o</sub> del complejo III libera ERO hacia el espacio intermembranal, lejos de la defensa antioxidante presente en la matriz mitocondrial. (Chen *et al.*, 2003)



**Figura 1.** Generación de ERO en la cadena transportadora de electrones.

Durante este proceso respiratorio se producen ERO que tienen algunas funciones importantes para la célula como: participar en la quimiotaxis, en la destrucción de bacterias invasoras por fagocitos, en la biosíntesis de moléculas y en la regulación de apoptosis. Sin embargo, la excesiva producción no controlada de ERO resulta dañina porque éstas inician la lipoperoxidación en las membranas celulares, inactivan enzimas, reaccionan con los ácidos nucleicos y las proteínas modificando sus estructuras. La cadena respiratoria es la principal fuente de producción de ERO, donde se forman a partir de la **reducción univalente del  $O_2$**  (Figura 2).

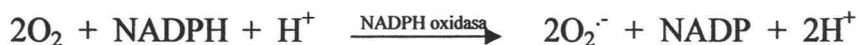


**Figura 2.** Esquema de la producción de ERO a través de la reducción univalente del  $\text{O}_2$ .

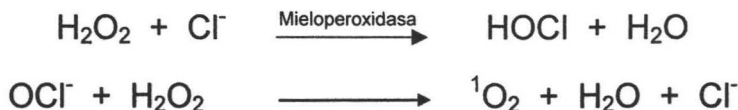
### 1.1.2 Sistemas enzimáticos generadores de ERO

Las ERO pueden ser producidas por algunas enzimas por ejemplo, las enzimas que se encuentran en los fagocitos. Cuando estas células se activan aumenta su consumo de oxígeno y con ello también la formación de ERO (Chaible *et al.*, 2005).

La NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana citoplasmática de los fagocitos cataliza la siguiente reacción en la que se produce anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ):



La mieloperoxidasa también encontrada en los fagocitos, utiliza el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en presencia de halógenos sobre todo el cloro, forma ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y a partir de éste se puede formar singlete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) de la siguiente manera:



El  ${}^1\text{O}_2$  es formado a partir del ion hipoclorito (la forma ionizada del HOCl) y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La xantina oxido reductasa (XOR), cataliza la conversión de la hipoxantina en xantina y de xantina en ácido úrico con la producción simultanea de  $\text{O}_2^-$ .

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutando el  $\text{O}_2^-$ :



El aumento de oxígeno en la descarga respiratoria de los fagocitos esta destinado a producir una gran cantidad de metabolitos del oxígeno como el  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HOCl y  ${}^1\text{O}_2$ , que tienen actividad bactericida.

### 1.1.3 Reacción de Fenton y ciclo de Haber Weiss

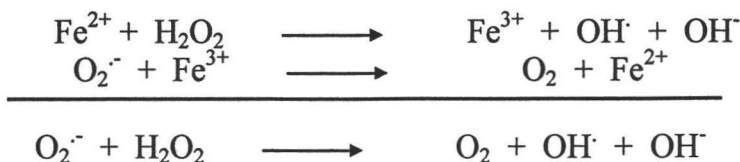
El  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado a pesar de no ser en sí un radical, tiene una importancia vital, ya que en presencia de metales de transición como  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Fe}^{2+}$  da lugar a la **reacción de Fenton** con la producción de radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ).



Por otro lado, el  $\text{O}_2^-$  alimenta la producción de  $\text{Fe}^{2+}$  y por lo tanto la reacción de Fenton, como se muestra en la siguiente reacción:



El conjunto de estas reacciones constituye el ciclo de Haber Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1999):



La coexistencia del  $O_2^-$  y del  $H_2O_2$  en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro es muy peligrosa ya que el  $OH^\cdot$  formado es una especie extremadamente reactiva que interacciona con todas las moléculas en el organismo, por tal motivo se considera como la ERO más reactiva.

## 1.2 Dualidad fisiológica de las ERO

Las ERO están involucradas en la respuesta del sistema inmune, ya que durante los procesos inflamatorios los neutrófilos y macrófagos liberan radicales libres. El sistema NADPH-oxidasa localizado en los fagocitos genera  $O_2^-$  que sirve como señal inicial en la producción de otras especies oxidantes como el  $HOCl$  y el  $^1O_2$ , que son usados para aniquilar a los microorganismos invasores. El  $H_2O_2$  juega un rol importante en la biosíntesis de hormonas tiroideas en animales y de lignanos en plantas. Algunas ERO producen mutaciones necesarias para la evolución como una respuesta adaptativa a cambios en las condiciones ambientales. Los fibroblastos liberan  $O_2^-$  para promover su proliferación (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Normalmente existe un equilibrio entre los sistemas productores de ERO y la capacidad neutralizante del sistema de defensa antioxidante (Cohen-Kerem y Koren, 2003), pero cuando se rompe este equilibrio se presenta el **estrés oxidativo**. Este desbalance se obtiene de la excesiva producción de ERO y/o por la deficiencia de los mecanismos antioxidantes. Las ERO como  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $HOCl$  y  $^1O_2$  pueden reaccionar con macromoléculas como proteínas, lípidos y ADN. Un excesivo daño a estas macromoléculas puede provocar deficiencia celular y enfermedad del organismo (Maritim *et al.*, 2003; Ávila-Lombardo, 2004).

La forma en que el exceso de las ERO puede dañar a las proteínas es oxidando los residuos de aminoácidos provocando cambios conformacionales en la proteína que pueden abatir su actividad y/o hacerla más susceptible a la digestión proteolítica. En los lípidos las ERO extraen protones de los ácidos grasos poliinsaturados desencadenando la lipoperoxidación y la formación de dienos, éstos cambian la interacción de los lípidos, la mayoría de los cuales conforman las membranas. Si los lípidos se ven afectados causan alteraciones en la fluidez y permeabilidad de la membrana (Anesini *et al.*, 2004). En los ácidos nucleicos las ERO pueden provocar hidroxilaciones de las bases y/o rompimiento de las cadenas de ADN (Carbajal-Cano, 2002).



Todos estos daños pueden conducir a la enfermedad de la célula y del organismo completo. Un ejemplo de ello es el sistema nervioso que parece ser un blanco propicio para el ataque de especies oxidantes dadas sus características químicas tales como alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, altas concentraciones de hierro y bajo contenido de enzimas antioxidantes.

### 1.3 Enfermedades asociadas a las ERO

Muchas enfermedades han sido asociadas con el estrés oxidativo, la forma en que esto puede suceder es: (1) que algún tejido sea dañado y como consecuencia se presente estrés oxidativo o (2) que se presente el estrés oxidativo y como consecuencia se dañe algún tejido. El estrés oxidativo puede surgir por la deficiencia en el sistema antioxidante y/o por el aumento en la formación de las ERO.

Algunas enfermedades relacionadas al estrés oxidativo son: Alzheimer (Kawamoto *et al.*, 2005), Parkinson (Glaser *et al.*, 2005), esclerosis lateral amiotrófica (West *et al.*, 2004), diabetes (Johansen *et al.*, 2005; Bonnefont-Rousselot, 2004), aterosclerosis (Violi *et al.*, 2004; Kawashima, 2004), daño renal (Maldonado *et al.*, 2003a), daño por radiación (Miura, 2004), cáncer (Behrend *et al.*, 2003; Anesini *et al.*, 2004) y enfisema (Koyama y Geddes, 1998), entre otras.

### 1.4 Sistema de defensa antioxidante

Debido a que en el organismo la producción de ERO es continua, existen mecanismos de defensa que impiden su formación excesiva o tratan de contrarrestarlos una vez formados para evitar sus efectos tóxicos sobre la célula. Estos mecanismos de defensa están constituidos por los antioxidantes. De acuerdo a Halliwell (1990), un antioxidante es una sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con la concentración del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de aquel sustrato. Los antioxidantes se clasifican en 2 grupos: enzimáticos y no enzimáticos.

#### 1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

La célula contiene un grupo de enzimas encargadas de la protección contra daño oxidativo. Algunas de estas enzimas se muestran en la tabla 1. La SOD dismuta el  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . Es una metaloenzima que contiene  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  dependiendo de la isoenzima de que se trate. El  $H_2O_2$  es metabolizado por la catalasa (CAT) y por la glutatión peroxidasa (GPx). La CAT está presente en los peroxisomas y se encarga de remover el  $H_2O_2$  presente en la célula (Kahl *et al.*, 2004). La GPx reduce el  $H_2O_2$  usando el glutatión (GSH) como agente reductor. El glutatión oxidado (GSSG) es reducido de

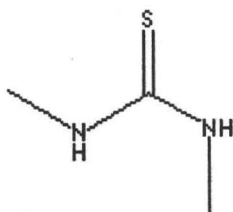
nueva cuenta por medio de la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH, así se reestablece la cantidad de GSH impidiendo que se agote su reserva.

**Tabla 1.** Ejemplos de enzimas antioxidantes

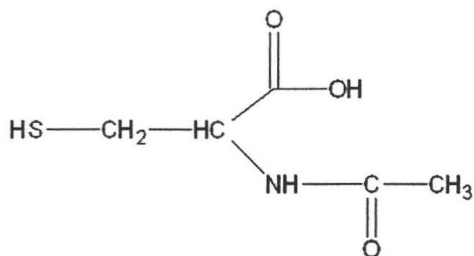
Enzima	Reacción
SOD	$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
CAT	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
GPx	$2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$
GR	$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{GSH} + \text{NADP}^+$

#### 1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos

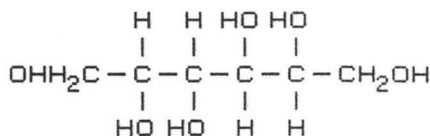
Los antioxidantes no enzimáticos son compuestos cuya estructura puede estar formada por grupos tiol (GSH), grupos hidroxilo (ácido ascórbico), protones transferibles (dimetiltiourea: DMTU) anillos aromáticos ( $\alpha$ -tocoferol), fenoles (guayacol), polifenoles (ácido nordihidroguayarético: NDGA) y dobles enlaces conjugados (licopeno). Estas estructuras reaccionan directamente con las especies reactivas proporcionándoles estabilidad o inhibiéndolas por completo. En las figuras 3 y 4 se muestra la estructura de los antioxidantes evaluados en este trabajo.



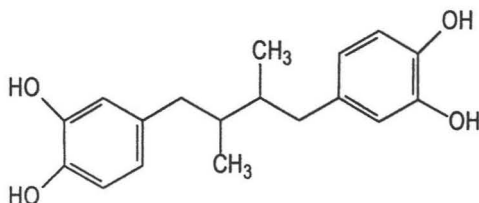
**DMTU, PM = 104.18 g/mol**



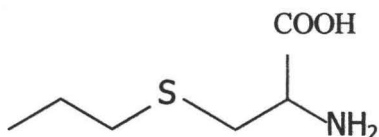
**NAC, PM = 220.4 g/mol**



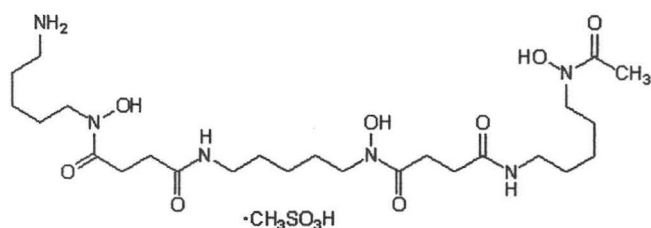
**Manitol, PM = 182.2 g/mol**



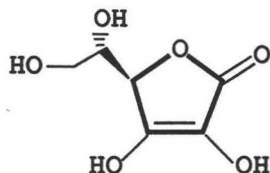
**NDGA, PM = 302.4 g/mol**



**SAC, PM = 161 g/mol**

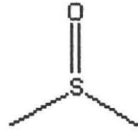


**DFO, PM = 656.8 g/mol**

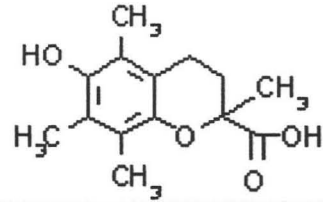


**Ácido ascórbico, PM = 176.1 g/mol**

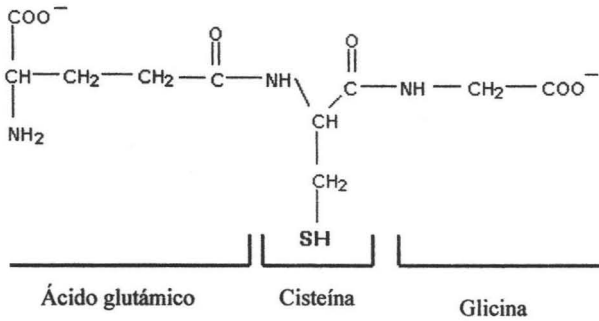
**Figura 3.** Estructura química de: DMTU, N-acetilcisteína (NAC), manitol, NDGA, S-alilcisteína (SAC), deferoxamina (DFO) y ácido ascórbico.



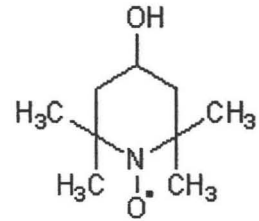
**DMSO, PM = 78.13 g/mol**



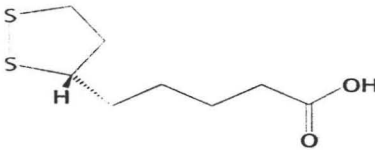
**Trolox, PM = 250.3 g/mol**



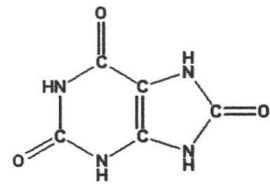
**GSH, PM = 307.3 g/mol**



**Tempol, PM = 172.2 g/mol**



**Ácido lipoico, PM = 206.3 g/mol**



**Ácido úrico, PM = 190.1 g/mol**

**Figura 4.** Estructura química de: dimetilsulfóxido (DMSO), trolox, GSH, tempol, ácido lipoico y ácido úrico.

No todos los antioxidantes no enzimáticos son producidos dentro de nuestro organismo por lo que deben ser ingeridos en la dieta, antioxidantes como el ácido ascórbico, el  $\alpha$ -tocoferol, el licopeno y los carotenoides, de los cuales ya se ha descrito que atrapan específicamente algunas ERO (Tabla 2) (Aruoma *et al.*, 1997).

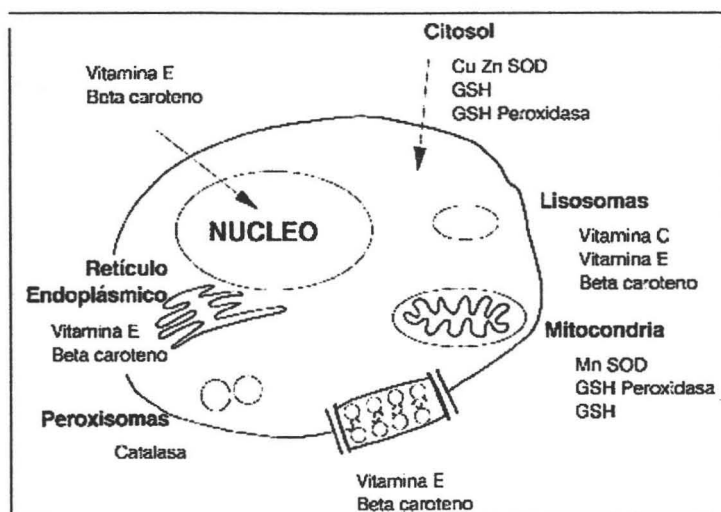
**Tabla 2.** Actividad de antioxidantes ingeridos en la dieta

Antioxidante	Actividad
Vitamina E	Liposoluble, previene la oxidación de grasa, inhibe la lipoperoxidación de las membranas (Schafer <i>et al.</i> , 2002)
$\beta$ -caroteno	Liposoluble, atrapador de singulete (Wertz <i>et al.</i> , 2005)
Vitamina C	Hidrosoluble, inhibe la oxidación de lípidos y atrapa anión superóxido (Iino <i>et al.</i> , 2005)

Los antioxidantes pueden actuar a diferentes niveles durante la secuencia oxidativa como:

- Quelando iones metálicos catalíticos como  $Fe^{2+}$
- Removiendo directamente especies reactivas clave como:  $O_2^-$  y  $H_2O_2$
- Atrapando de ERO
- Rompiendo la cadena de las ERO
- Atrapando  $^1O_2$  (Symons y Gutteridge, 1998)

En la célula se pueden encontrar antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que actúan en conjunto en diferentes regiones de la célula dependiendo de su ubicación como se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Ubicación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos dentro de la célula.

Se sabe que los antioxidantes están involucrados en la prevención de muchos padecimientos, es por ello que desde mucho tiempo atrás se han investigado las propiedades y características de un gran número de estos compuestos. En este trabajo se estudió el NDGA y la SAC, compuestos importantes encontrados en la planta la gobernadora (*Larrea tridentata*) y el ajo (*Allium sativum L.*), respectivamente, se ha demostrado que ambos compuestos presentan actividad de antioxidante *in vivo* e *in vitro*.

### 1.5 *Larrea tridentata* y el NDGA

Dentro de la medicina botánica ha sido usada tradicionalmente la planta desértica chaparral o gobernadora (Figura 6) para combatir diversos padecimientos. Es originaria del norte de México (San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora y Zacatecas) del sur de EUA (Arizona, California, Nevada, Texas y Nuevo México) algunas especies de la misma planta se han encontrado en Argentina y Bolivia (Arteaga *et al.*, 2005). El té de la gobernadora ha sido reportado en la Farmacopea como tratamiento contra la tuberculosis, artritis y cáncer (Lambert *et al.*, 2002). Para conocer que compuestos son los que le dan las características curativas se ha estudiado el extracto de esta planta tratando de identificar sus compuestos activos.



**Figura 6.** Fotografía de la planta la gobernadora, la cual llega a medir hasta 3 m de altura (izquierda) y la flor de la planta que mide apenas 1 cm. de largo (derecha).

El NDGA (Figura 3) es el principal componente encontrado en las hojas de la gobernadora, representa alrededor del 15% del peso seco de la planta, al cual se le han atribuido propiedades antioxidantes (Schultze-Mosgau *et al.*, 1998; Fujimoto *et al.*, 2004). Este compuesto fue utilizado como aditivo alimentario, principalmente para la preservación de aceites, mantequillas y en general de grasas

ejerciendo efecto como antioxidante. En 1968, se detectó que el NDGA producía daño y quistes en el riñón de ratas, pero no se ha estudiado el mecanismo de este daño (Goodman *et al.*, 1970). Como consecuencia de estos resultados fue eliminado de las listas de la FDA y se prohibió su uso en alimentos. Sin embargo, se ha continuado investigando exhaustivamente su comportamiento en diferentes modelos, ya que se ha encontrado que el NDGA presenta excelentes propiedades antioxidantes, actividad anti-inflamatoria (Arteaga *et al.*, 2005) y de protección ante diferentes padecimientos como diabetes y esclerosis lateral amiotrófica (West *et al.*, 2004). Los siguientes reportes se refieren a las propiedades encontradas para el NDGA.

### 1.5.1 Actividad antioxidante del NDGA

El NDGA disminuye el daño ocasionado por la toxicidad y el riesgo a desarrollar tumor en hígado y riñón de ratón expuesto a nitrilotriacetato férrico (Fe-NTA: un carcinógeno renal), disminuyendo el daño de estos tejidos inducido por oxidación (Ansar *et al.*, 1999). Puede inhibir el daño a ADN sujeto al estrés oxidativo, esto ha sido atribuido a la posible capacidad del NDGA para atrapar radicales y/o a la habilidad para quelar hierro (Harper *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2001). Su actividad antitumorigénica se le atribuye a sus propiedades antioxidantes. Kelly y colaboradores (2001) propusieron el siguiente mecanismo de acción del NDGA: el OH<sup>-</sup> proveniente de la reacción de Fenton reacciona con los protones de las estructuras fenólicas del NDGA, después el anión fenolato formado por la pérdida de estos protones puede quelar al ion Fe<sup>2+</sup> interrumpiendo el ciclo de Haber Weiss. Es un inhibidor de la actividad de la lipooxigenasa (LOX) previniendo así la formación de ERO (Cheng y Jan, 2002; La *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004). La formación de ERO induce la expresión de la MnSOD (enzima antioxidante), en células humanas de adenocarcinoma H441. El NDGA a 250 µM inhibe por completo la inducción de MnSOD en las mismas células (Warner *et al.*, 1996). Una dieta con NDGA (2,500 p.p.m.) alarga la vida media y detiene el deterioro de la capacidad motora de ratones G93A-SOD1 que padecen esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad asociada al estrés oxidativo). El NDGA (IC<sub>50</sub> 8 ± 3 µM) es un antagonista no tóxico de TNFα (20 ng/mL), mediando la apoptosis en células L929, por su capacidad de inhibir a la LOX (West *et al.*, 2004; Ohyama *et al.*, 2001).

### 1.5.2 Actividad anti-tumorigénica del NDGA

En una concentración de 5-50 µM el NDGA induce un aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular libre en células tumorales como células de hepatoma humano HA22/VGH (Cheng y Jan, 2002). El NDGA inhibe el desarrollo e induce la apoptosis en varias líneas tumorales *in vitro* e *in vivo*

(Hofmanova *et al.*, 2002). También inhibe al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y la señalización intracelular de la proteína cinasa C, los cuales juegan un papel importante en la proliferación y sobrevivencia del cáncer. El NDGA presenta actividad antitumoral con un valor de IC<sub>50</sub> aproximado de 3-5  $\mu\text{M}$  en la línea celular cancerígena H-69 (McDonald *et al.*, 2001). Se observó que en células MDCK el NDGA aporta un efecto sinergista de apoptosis con el acetato-beta-forbol de 12-O-tetradecanoil (TPA), mediada por la generación de ERO pero independiente de la acción de los metabolitos de la LOX. Sin embargo, el NDGA por sí solo no produce apoptosis en esta línea celular. Además se sabe que el NDGA aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células MDCK, por lo que es posible que éste sea el causante de la apoptosis inducida por TPA y NDGA (Nishimura *et al.*, 2004). El mecanismo mediante el cual ejerce su actividad aun no ha sido descrito.

### 1.5.3 Actividad antiviral del NDGA

Se ha demostrado que el NDGA es un potente inhibidor del virus del Herpes, del Papilomavirus (Craig *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003) y el de inmunodeficiencia humana tipo 1 ya que inhibe su transcripción y replicación IC<sub>50</sub> = 25  $\mu\text{M}$  (Hwu *et al.*, 1998). El mecanismo mediante el cual ejerce su actividad aun no ha sido descrito.

Estos resultados muestran que el NDGA es un excelente antioxidante, previene el desarrollo de tumores en una gran variedad de líneas celulares y también tiene actividad antiviral, y aunque ésta última no este ligada directamente con las ERO se considera que el NDGA podría tener uso potencial en el tratamiento contra patologías ocasionadas por estrés oxidativo, radicales libres y por virus. Es por ello que ha aumentando el interés por este compuesto.

### 1.6 S-alilcisteína

La SAC (Figura 3) es el principal compuesto organosulfurado presente en el ajo envejecido (0.6 mg/Kg de producto) (Maldonado *et al.*, 2003b). Se ha propuesto que la SAC podría ser uno de los compuestos activos del ajo envejecido con efecto protector en modelos asociados con estrés oxidativo.

#### *In vivo*

Se ha demostrado que tiene actividad como antioxidante. Reduce la formación de edema en cerebro de rata sometida a isquemia, el mecanismo parece estar relacionado con la lipoperoxidación. Reduce el daño histológico en hígado y corazón, ratones tratados con doxorubicina (droga anticancerígena). Disminuye la insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina (Maldonado *et al.*,



2003a). Además atenúa la toxicidad del ácido quinolínico debido a que atrapa radicales libres, disminuye del estrés oxidativo y preserva la actividad de la Cu, Zn-SOD estriatal (Pérez-Severiano *et al.*, 2004).

*In vitro*

Se ha demostrado que tiene actividad como antioxidante. Es capaz de atrapar  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  (Kim *et al.*, 2001) y  $H_2O_2$  (Ho *et al.*, 2001). La SAC también inhibe el daño endotelial y la lipoperoxidación inducido por  $H_2O_2$  y la oxidación de lipoproteínas. Regula la producción de óxido nítrico en macrófagos (Kim *et al.*, 2001).

La SAC presenta una importante actividad como antioxidante. Este compuesto podría ser utilizado en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En la herbolaria se conoce un gran número de plantas utilizadas como medicina alterna. En los últimos años aumentó la atención sobre la identificación de los compuestos activos de muchas plantas debido a su importancia en el uso contra diversos padecimientos. De entre esa gama de plantas reconocidas, decidimos tomar dos de ellas la gobernadora y el ajo. De éstas se estudió uno de sus principales componentes, el NDGA y la SAC, respectivamente. El NDGA ha sido sometido a muchos estudios en los que se evaluó el daño ocasionado por el estrés oxidativo y se observó que presenta propiedades como antioxidante. Una forma de conocer en parte como es que el NDGA actúa como antioxidante en sistemas biológicos es conociendo la eficacia con la que puede atrapar las diferentes ERO. Hasta el momento no se ha reportado cuales son las ERO que el NDGA pueda inhibir. Por otro lado, la SAC atrapa específicamente  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ , pero no se conocen valores de  $IC_{50}$ . Es por ello que el objetivo de este trabajo es determinar la capacidad del NDGA y la SAC para atrapar cada especie reactiva de oxígeno, determinar sus valores de  $IC_{50}$  y saber su efectividad comparándolo con otros antioxidantes que ya han sido descritos como atrapadores específicos de cada ERO.

### 3. HIPÓTESIS

Si el NDGA presenta actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro*, entonces se espera que su potencia para atrapar ERO sea mayor a la del resto de los antioxidantes a evaluar.

Si la SAC atrapa el  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH\cdot$ , y presenta actividad antioxidante *in vivo*, es posible que este compuesto sea capaz de atrapar otras ERO además de lo ya reportado hasta ahora.

### 4. OBJETIVOS

#### General

Determinar los valores de  $IC_{50}$  para las ERO que pueden atrapar *in vitro* el NDGA y la SAC comparando dicha capacidad con otros antioxidantes ya caracterizados.

#### Particulares

Determinar el valor de  $IC_{50}$  de NDGA y SAC para las siguientes especies:  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$  y  $O_2^-$ .

Determinar el valor de  $IC_{50}$  para los antioxidantes: DMTU, DMSO, trolox, manitol, ácido ascórbico, ácido úrico, piruvato de sodio, ácido lipoico, NAC, DFO y GSH evaluando su efecto antioxidante sobre las especies  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$  y  $O_2^-$ .

Comparar los valores de  $IC_{50}$  del NDGA y SAC con los de otros antioxidantes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron de **Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)**: NDGA # cat. N5023, GSH # cat. G4251, xantina # cat. X0626, nitroazul de tetrazolio (NBT) # cat. N6876, XOR # cat. X4376, naranja de xilenol # cat. X0127, hidroxitolueno butilado (BHT) # cat. B1378, histidina # cat. H8000, borhidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) # cat. S9125, ácido ascórbico # cat. A7506, desoxirribosa # cat. D2751, ácido tiobarbitúrico (TBA) # cat. T5500, DFO # cat. D9533, ácido úrico # cat. U2875, piruvato de sodio # cat. P2256, NAC # cat. A-8199, DMSO # cat. D5879, manitol # cat. M9647, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) # cat. E5134, fosfato de sodio monobásico # cat. S3139, fosfato de sodio dibásico # cat. S3264 y tempol # cat. H8258. Los siguientes reactivos fueron adquiridos de **J. T. Baker (México, D.F.)**: ácido clorhídrico (HCl) # cat. 9535-02, ácido tricloroacético (TCA) # cat. 807 0414-01, carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) # cat. 3604-05, hidróxido de sodio (NaOH) # cat. 3140-01, metanol grado HPLC # cat. 9093-03, sulfato ferroso amoniacal # cat. 2054-01, ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) # cat. 9681-05, hipoclorito de sodio (NaOCl) # cat. 9416-01, fosfato de potasio monobásico # cat. 3246-01. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  # cat. 5240 y el fosfato de potasio dibásico # cat. 7092 fueron adquiridos de **Mallinckrodt (México, D.F.)**. De **Aldrich Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)**: dimetilnitrosoanilina (DMNA) # cat. D17, 240-5, cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) # cat. 15,774-0, DMTU # cat. D18, 870-0. El ácido lipoico # cat. 62320 se adquirió de **Fluka Biochemika (Steinheim, Suiza)**. De **Calbiochem (La Jolla, CA, EUA)**: el Trolox # cat. 648471. Todos los compuestos fueron de calidad grado analítico.

Debido a que la SAC no se encuentra disponible de forma comercial, fue sintetizada por la Doctora Perla Maldonado de la siguiente manera: 5.25 g de cloruro de L-cisteína monohidratada se disolvieron en 90 mL de etanol absoluto y la mezcla se mantuvo en condiciones de agitación. Luego se adicionaron 2.76 g de sodio en un intervalo de 1 h a temperatura ambiente. Después de que el sodio se disolvió por completo se agregaron 2.7 mL de bromuro de alilo y la mezcla se dejó en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Después se adicionó agua fría suficiente para formar una solución la cual se dejó en agitación bajo las mismas condiciones. Se permitió la evaporación del etanol y a la fase acuosa se le adicionó ácido acético glacial hasta alcanzar un pH de 5. El precipitado blanco formado se filtró a vacío y se lavó con etanol frío (Maldonado-Jiménez, 2004).

Antioxidantes evaluados: NDGA, DMTU, DFO, ácido úrico, ácido ascórbico, piruvato de sodio, ácido lipoico, NAC, GSH, trolox, DMSO, manitol, tempol y SAC. Los siguientes antioxidantes

se disolvieron en H<sub>2</sub>O destilada: DMTU, DFO, ácido úrico, ácido ascórbico, piruvato, NAC, GSH, trolox, DMSO, manitol, tempol y SAC. El ácido lipoico se disolvió en metanol y el NDGA se disolvió en una mezcla H<sub>2</sub>O/DMSO 1:1. Las diluciones necesarias de se hicieron con H<sub>2</sub>O. En todos los ensayos se midió como control el DMSO como vehículo del NDGA.

## **5.2 Técnicas usadas para la evaluación de capacidad atrapadora sobre las ERO *in vitro***

Todas las técnicas empleadas fueron espectrofotométricas y se basaron en la generación de las ERO con la excepción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el HOCl los cuales se agregaron al ensayo.

### 5.3 Determinación de la capacidad atrapadora sobre el $O_2^{\cdot-}$

Esta evaluación se basó en la generación del  $O_2^{\cdot-}$  por la acción de la xantina oxidasa que forma ácido úrico y  $O_2^{\cdot-}$  a partir de la xantina. El  $O_2^{\cdot-}$  formado reduce al NBT formando formazán un compuesto de color azul que absorbe a 560 nm (Figura 7).

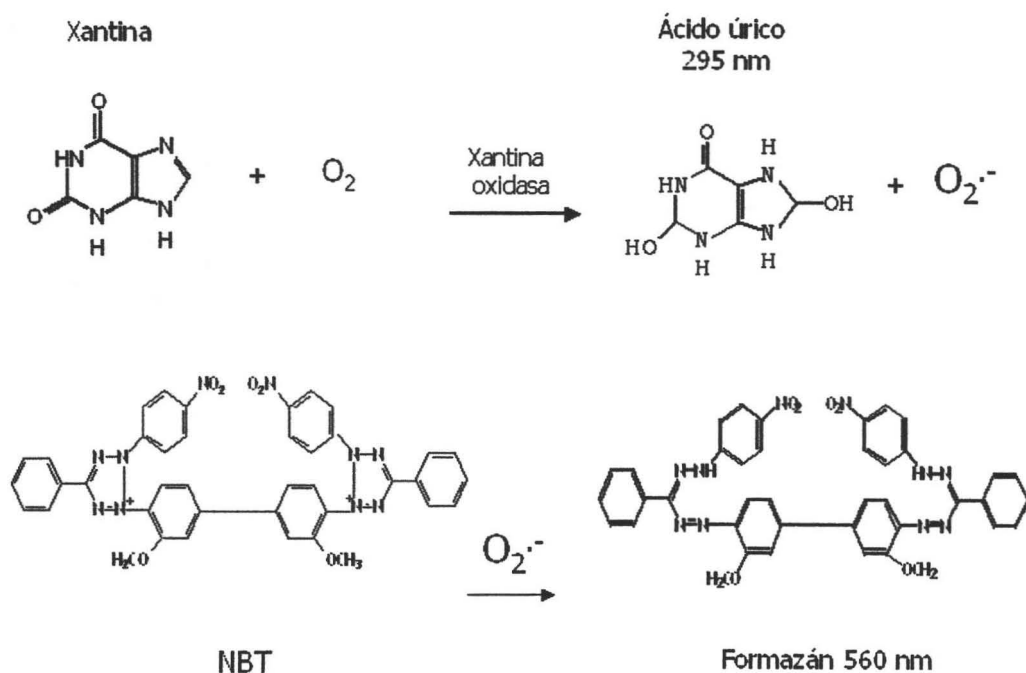
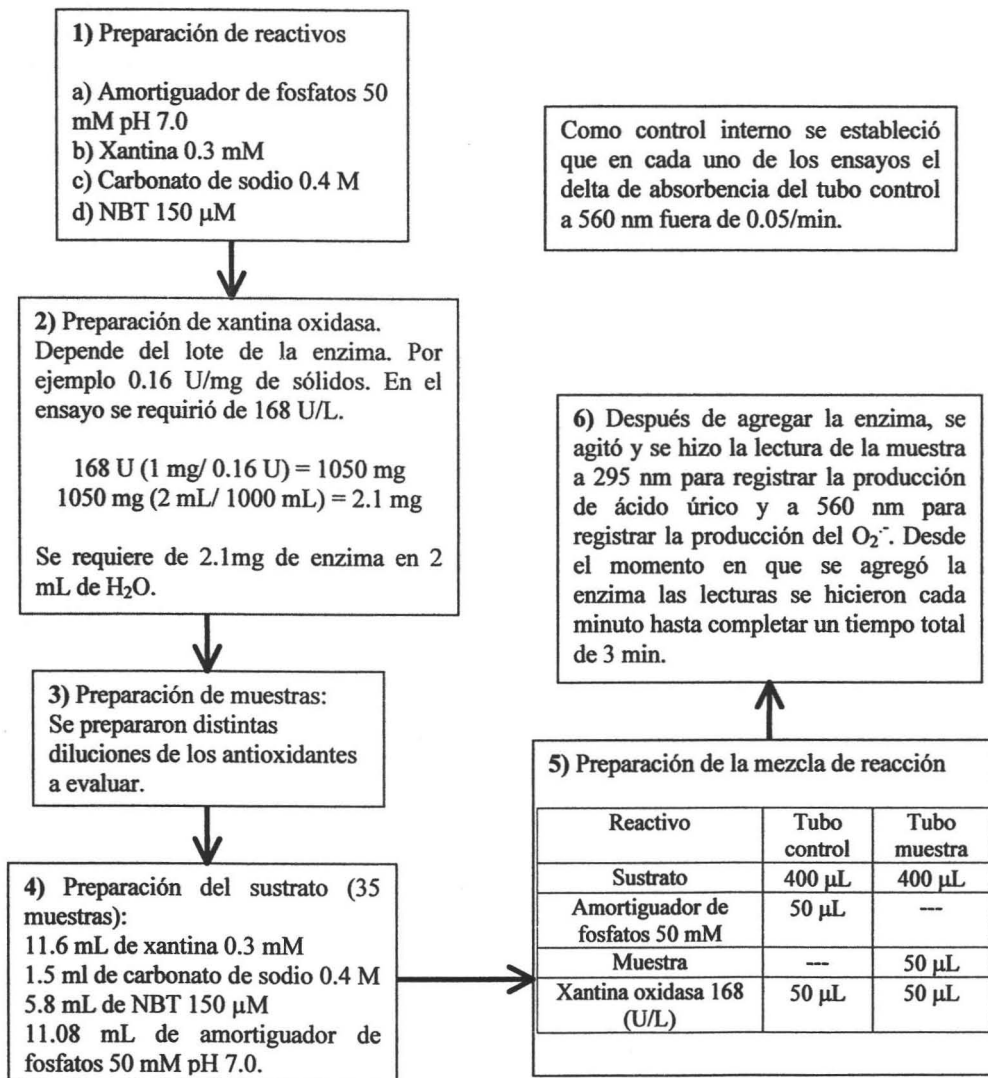


Figura 7. Fundamento del método para evaluar la capacidad de atrapamiento sobre el  $O_2^{\cdot-}$

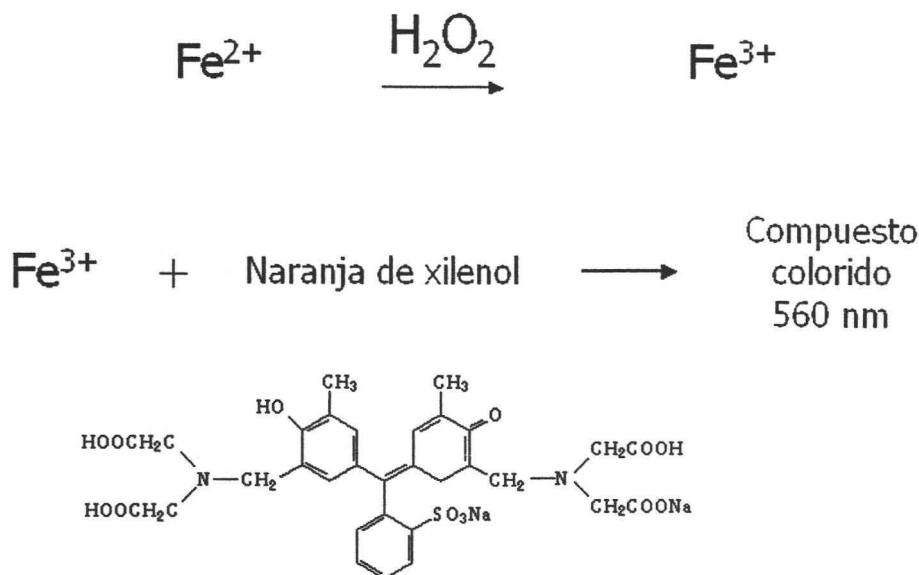
Al agregar un compuesto con la capacidad de atrapar el  $O_2^{\cdot-}$  ya no hay reducción del NBT y por lo tanto no hay aumento en la absorbencia a 560 nm. Como control del ensayo se mide la formación de ácido úrico a 295 nm, la cual debe ser constante a lo largo del ensayo, eso nos indica que el antioxidante que se está evaluando no afecta la actividad de la xantina oxidasa. Los cambios en las absorbencias a 295 nm y a 560 nm se compararon con un control que recibió el mismo tratamiento que las muestras y se completó el volumen de reacción con agua destilada. Los cambios en la absorbencia a 560 nm del control corresponden al 100% de generación de  $O_2^{\cdot-}$  ya que no hay nada que impida la formación del  $O_2^{\cdot-}$  y la consecuente reducción del NBT.

## METODOLOGÍA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ATRAPADORA SOBRE EL $O_2^{\cdot-}$



#### 5.4 Determinación de la capacidad de degradar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En esta técnica el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió de manera indirecta. El fundamento del ensayo es que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la muestra oxida el ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>) a su forma férrica (Fe<sup>3+</sup>). El ion férrico se une entonces al naranja de xilenol y forma un complejo colorido que es medido a una longitud de onda de 560 nm (Figura 8).

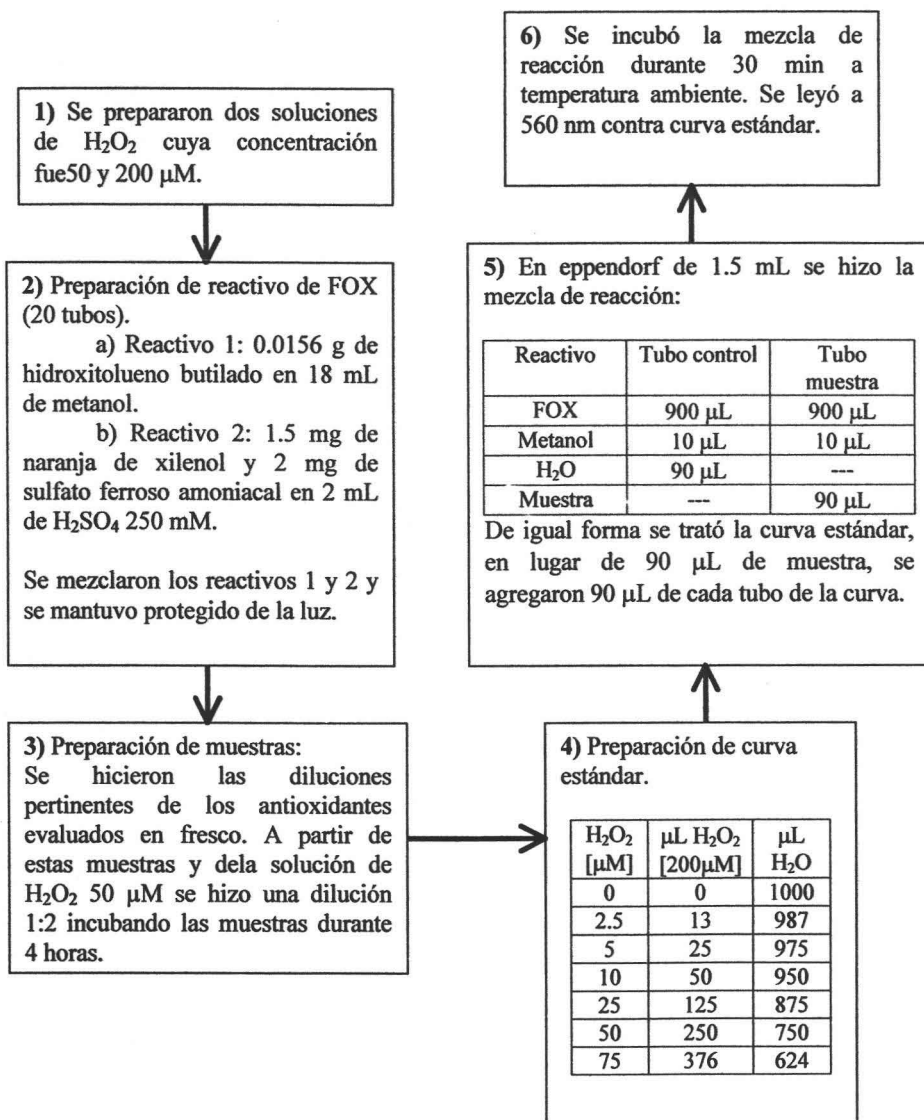


**Figura 8.** Medición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando la técnica de Fe<sup>3+</sup>-naranja de xilenol (FOX).

Al agregar un compuesto con la capacidad de descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se oxidará el ión ferroso y, por lo tanto, no se formará el compuesto colorido medido a 560 nm. Para evaluar si los compuestos degradan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se permitió la interacción del compuesto en diferentes concentraciones con una concentración conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 4 horas antes de realizar la medición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La absorbancia se comparó con el control, que recibió el mismo tratamiento que las muestras y se completó el volumen de reacción con agua destilada. Los cambios en la absorbancia a 560 nm del control corresponden al 100% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que no hay nada que provoque la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la consecuente formación del complejo Fe<sup>3+</sup>-naranja de xilenol.



## METODOLOGÍA PARA MEDIR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



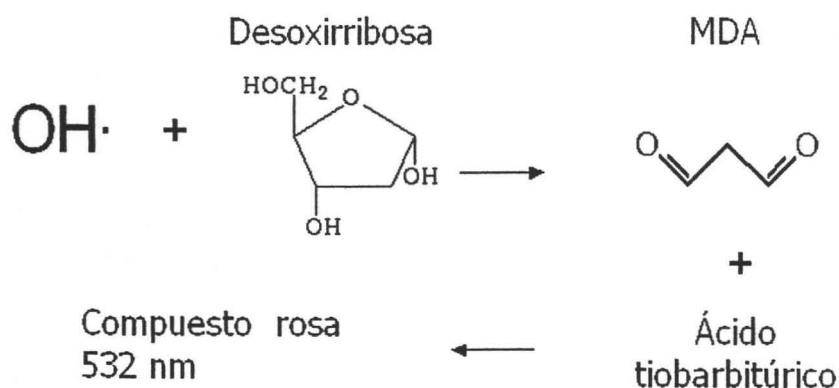
## 5.5 Determinación de la capacidad atrapadora sobre OH·

En esta técnica se generó el OH· a partir de la reacción de Fenton. La producción del radical se puede medir por el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los radicales hidroxilos generados reaccionan directamente con la desoxirribosa produciendo malondialdehído, el cual bajo calentamiento con ácido tiobarbitúrico y a pH bajo, forma un compuesto de color rosa que es medido a una longitud de onda de 532 nm (Figura 9).

### Reacción de Fenton



### Reacción con TBARS



**Figura 9.** Generación de OH· y su medición indirecta por la técnica de TBARS.

Al agregar un compuesto con la capacidad de atrapar el OH·, éste compite con la desoxirribosa disminuyendo la formación del compuesto rosa (Halliwell *et al.*, 1987). El cambio en la absorbencia debido al atrapamiento del OH· se comparó con el control, que recibió el mismo tratamiento que las muestras y se completó el volumen de reacción con agua destilada. Los cambios en la absorbencia a 532 nm del control corresponden al 100% de generación de OH· ya que no hay nada que impida la formación del OH· y la consecuente reacción con el ácido tiobarbitúrico.

## METODOLOGÍA PARA MEDIR LA CAPACIDAD ATRAPADORA DE OH<sup>-</sup>

Como control interno se estableció que en cada uno de los ensayos la absorbencia del tubo control fuera de 1.0.

### 1) Preparación de reactivo TBARS (50 tubos):

- 0.1875 g de TBA
- 41.5 mL de H<sub>2</sub>O destilada
- 1.04 mL de HCl concentrado
- 7.5 mL de TCA (100%)
- 0.033 g de DFO

Se agitó protegido de la luz.

### 2) Preparación de reactivos para la generación de radical hidroxilo:

- Solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 7.4
- Desoxirribosa 2.8 mM
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM
- EDTA/ FeCl<sub>3</sub> 1.04 mM/1 mM
- Ácido ascórbico 1 mM

La disolución de todos los reactivos se hizo en la solución amortiguadora de fosfatos.

### 3) Preparación de muestras:

Se hicieron las diluciones pertinentes de los antioxidantes evaluados en fresco.

### 4) Mezcla de reacción generadora de radical hidroxilo:

Reactivo	Tubo control	Tubo muestra
Ácido ascórbico	200 µL	200 µL
Desoxirribosa	200 µL	200 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µL	100 µL
Amortiguador de fosfatos	300 µL	200 µL
Muestra	---	100 µL
EDTA/FeCl <sub>3</sub>	200 µL	200 µL

La reacción comenzó al agregar la mezcla de EDTA/FeCl<sub>3</sub>.

9) Se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se leyeron a 532 nm contra la curva estándar.

8) Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregó a todos los tubos (incluyendo la curva) 1 mL del reactivo de TBARS. Inmediatamente se incubaron los tubos en baño de aceite a 95°C durante 10 min.

### 7) Preparación de curva estándar:

nmoles de malondialdehído	"Solución B" TMPO (µL)	Amortiguador de fosfato de potasio 20 mM pH 7.4 (µL)
0	0	1000
0.37	10	990
0.74	20	980
1.48	40	960
2.96	80	920
7.40	200	800
14.8	400	600

### 6) Preparación de tetrametoxipropano (TMPO):

- "Solución A": 10 µL de TMPO + 812 µL de amort. 20 mM pH 7.4.
- "Solución B": 10 µL de sol. Stock A + 9.99 mL de amort. 20 mM.

5) Inmediatamente de haber iniciado la reacción, los tubos se incubaron en baño María a 37°C durante 1 hora.

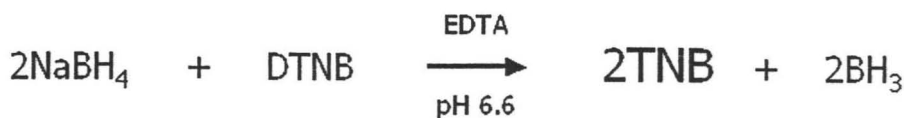
### 5.6 Determinación de la capacidad atrapadora sobre el HOCl

El HOCl se generó a partir de NaOCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que al ser agregado baja el pH y permite la protonación del hipoclorito dando lugar a la formación del HOCl (1). Se midió la disminución de la densidad óptica a 412 nm causada por la oxidación del TNB a DTNB (Figura 10).

1



2



3

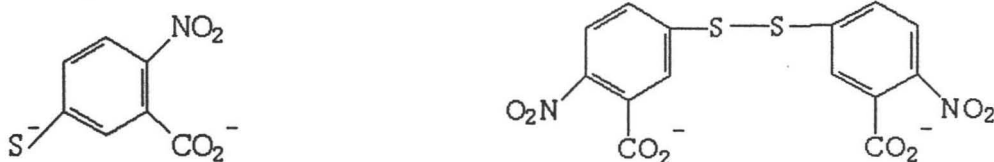
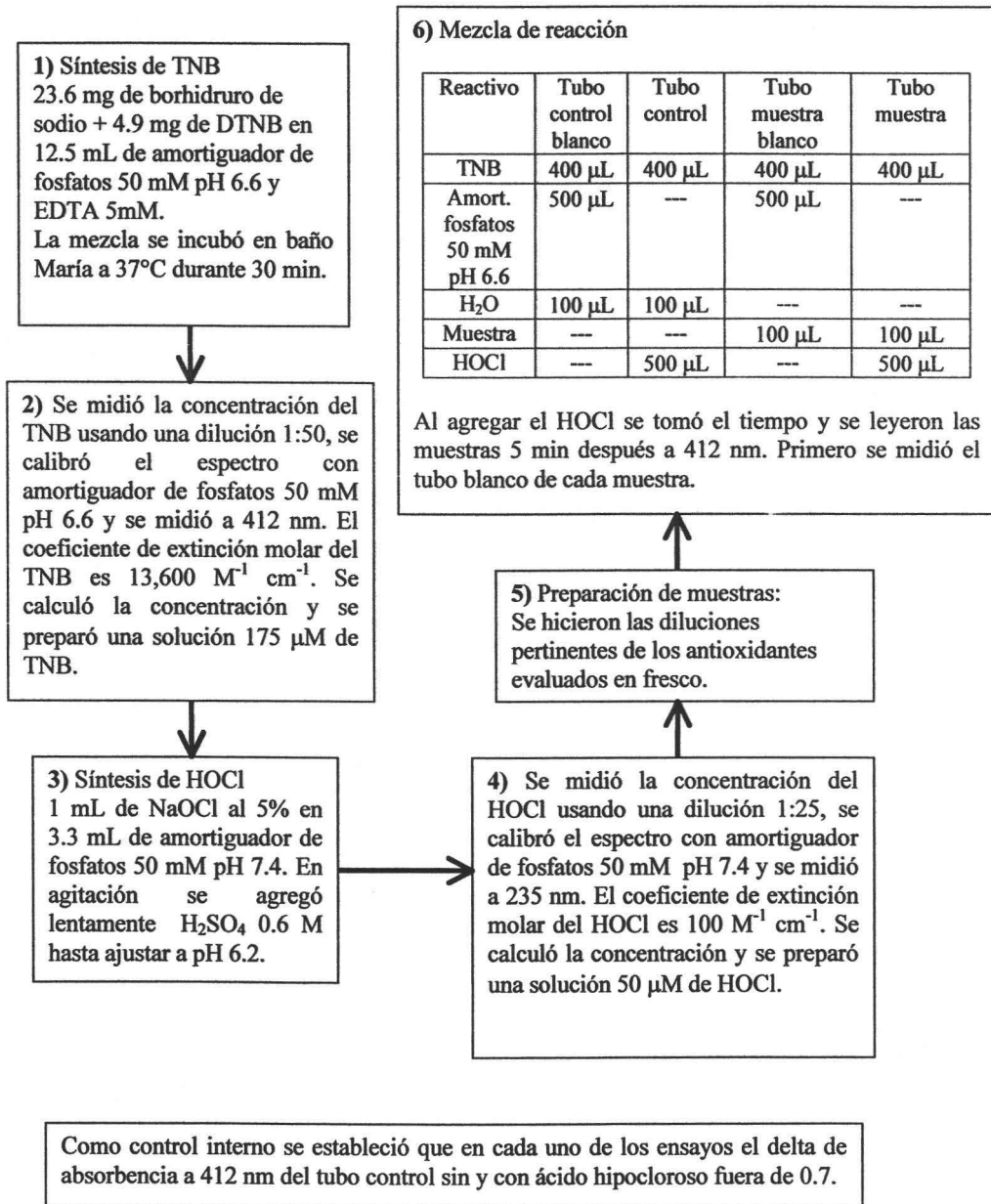


Figura 10. Evaluación de la actividad atrapadora sobre el HOCl mediante el ensayo de DTNB.

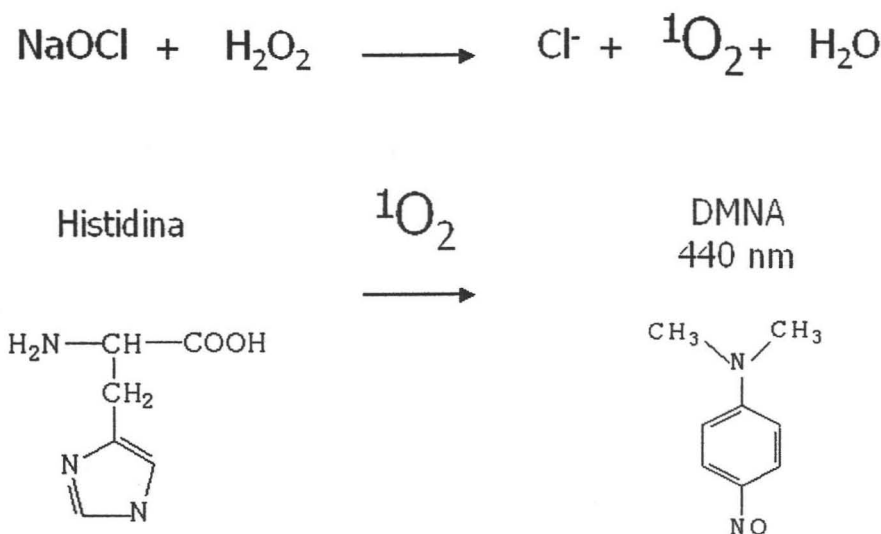
Al agregar un compuesto con la capacidad de atrapar el HOCl ya no hay oxidación de TNB debida al HOCl y por lo tanto no disminuye la absorbencia a 412 nm. El cambio en la absorbencia debido al atrapamiento sobre el HOCl se comparó con el control que recibió el mismo tratamiento que las muestras y se completó el volumen de reacción con agua destilada. Los cambios en la absorbencia a 412 nm del control corresponden al 100% de HOCl ya que no hay nada que atrape el HOCl e impida la consecuente oxidación del TNB.

# METODOLOGÍA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ATRAPADORA SOBRE EL HOCl



### 5.7 Determinación de la capacidad atrapadora sobre el $^1\text{O}_2$

Para esta técnica el  $^1\text{O}_2$  se generó a partir de la reacción de NaOCl y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $^1\text{O}_2$  generado reacciona con la histidina produciendo un compuesto reactivo de histidina, el cual provoca la pérdida de color del DMNA (el color del DMNA es amarillo) (Figura 11). La formación del  $^1\text{O}_2$  se mide indirectamente por la disminución de la absorbencia del DMNA a 440 nm.



**Figura 11.** Evaluación de la actividad atrapadora sobre el  $^1\text{O}_2$  mediante el ensayo de DMNA.

Si el compuesto a probar tiene la capacidad de atrapar  $^1\text{O}_2$  entonces éste no causará la decoloración del DMNA y la absorbencia obtenida a 440 nm no disminuirá (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2004). El cambio en la absorbencia debido al atrapamiento del  $^1\text{O}_2$  se comparó con el control que recibió el mismo tratamiento que las muestras y se completó el volumen de reacción con agua destilada. Los cambios en la absorbencia a 440 nm del control corresponden al 100% de generación de  $^1\text{O}_2$  ya que no hay nada que impida la formación del  $^1\text{O}_2$  y la consecuente decoloración del DMNA.

## METODOLOGÍA PARA MEDIR LA CAPACIDAD ATRAPADORA SOBRE $^1\text{O}_2$

### 1) Preparación de reactivos:

- a) Amortiguador de fosfatos 60 mM pH 7.1
- b) Histidina 200 mM
- c) NaOCl 200 mM
- d)  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 mM
- e) DMNA 1 mM

Todos los reactivos se disolvieron en agua.



### 2) Preparación de muestras:

Se hicieron las diluciones pertinentes de los antioxidantes evaluados en fresco.



### 3) Mezcla de reacción generadora de singulete de oxígeno.

Reactivo	Tubo control	Tubo muestra
Amortiguador de fosfatos	1.5 mL	1.5 mL
Histidina	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}_2$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
DMNA	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Muestra	---	100 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	100 $\mu\text{L}$	---
NaOCl	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

La reacción inició al agregar el NaOCl.

Como control interno se estableció que en cada uno de los ensayos el delta de absorbencia del minuto 0 al 40 del tubo control fuera alrededor de 1.

5) Se tomó el tiempo de la lectura al tiempo cero y transcurridos 40 min las muestras se leyeron nuevamente.



4) Se calibró el espectro con  $\text{H}_2\text{O}$ . El NaOCl se agregó al primer tubo se agitó e inmediatamente después se midió en el espectro a 440 nm. Esta lectura se consideró como el  $t=0$ . Después se tomó el segundo tubo y se hizo lo mismo para todos los tubos.

En cada técnica se estableció un valor de absorbencia específico como un control interno para así asegurar que siempre se generó la misma cantidad de ERO. Como se mencionó al final de todas las técnicas todos los tubos se compararon siempre contra su tubo control (100% de generación de cada ERO) y se calculó el porcentaje de atrapamiento de cada especie reactiva.

La actividad atrapadora se expresa como la concentración del antioxidante necesaria para inhibir el 50% de la formación de cada especie reactiva de oxígeno ( $IC_{50}$ ). Entre menor sea el valor de  $IC_{50}$  mayor es la capacidad del compuesto para atrapar la especie reactiva. Los valores de  $IC_{50}$  se calcularon a partir de una recta ajustada por el método de mínimos cuadrados.

## **5.8 Análisis estadístico**

Para comparar la capacidad atrapadora de los antioxidantes se usó el programa de estadística Graph Pad Prism versión 3.02, San Diego, CA, EUA. Se utilizó un ANOVA paramétrico seguido de comparaciones múltiples por el método de Dunnett. Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media. Una  $p < 0.05$  se consideró significativa.

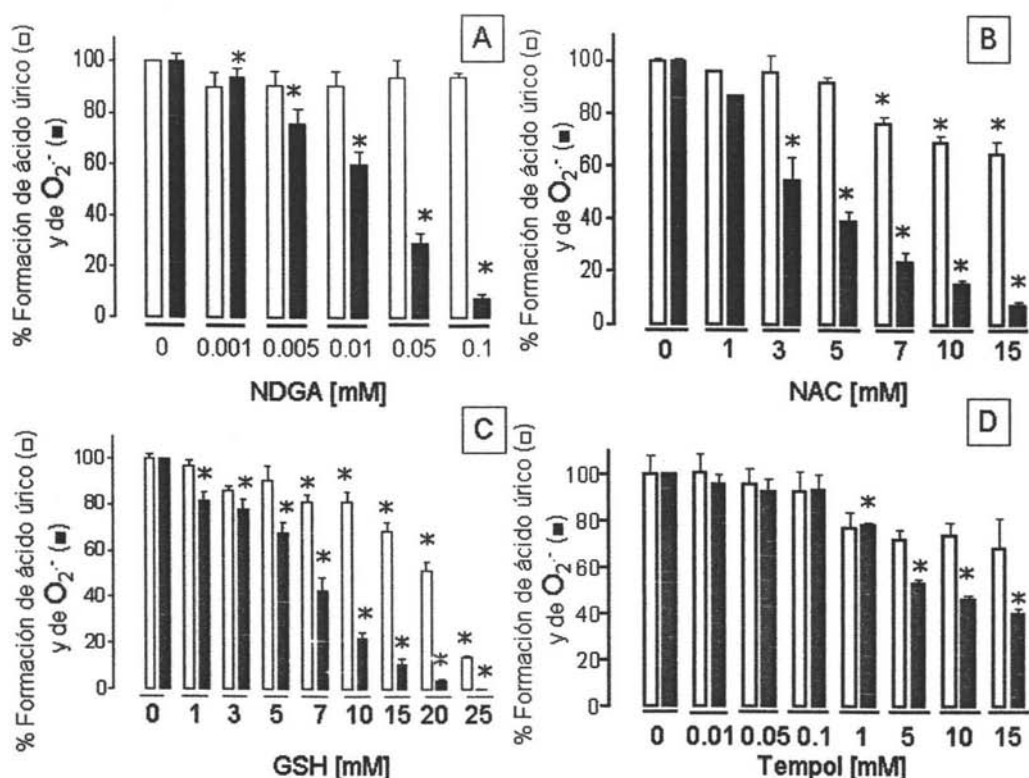


## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al inicio de cada metodología se determinó los antioxidantes a evaluar según lo encontrado en la literatura. De cada antioxidante se prepararon concentraciones desde 0.0000 01 mM hasta la más concentrada que nos permitió la solubilidad de cada antioxidante. En aquellos ensayos en los que se observó que el antioxidante atrapaba la ERO estudiada solo fueron considerados los datos representativos de un comportamiento concentración-respuesta. En los siguientes casos los datos obtenidos no fueron tomados en cuenta para calcular el valor de  $IC_{50}$ : si en las concentraciones más bajas no se observó ningún efecto, en concentraciones muy altas el comportamiento ya no cambió y cuando las concentraciones altas del antioxidante presentaron interferencias con el ensayo. Es por ello que las diluciones varían de antioxidante a antioxidante en cada ensayo.

### 6.1 Anión superóxido.

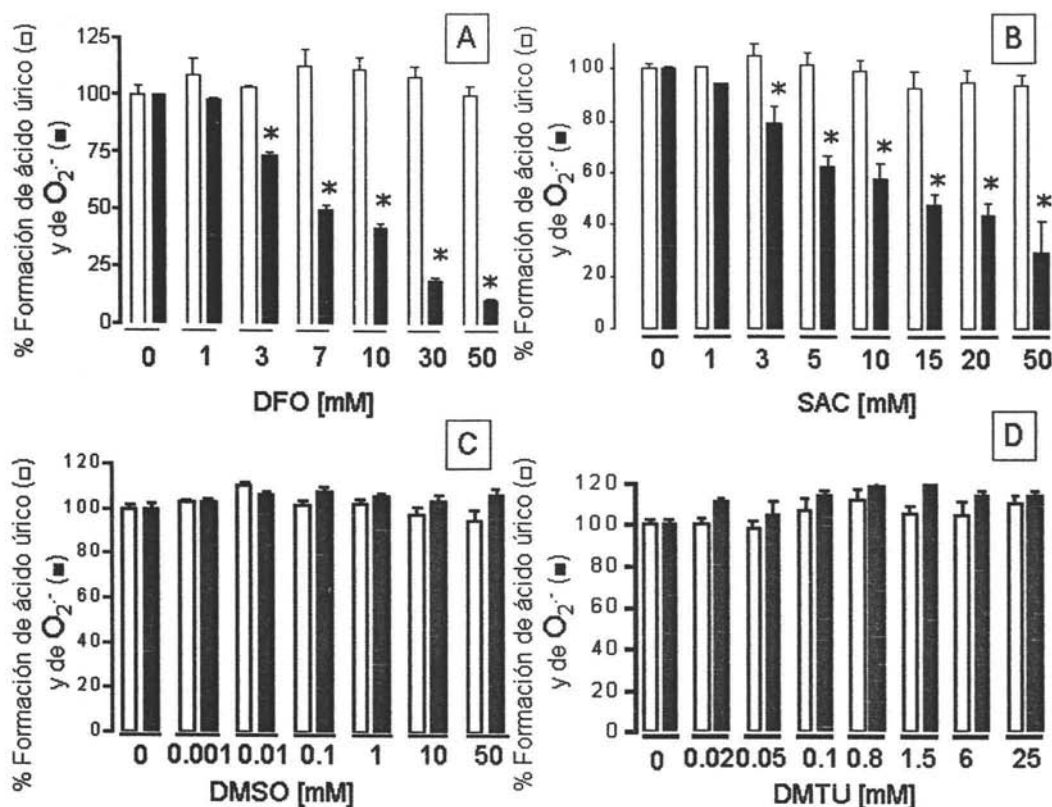
En la figura 12 se observa en el panel A que el NDGA atrapa directamente  $O_2^-$  presentando un comportamiento concentración-respuesta y alcanzó aproximadamente 90% de atrapamiento del anión a 1 mM y que no tiene ningún efecto sobre la xantina oxidasa pues la producción de ácido úrico y por tanto la del  $O_2^-$  es constante en todo el ensayo. En el panel B se observa que la NAC también atrapa  $O_2^-$ , pero conforme aumenta la concentración de NAC se ve afectada la xantina oxidasa pues disminuye la generación de ácido úrico. A una concentración de 7 mM de NAC la disminución en la producción de ácido úrico ya es significativa, pero ya se ha alcanzado más del 50% de inhibición del  $O_2^-$ , así que el efecto observado es debido principalmente al atrapamiento del anión. Por ello se consideró válido calcular el valor de  $IC_{50}$  con los datos obtenidos. Lo mismo sucedió con el GSH mostrado en el panel C. En el panel D se puede observar que en el tempol hay una disminución de la producción de ácido úrico conforme aumenta la concentración del tempol sin embargo, no hay diferencia significativa de esos valores correspondientes a cada concentración de tempol comparado contra el control (0 mM). El atrapamiento máximo de  $O_2^-$  apenas sobrepasó el 50%, se consideró los datos obtenidos y se calculó el valor de  $IC_{50}$ . A concentraciones más elevadas de tempol se presentó interferencia en el ensayo.



**Figura 12.** Efecto del NDGA (A), la NAC (B), el GSH (C) y el tempol (D) sobre la formación de  $O_2^{\cdot-}$  medida como la reducción del NB $\beta$  (■). También se presenta la producción de ácido úrico (□). (Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 5-8. \*p<0.001 vs 0 mM).

En los paneles A y B de la figura 13 se observa el efecto de atrapamiento del DFO y la SAC sobre el  $O_2^{\cdot-}$ , respectivamente. Ambos compuestos atrapan directamente el  $O_2^{\cdot-}$  presentando comportamiento de concentración-respuesta. Se mantuvo constante la producción de ácido úrico y por lo tanto la de  $O_2^{\cdot-}$  a lo largo del ensayo. A 50 mM de DFO se alcanza alrededor del 90% de atrapamiento de  $O_2^{\cdot-}$  mientras que para la SAC a la misma concentración alcanzó el 75%. No se pudieron usar concentraciones más altas de SAC en el ensayo porque su solubilidad es muy baja.

El DMSO y el DMTU mostrados en los paneles C y D, respectivamente, no disminuyen la producción de ácido úrico, por lo tanto no afectan a la xantina oxidasa, pero tampoco tiene la capacidad de atrapar  $O_2^{\cdot-}$  en las concentraciones evaluadas y bajo las condiciones del ensayo ya establecidas.

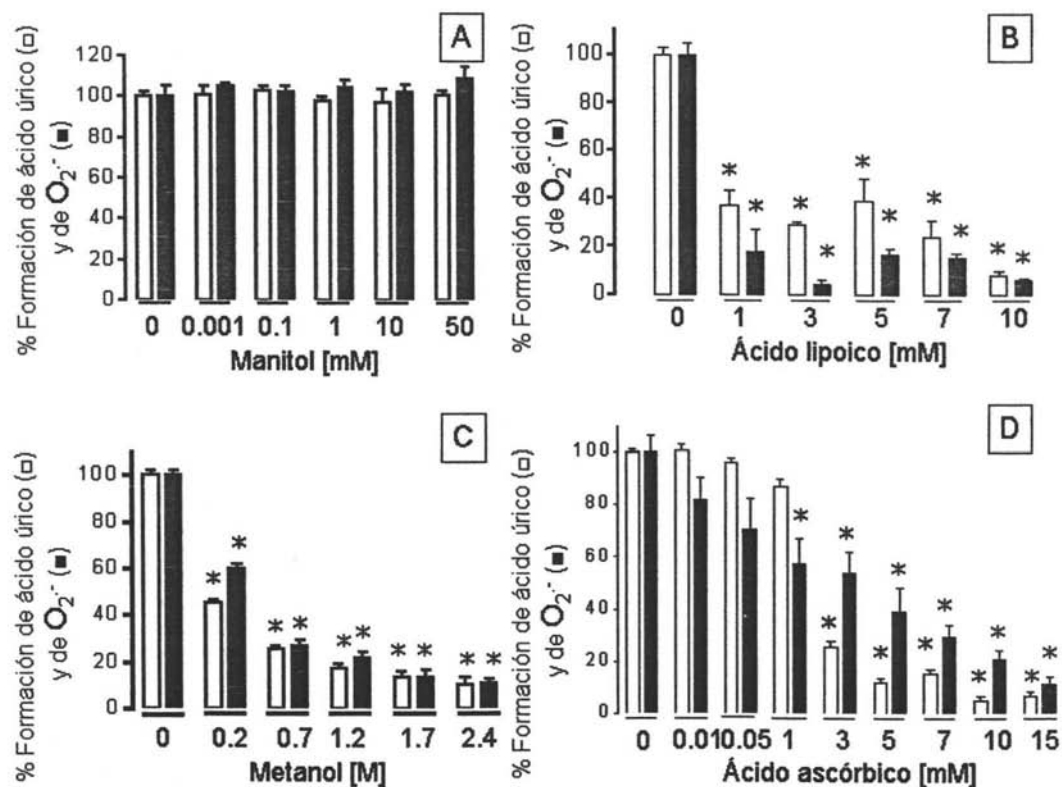


**Figura 13.** Efecto del DFO (A), la SAC (B), el DMSO (C) y el DMTU (D) sobre la formación de  $O_2^{\cdot-}$  medida como la reducción del NBT (■). También se presenta la producción de ácido úrico (□). Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 4-11. \* $p < 0.001$  vs 0 mM.

En la figura 14 se puede observar en el panel A que el manitol no atrapa  $O_2^{\cdot-}$ . En el panel B de la misma figura están representados los resultados obtenidos para el ácido lipoico, se observa que se ve afectada la producción del ácido úrico y lo que parece un efecto atrapador del anión no es más que la disminución de la actividad de la xantina oxidasa. Para discernir si este efecto se debe al ácido lipoico o a su vehículo se examinó el efecto del metanol sobre el ensayo (Figura 14 panel C). Las concentraciones graficadas de metanol son las mismas presentes en el ensayo de ácido lipoico. Lo que se observa es que desde la concentración más baja (0.24 M) ya hay una disminución significativa en la producción de ácido úrico y por lo tanto del  $O_2^{\cdot-}$ . El metanol afecta al ensayo, es por ello que, lo observado con el ácido lipoico se debe a su vehículo y no se puede asegurar que éste no sea atrapador de  $O_2^{\cdot-}$ . Simplemente con esta metodología no se puede determinar si tiene capacidad de atrapamiento

sobre esta ERO, se tendría que utilizar otra técnica de análisis para medir el  $O_2^{\cdot-}$  en la que el metanol no interfiera o buscar otro vehículo para el ácido lipoico que no afecte este ensayo.

En el panel D de la figura 14 se muestra que el ácido ascórbico atrapa alrededor del 35% de  $O_2^{\cdot-}$  a 1 mM sin que disminuya la producción de ácido úrico. A partir de 3 mM disminuye hasta 25%, pero no disminuye proporcionalmente la producción del  $O_2^{\cdot-}$ .

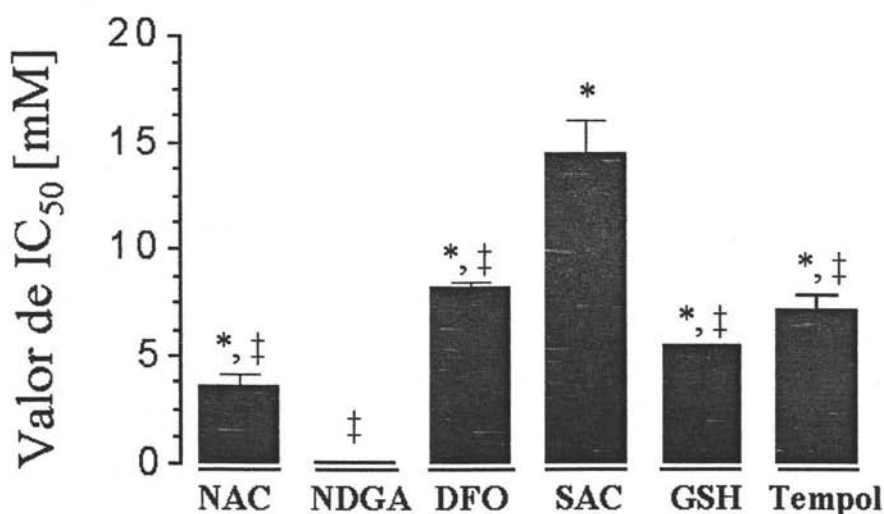


**Figura 14.** Efecto del manitol (A), ácido lipoico (B), metanol (C) y ácido ascórbico (D) sobre la formación de  $O_2^{\cdot-}$  medida como la reducción del NBT (■). También se presenta la producción del ácido úrico (□). Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 4-8. \* $p < 0.001$  vs 0 mM.

El NDGA tiene la mejor capacidad de atrapar  $O_2^{\cdot-}$  en comparación con el resto de los antioxidantes evaluados debido a que alcanza casi el 100% de atrapamiento en una concentración muy baja. El único antioxidante que alcanza el 100% de atrapamiento es el GSH, pero a una concentración

de casi 250 veces mayor a la del NDGA. En las condiciones utilizadas el tempol apenas alcanza el 50% de atrapamiento. De los antioxidantes evaluados, la SAC tiene la más baja capacidad de atrapar  $O_2^{\cdot-}$  a una concentración de 50 mM alcanza el 70% de atrapamiento, es decir que se requiere de 1,000 veces más la concentración de la SAC para obtener el mismo efecto que el NDGA. Dicha comparación se puede observar en la figura 15, donde están representados gráficamente los valores de  $IC_{50}$ .

### Capacidad de los antioxidantes para atrapar $O_2^{\cdot-}$



**Figura 15.** Se muestra los valores de  $IC_{50}$  [mM] para cada antioxidante evaluado como atrapador de  $O_2^{\cdot-}$ . El valor de  $IC_{50}$  esta representado como media  $\pm$  EE. Todos los compuestos fueron comparados contra el NDGA (\* $p < 0.001$ ), y contra la SAC ( $^{\dagger}p < 0.001$ ).

En la tabla 3 se muestran los valores de  $IC_{50}$  de los antioxidantes evaluados que atrapan  $O_2^{\cdot-}$ . El NDGA tiene el  $IC_{50}$  más bajo (0.015 mM) y por lo tanto es el mejor atrapador de anión superóxido. Después del NDGA, la NAC presenta la mejor capacidad de atrapamiento con un  $IC_{50}$  de 3.6 mM sin embargo, este valor es 243 veces mayor al del NDGA. De los antioxidantes evaluados la SAC presenta la más baja capacidad de atrapamiento con un  $IC_{50}$  de 14.5 mM, este valor es 966 veces mayor al del

NDGA. Se encontró que el IC<sub>50</sub> del NDGA y de la SAC son diferentes de los demás antioxidantes estudiados.

**Tabla 3.** Valores de IC<sub>50</sub> [mM] de los compuestos que tienen capacidad de atrapar anión superóxido.

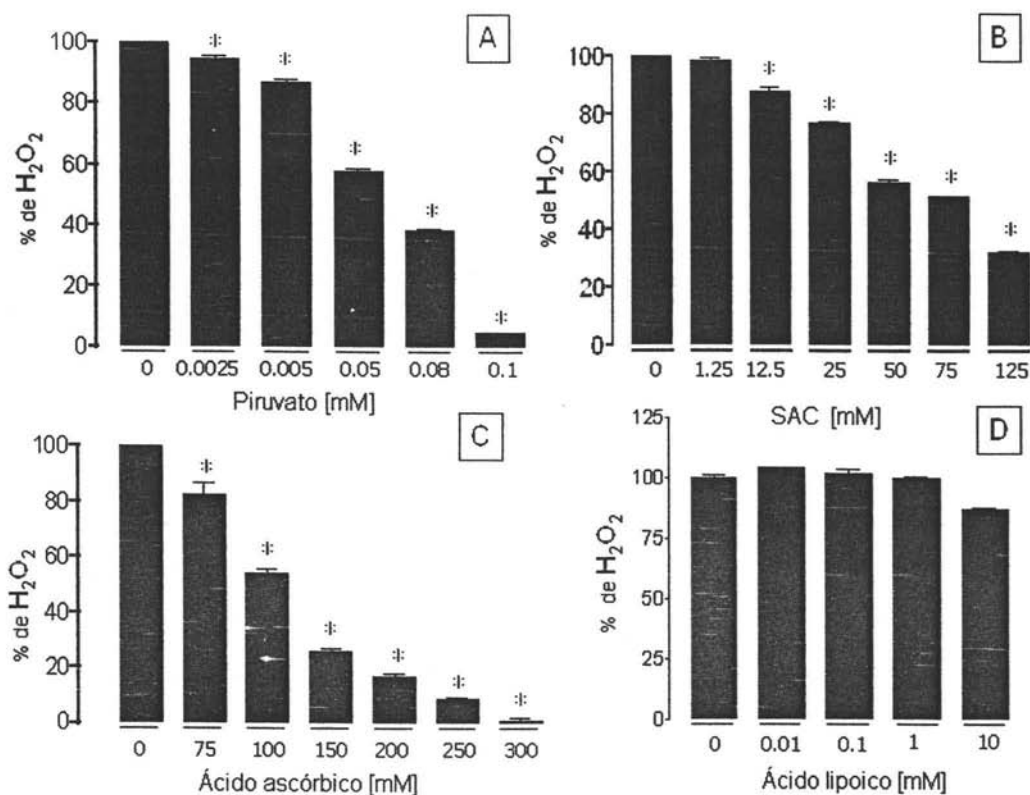
Compuesto	IC <sub>50</sub> [mM]
NDGA	0.015 ± 0.001 ‡ n = 7
NAC	3.6 ± 0.48 * ‡ n = 5
GSH	5.4 ± 0.97 * ‡ n = 8
Tempol	7.1 ± 0.78 * ‡ n = 5
DFO	8.2 ± 0.35 * ‡ n = 11
SAC	14.5 ± 1.67 * n = 4

El valor de IC<sub>50</sub> esta representado como media ± EE. Todos los compuestos fueron comparados contra el NDGA (\*p < 0.001), y contra la SAC (‡p < 0.001).

## 6.2 Peróxido de hidrógeno.

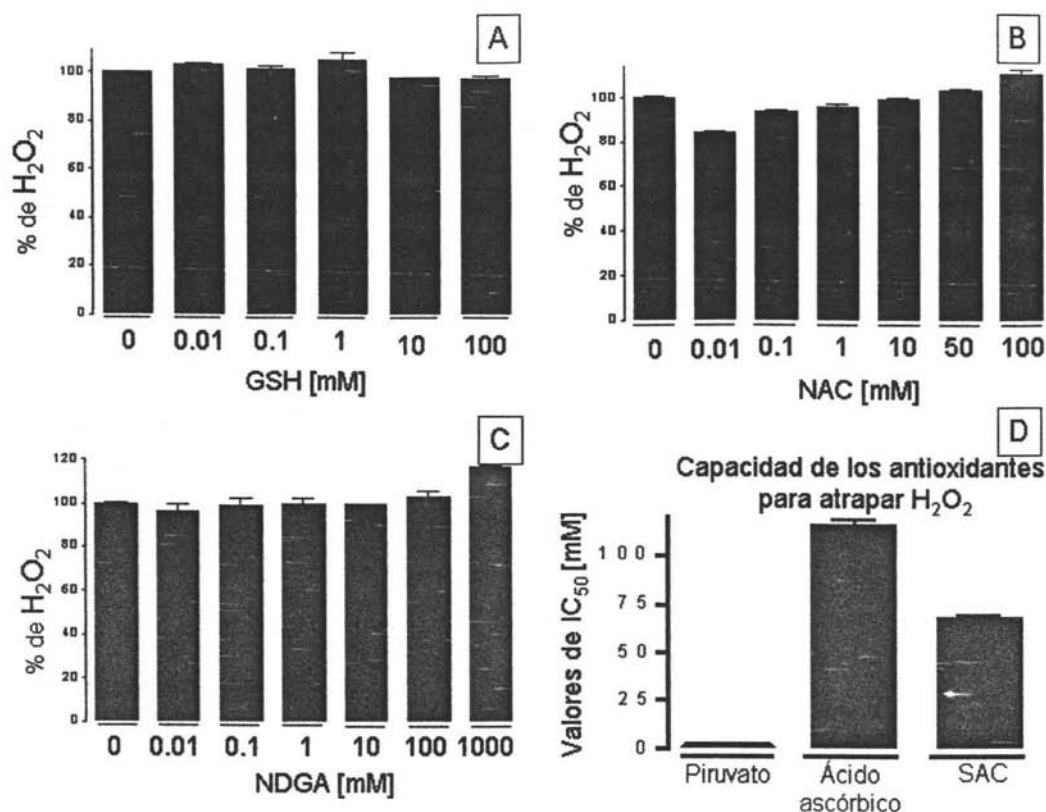
En la figura 16 se observa que el mejor atrapador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el piruvato de sodio (panel A), alcanza aproximadamente el 95% de atrapamiento a 0.1 mM. Se usaron concentraciones de piruvato más elevadas pero la magnitud del efecto ya no cambió.

En el panel B se observa que la SAC también atrapa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alcanza aproximadamente el 70% de atrapamiento a 125 mM. En el ensayo no se pudo usar concentraciones más elevadas de SAC debido a su baja solubilidad. En el panel C se puede observar que el ácido ascórbico también puede atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> llegando al 100% de atrapamiento en 300 mM, presenta un comportamiento de concentración-respuesta. En el panel D se observa que el ácido lipoico no atrapa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las concentraciones evaluadas en este ensayo, la máxima utilizada fue 10 mM pues concentraciones más elevadas interfieren en el ensayo.



**Figura 16.** Efecto del piruvato (A), la SAC (B), el ácido ascórbico (C) y el ácido lipoico (D) sobre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos están expresados como media ± EE. \*p < 0.001 vs 0 mM. n = 6.

En la figura 17 se muestran los antioxidantes evaluados que no tienen capacidad de atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El GSH (panel A), la NAC (panel B) y el NDGA (panel C) fueron evaluados utilizando concentraciones elevadas de cada uno de estos compuestos sin embargo, no tuvieron efecto sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el panel D se muestra una representación gráfica de los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para esta ERO. Se aprecia de manera más simple la gran diferencia en la magnitud del valor obtenido para el piruvato en comparación del ácido ascórbico y la SAC.



**Figura 17.** Efecto del GSH (A), la NAC (B) y el NDGA (C) sobre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 6. \*p < 0.001 vs 0 mM. En el panel D están presentados los valores de IC<sub>50</sub>.

En la tabla 4 se presentan los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos de estos experimentos. Se puede observar que el mejor atrapador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el piruvato de sodio (IC<sub>50</sub> = 0.032 mM). La SAC es el antioxidante de mediana capacidad para atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un valor de IC<sub>50</sub> de 68 mM, éste es más de 2,000 veces mayor que el valor del piruvato. El ácido ascórbico es el que presenta la más baja capacidad de atrapamiento debido a que su IC<sub>50</sub> de 115 mM es alrededor de 3,500 veces mayor al del piruvato. La SAC y el ácido ascórbico fueron comparados contra el piruvato, ambos resultaron diferentes. Además de estos antioxidantes se evaluó: el ácido lipoico, el GSH, la NAC y el NDGA, de los cuales ninguno tuvo efecto sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Tabla 4.** Valor de IC<sub>50</sub> [mM] del compuesto que tiene capacidad de atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

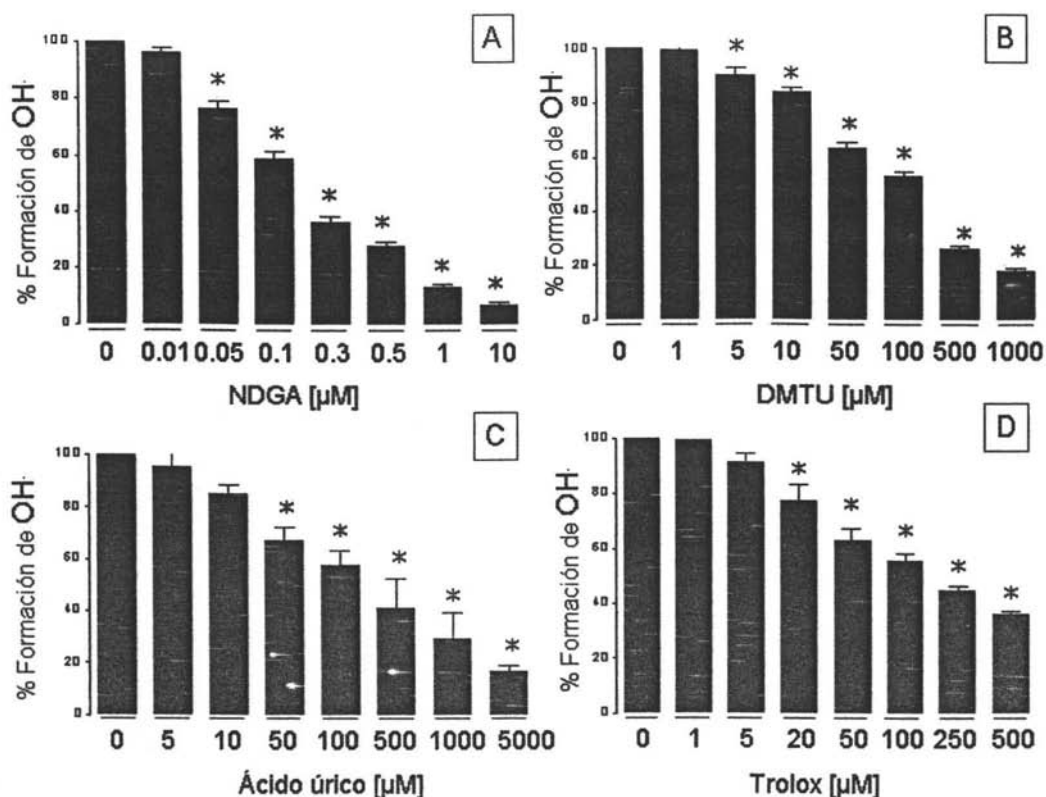
Compuesto	IC <sub>50</sub> [mM]
Piruvato	0.032 ± 0.001* n = 3
SAC	68 ± 1.92 n = 3
Ácido ascórbico	115 ± 3.89* n = 6

El valor de IC<sub>50</sub> esta representado como media ± EE. Todos los compuestos fueron comparados contra la SAC  
\*p < 0.001.

### 6.3 Radical hidroxilo

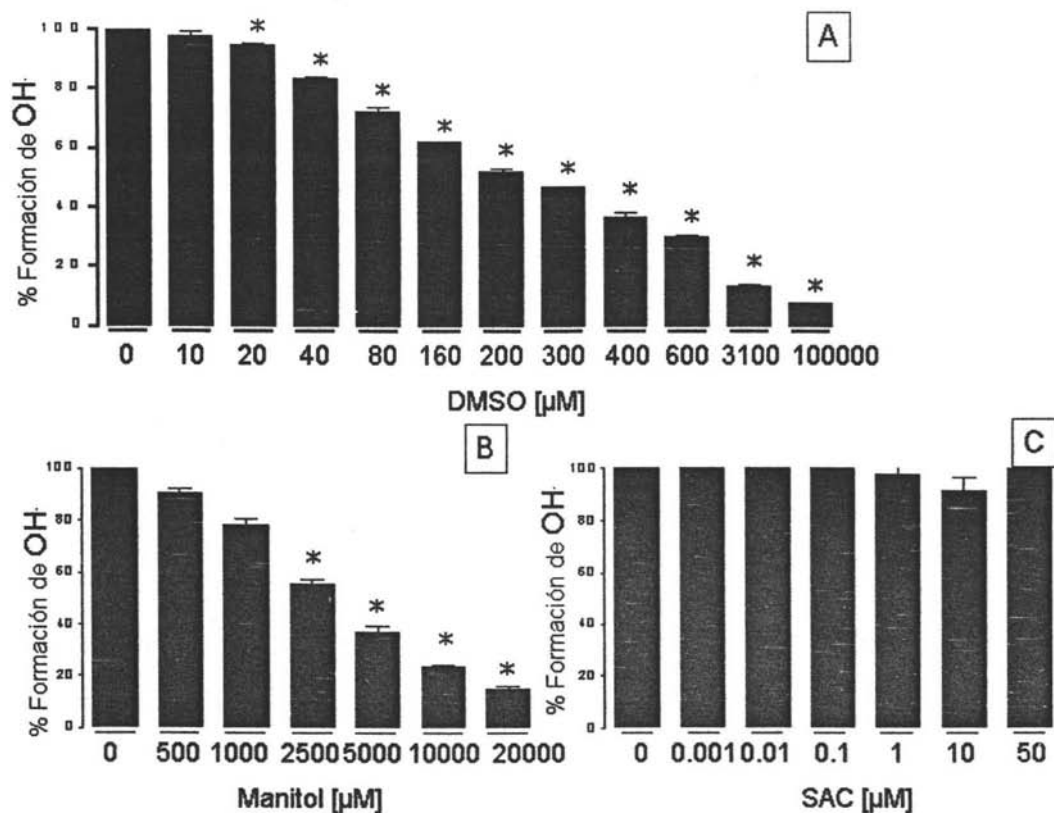
En la figura 18 se puede observar que los cuatro antioxidantes pueden atrapar OH<sup>•</sup> pero ninguno inhibió por completo la formación del OH<sup>•</sup> y todos muestran un comportamiento concentración-respuesta. En el panel A se observa que el NDGA alcanza el 90% de atrapamiento a 10 μM, en el panel B el DMTU alcanza aproximadamente el 80% de atrapamiento a 1,000 μM, el ácido úrico (panel C) alcanza el 80% a 5,000 μM y en el panel D se observa que el trolox alcanza el 65% a 500 μM.

Para el NDGA y el trolox se usaron concentraciones más altas en los ensayos pensando que pudieran presentar una mayor capacidad atrapadora sobre OH<sup>•</sup> (datos no mostrados), pero el efecto es el mismo a la concentración más alta mostrada en cada caso.



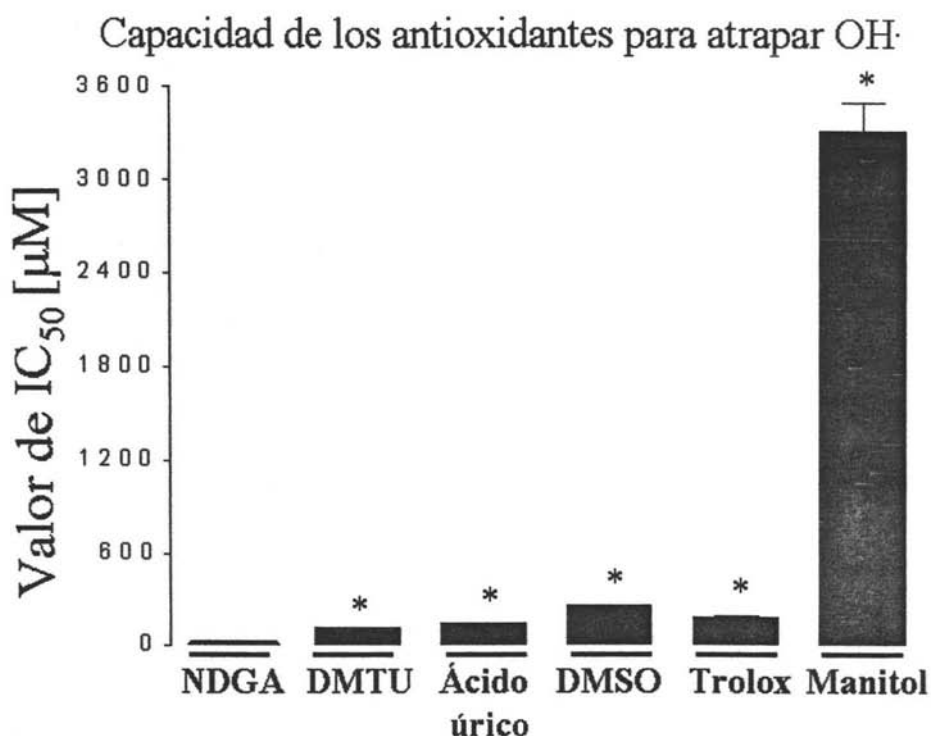
**Figura 18.** Efecto del NDGA (A), del DMTU (B), el ácido úrico (C) y el trolox (D) sobre la generación de OH·. Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 5-6. \*p < 0.001 vs 0  $\mu$ M.

En los paneles A y B de la figura 19 se puede observar que el DMSO y el manitol muestran un comportamiento concentración-respuesta atrapando OH·. Ninguno de los dos atrapa al 100% el OH· formado. El DMSO alcanza el 90% de atrapamiento a 100 mM y el manitol alcanza el 85% a 20 mM. La SAC (panel C) fue el único antioxidante que no mostró capacidad de atrapar OH· bajo las condiciones establecidas del método. El DMSO es el vehículo del NDGA y aunque muestra capacidad de atrapamiento se puede observar que el NDGA alcanza el 90% de atrapamiento a 10  $\mu$ M, mientras que el DMSO no muestra capacidad de atrapar a la misma concentración.



**Figura 19.** Efecto del DMSO (A), el manitol (B) y la SAC (C) sobre la generación de  $\text{OH}^\cdot$ . Los datos están expresados como media  $\pm$  EE.  $n = 5-6$ . \* $p < 0.001$  vs  $0 \mu\text{M}$ .

En la figura 20 se puede observar que el mejor atrapador de  $\text{OH}^\cdot$  es el NDGA y que muy por encima de éste se encuentra el valor del manitol, el resto de los antioxidantes mostraron un comportamiento y una capacidad de atrapamiento de  $\text{OH}^\cdot$  similares.



**Figura 20.** Se muestra el valor de IC<sub>50</sub> de los antioxidantes que si atrapan OH·. Los datos están expresados como media ± EE. n = 5-6. Todos los compuestos fueron comparados contra el NDGA (\*p < 0.001).

Los datos mostrados en la tabla 5 confirman que el NDGA es el mejor antioxidante con capacidad de atrapar OH· bajo estas condiciones. Se requiere de más de 22,000 veces la cantidad de manitol para obtener el mismo efecto provocado por el NDGA. Comparado el valor de IC<sub>50</sub> del NDGA con el resto de los antioxidantes, se encontró que todos son diferentes.

**Tabla 5.** Valores de IC<sub>50</sub> [μM] de los compuestos que tienen capacidad de atrapar OH·

Compuesto	IC <sub>50</sub> [μM]
NDGA	0.15 ± 0.015 n = 5
DMTU	106 ± 9.7 * n = 5
Ácido úrico	134 ± 12 * n = 5
Trolox	174 ± 16 * n = 6
DMSO	247 ± 14 * n = 6
Manitol	3304 ± 197 * n = 6

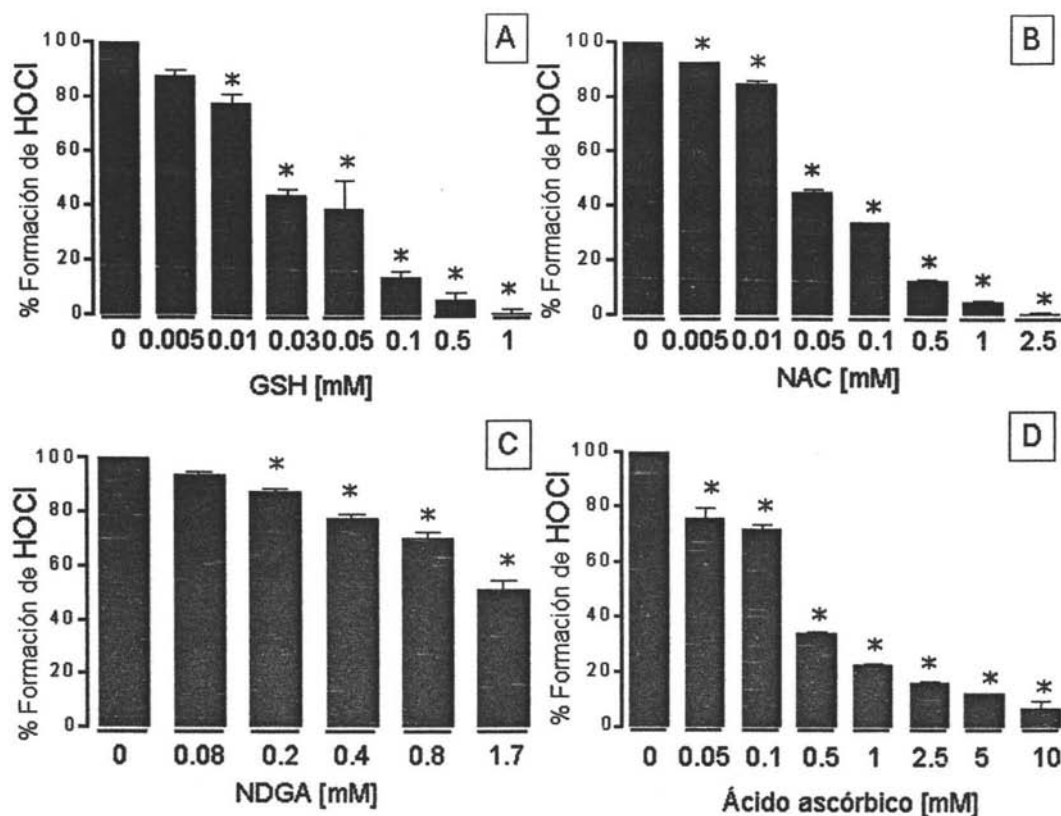
El valor de IC<sub>50</sub> está representado como media ± EE . Todos fueron comparados estadísticamente contra el NDGA \*p < 0.001.

#### 6.4 Ácido hipocloroso

En la figura 21 se puede observar que el GSH (panel A), el NAC (panel B), el NDGA (panel C) y el ácido ascórbico (panel D) si atrapan HOCl y presentan un comportamiento de concentración-respuesta.

El GSH alcanza el 100% de atrapamiento a 1 mM, el NAC llega al 100% en 2.5 mM. El ácido ascórbico alcanza el 90% de atrapamiento a 10 mM.

El NDGA no supera el 50% de atrapamiento del HOCl, pero hasta la concentración más alta evaluada se puede observar un comportamiento concentración-respuesta. Con los datos obtenidos se calculó el valor de IC<sub>50</sub> teórico. No se evaluaron concentraciones más altas del NDGA porque interfieren en el ensayo.

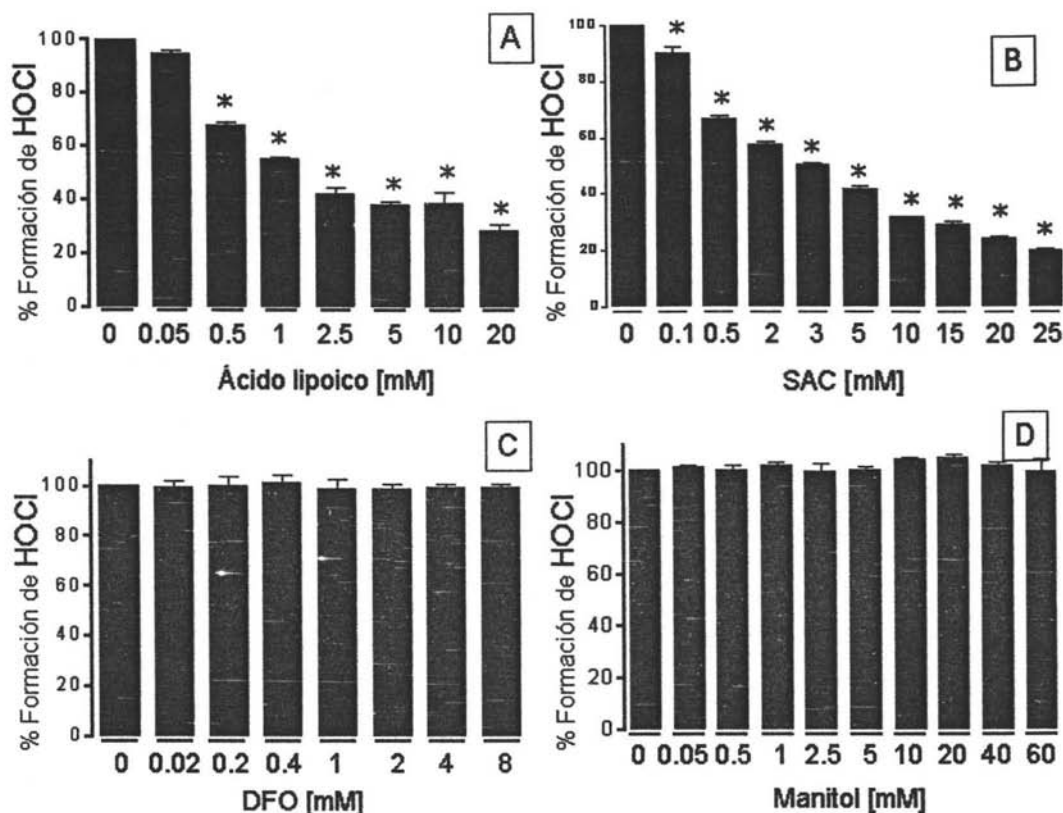


**Figura 22.** Efecto del GSH (A), la NAC (B), el NDGA (C) y el ácido ascórbico (D) sobre la concentración de HOCl. Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 4. \*p < 0.001 vs 0 mM.

En la figura 23 se puede observar que el ácido lipoico (panel A) y la SAC (panel B) también presentan un comportamiento de concentración-respuesta al atrapar HOCl. El ácido lipoico alcanza 70% de atrapamiento a 20 mM, a concentraciones más altas del ácido lipoico se interfiere con el ensayo. Se evaluó al metanol (vehículo del ácido lipoico), éste no afecta el ensayo. La SAC alcanza el 75% de atrapamiento a 25 mM, no se pudieron evaluar concentraciones más altas de SAC debido a su baja solubilidad. Ninguno de los dos atrapa al 100% el HOCl.

En los paneles C y D de la figura 23 están representados los antioxidantes DFO y manitol que no atrapan HOCl. Se usaron concentraciones más elevadas pero los datos no fueron representados porque el comportamiento es el mismo a las concentraciones indicadas en las gráficas.

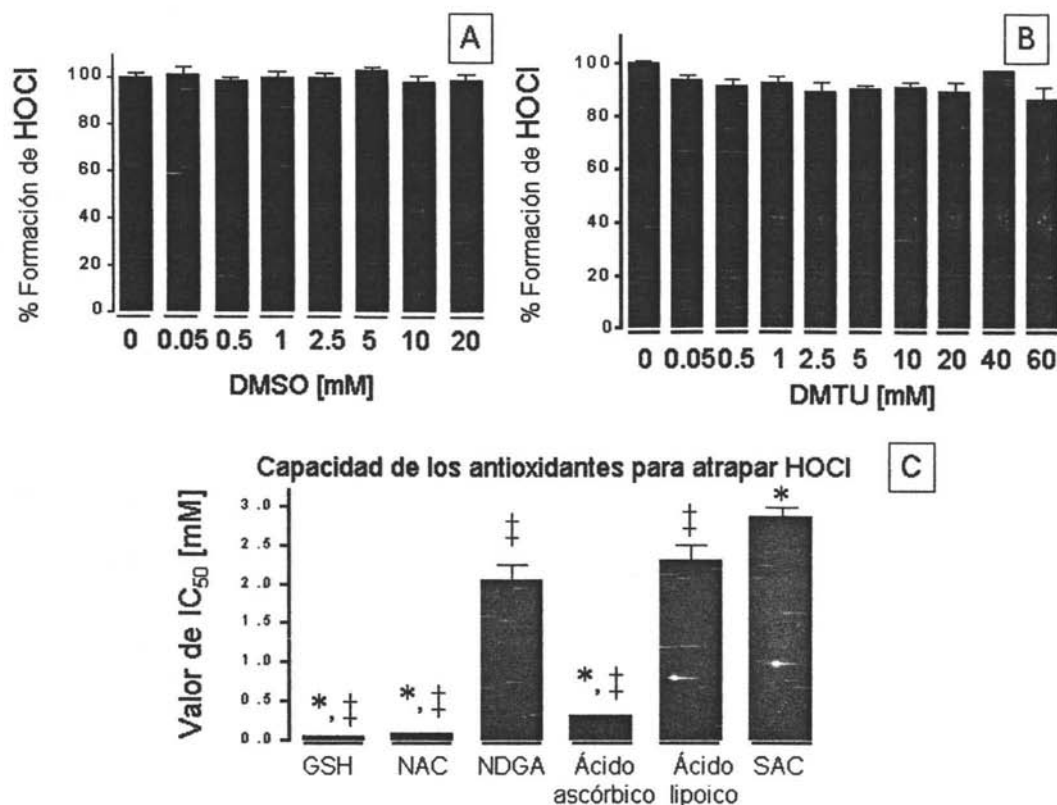
El mejor de los antioxidantes evaluados es el GSH alcanzando el total de atrapamiento del HOCl a 1 mM. La NAC también atrapa por completo al HOCl en una concentración de 2.5 mM.



**Figura 23.** Efecto del ácido lipoico (A), la SAC (B), el DFO (C) y el manitol (D) sobre la concentración del HOCl. Los datos están expresados como media  $\pm$  EE.  $n = 4-8$ . \* $p < 0.001$  vs 0 mM.

En la figura 24 se muestra que tanto el DMSO mostrado en el panel A así como el DMTU mostrado en el panel B, no tienen capacidad de atrapar HOCl en las concentraciones usadas y bajo las condiciones del método ya establecidas.

En el panel C de la figura 24 están representados los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para los antioxidantes atrapadores de HOCl, se observa que el valor de  $IC_{50}$  del GSH y el de la NAC es muy parecido. Es menor la capacidad de atrapamiento sobre el HOCl del NDGA, el ácido lipoico y la SAC en comparación con la del GSH. El NDGA no rebasa el 50% de atrapamiento sobre el HOCl. Se usaron concentraciones más elevadas pero éstas interfieren en el ensayo.



**Figura 24.** Efecto del DMSO (A) y el DMTU (B) sobre el HOCl. Los datos están expresados como media  $\pm$  EE.  $n = 4-8$ . \* $p < 0.001$  vs 0 mM. En el panel C se muestran los valores de IC<sub>50</sub> de los antioxidantes que sí tuvieron efecto sobre el HOCl. Todos los compuestos fueron comparados contra el NDGA (\* $p < 0.001$ ), y contra la SAC ( $\ddagger p < 0.001$ ).

En la tabla 6 están representados los valores de IC<sub>50</sub> de los antioxidantes que atrapan HOCl. El IC<sub>50</sub> del GSH es 0.026 mM, para la NAC es de 0.061 mM, la SAC presentó la más baja capacidad de atrapamiento de los antioxidantes evaluados con un IC<sub>50</sub> de 2.85 mM. Se requiere aproximadamente de 110 veces más de SAC para obtener el mismo efecto atrapador del GSH correspondiente a su IC<sub>50</sub>.

Todos los antioxidantes fueron comparados contra el NDGA y todos resultaron diferentes a excepción del ácido lipoico. De igual forma todos los antioxidantes fueron comparados contra la SAC y se encontró que todos son diferentes.



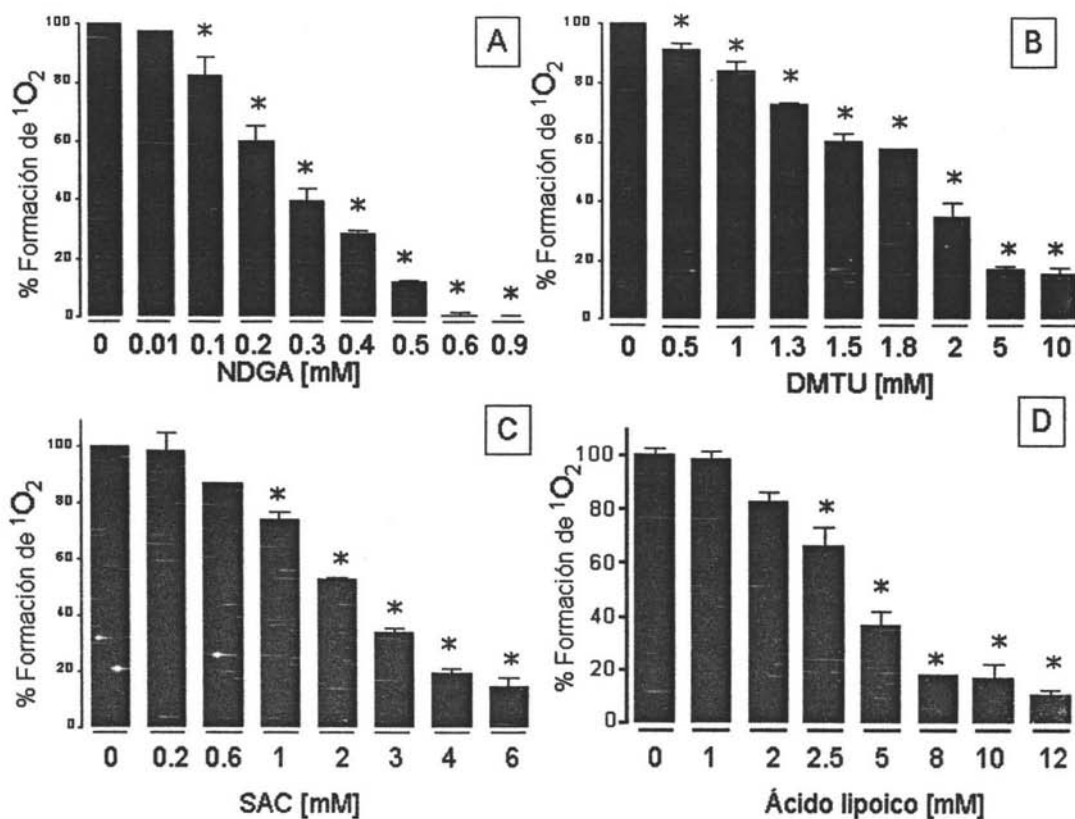
**Tabla 6.** Valores de IC<sub>50</sub> [mM] de los compuestos que tienen capacidad de atrapar HOCl

Compuesto	IC <sub>50</sub> [mM]
GSH	0.026 ± 0.002 * <sup>‡</sup> n = 4
NAC	0.061 ± 0.004 * <sup>‡</sup> n = 4
Ácido ascórbico	0.31 ± 0.029 * <sup>‡</sup> n = 4
NDGA	2.05 ± 0.204 <sup>‡</sup> n = 4
Ácido lipoico	2.3 ± 0.221 <sup>‡</sup> n = 4
SAC	2.9 ± 0.149 * n = 8

El valor de IC<sub>50</sub> está representado como media ± EE. Todos los valores fueron comparados estadísticamente contra el NDGA (\*p < 0.001) y contra la SAC (<sup>‡</sup>p < 0.001).

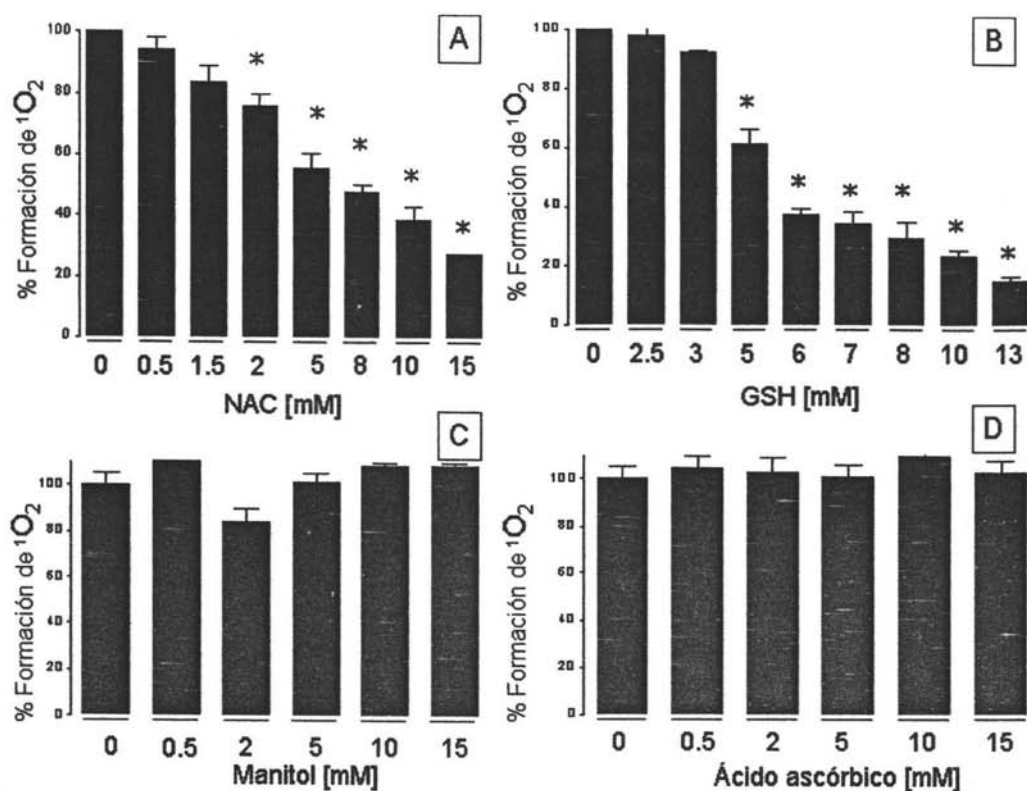
## 6.5 Singulete de oxígeno

En la figura 25 se observa que los cuatro antioxidantes atrapan <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y presentan comportamiento de concentración-respuesta. En el panel A se observa que el NDGA a 0.9 mM atrapa por completo el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formado. En el panel B el DMTU alcanza el 85% de atrapamiento de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a 10 mM, en el panel C se observa que la SAC alcanza el 85% de atrapamiento a 6 mM y en el panel D que el ácido lipoico alcanza el 90% de atrapamiento a 12 mM.



**Figura 25.** Efecto del NDGA (A), el DMTU (B), la SAC (C) y el ácido lipoico (D) sobre la formación de  $^1O_2$ . Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 4-6. \*p < 0.001 vs 0 mM.

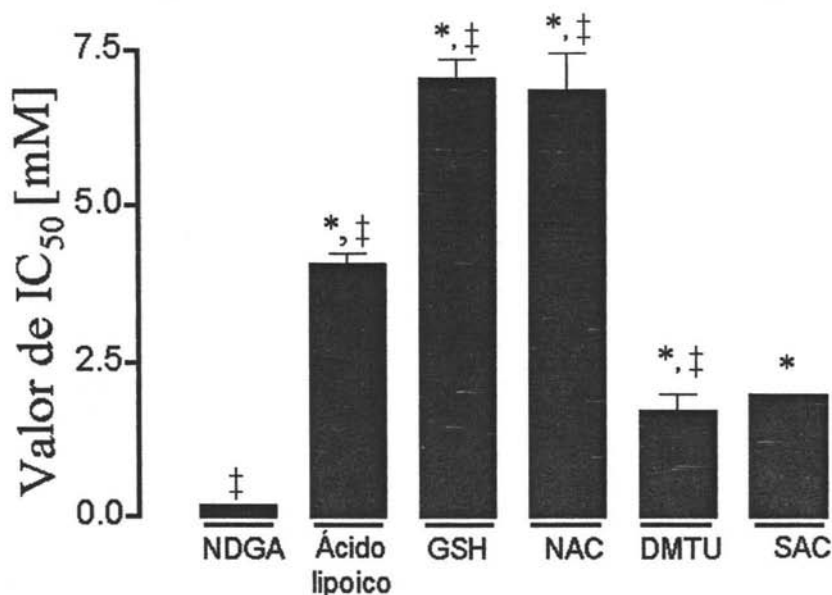
En la figura 26 se observa en el panel A que la NAC y en el panel B que el GSH tienen capacidad de atrapar  $^1O_2$  con comportamiento concentración-respuesta. Ninguno de los dos atrapa por completo el  $^1O_2$  formado. La NAC alcanza el 75% de atrapamiento a 15 mM, el GSH alcanza el 80% de atrapamiento a 13 mM. El manitol (panel C) y el ácido ascórbico (panel D) no presentan capacidad de atrapar  $^1O_2$ .



**Figura 26.** Efecto de la NAC (A), el GSH (B), el manitol (C) y el ácido ascórbico (D) sobre la formación del  $^1O_2$ . Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 4-6. \*p < 0.001 vs 0 mM.

En la figura 27 están representados los valores de  $IC_{50}$  de los antioxidantes que atrapan  $^1O_2$ . Se observa que el NDGA es el mejor atrapador de  $^1O_2$  en las condiciones ya descritas. Después de éste el DMTU y la SAC presentan la mejor capacidad atrapadora y finalmente el ácido lipoico, el GSH y la SAC presentan una capacidad atrapadora de  $^1O_2$  muy débil.

## Capacidad de los antioxidantes para atrapar $^1\text{O}_2$



**Figura 27.** Se muestran los valores de IC<sub>50</sub> de los antioxidantes que atrapan  $^1\text{O}_2$ . Los datos están expresados como media  $\pm$  EE. n = 4-6. Todos los compuestos fueron comparados contra el NDGA (\*p < 0.001), y contra la SAC (†p < 0.001).

Los valores representados en la tabla 7 muestran que el mejor atrapador de  $^1\text{O}_2$  es el NDGA con un IC<sub>50</sub> = 0.152 mM. El valor de IC<sub>50</sub> de la SAC es 13 veces mayor al del NDGA. De los antioxidantes evaluados el de menor capacidad para atrapar  $^1\text{O}_2$  es el GSH del cual se requieren 46 veces más para obtener el mismo efecto que el NDGA. Se comparó el valor de IC<sub>50</sub> del resto de los antioxidantes contra el NDGA, encontrándose que todos son diferentes. Se hizo lo mismo por separado con SAC encontrándose que todos son diferentes a éste.

**Tabla 7.** Valores de IC<sub>50</sub> [mM] de los compuestos que tienen capacidad de atrapar <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

Compuesto	IC <sub>50</sub> [mM]
NDGA	0.152 ± 0.019 ‡ n = 6
DMTU	1.689 ± 0.289 * ‡ n = 5
SAC	1.933 ± 0.271 * n = 4
Ácido lipoico	4.067 ± 0.174 * ‡ n = 6
NAC	6.844 ± 0.585 * ‡ n = 6
GSH	7.023 ± 0.323 * ‡ n = 6

El valor de IC<sub>50</sub> esta representado como media ± EE. Todos fueron comparados estadísticamente contra el NDGA (\*p < 0.001) y contra la SAC (‡p < 0.001).

En la tabla 8 podemos observar que la SAC es capaz de atrapar HOCl, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>, los datos obtenidos en este trabajo coinciden con lo ya reportado por Kim *et al.*, 2001 en cuanto a que la SAC puede atrapar O<sub>2</sub><sup>-</sup> y con Ho *et al.*, 2001 de que atrapa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no en cuanto a que atrapa OH<sup>-</sup> (Kim *et al.*, 2001).

Al comparar la capacidad del resto de los antioxidantes contra la del NDGA, se observó que el NDGA es el mejor atrapador en todos los casos a excepción del HOCl, ya que en todos los ensayos el valor de IC<sub>50</sub> obtenido para NDGA fue menor al resto de los antioxidantes.

En el ensayo de O<sub>2</sub><sup>-</sup> la SAC resultó ser el peor atrapador, lo mismo ocurrió para el HOCl, solo para <sup>1</sup>O<sub>2</sub> resultó de mediana capacidad de atrapamiento. Es de mediana capacidad para atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.su capacidad es menor a la mostrada por el piruvato pero mayor a la del ácido ascórbico.

La forma en que algunos compuestos pueden efectuar su efecto antioxidante en sistemas vivos puede ser atrapando directamente las ERO, aumentando la expresión de las enzimas antioxidantes, aumentando la concentración de antioxidantes no enzimáticos (como el GSH), inhibiendo enzimas que producen las ERO y/o quelando metales. Sin embargo, en este trabajo solo se estudió *in vitro* la capacidad de los antioxidantes para atrapar directamente las ERO y de esta forma se puede explicar en

parte la capacidad antioxidante de los compuestos evaluados. No podemos descartar la posibilidad de que *in vivo* puedan ejercer algún otro de los mecanismos antioxidantes ya mencionados, para ello tendrían que ser evaluados en los modelos experimentales adecuados. Ya se observó que el NDGA es un antioxidante potente *in vitro* y que ejerce ese efecto en muy bajas concentraciones. Estos resultados pueden conducir a nuevos experimentos en los que podría evaluarse su efecto sobre el estrés oxidativo *in vivo* pensando en la posibilidad de que puede prevenir los daños ocasionados por éste.

La tabla 8 presenta para cada especie reactiva los compuestos que fueron evaluados y que presentan o no actividad antioxidante.

**Tabla 8.** Resumen de los antioxidantes evaluados que presentan y no presentan actividad atrapadora de cada ERO medida.

ESPECIE REACTIVA DE OXÍGENO					
Compuestos con capacidad atrapadora	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OH <sup>•</sup>	HOCl	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
		DFO GSH NAC NDGA SAC Tempol	Piruvato SAC Ácido ascórbico	Ácido úrico DMSO DMTU NDGA Manitol Trolox	Ácido ascórbico Ácido lipoico GSH NAC NDGA SAC
Compuesto sin capacidad atrapadora	Ácido ascórbico Ácido lipoico DMSO DMTU Manitol Metanol	Ácido lipoico GSH NAC NDGA Metanol	SAC	DFO DMSO DMTU Manitol Metanol	Ácido ascórbico Ácido úrico DMSO Manitol Metanol

## 7. RESUMEN DE RESULTADOS

- El NDGA es capaz de atrapar  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $^1\text{O}_2$  y  $\text{HOCl}$ , pero no atrapa  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- En comparación con los antioxidantes evaluados, el NDGA resultó ser el mejor atrapador para tres de las cinco especies reactivas evaluadas ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $^1\text{O}_2$ ).
- La SAC no atrapa  $\text{OH}\cdot$ . tiene la capacidad de atrapar  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$  y  $\text{HOCl}$  bajo las condiciones establecidas en este trabajo.
- De todos los compuestos evaluados la SAC presenta la menor capacidad para atrapar  $\text{HOCl}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .
- El mejor atrapador de  $\text{HOCl}$  es el GSH y el mejor atrapador de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el piruvato.
- Comparando la capacidad de atrapamiento del NDGA y la SAC sobre las mismas ERO, el NDGA resultó ser el mejor.

## 8. CONCLUSIONES

- La capacidad antioxidante del NDGA puede explicarse, al menos en parte por su capacidad para atrapar directamente  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $HOCl$  y  $^1O_2$ .
- La SAC puede atrapar  $^1O_2$  y  $HOCl$ , además de las ya reportadas.
- Aunque la SAC mostró actividad antioxidante, su capacidad estuvo por debajo de los antioxidantes conocidos.
- *In vitro* el NDGA es mejor antioxidante que la SAC.
- Se observó que la potencia antioxidante *in vitro* de la SAC es mucho menor a la del NDGA. Se sabe que la SAC tiene una importante actividad como antioxidante *in vivo*, entonces podría esperarse que también *in vivo* sea mayor la potencia del NDGA en comparación con la de este compuesto.



## 9. REFERENCIAS

Anesini C, Turner S, Borda E, Ferraro G, Coussio J. **2004**. Effect of *Larrea divaricata* Cav. Extract and nordihydroguaiaretic acid upon peroxidase secretion in rat submandibular glands. *Pharmacol Res.* 49:441-448.

Ansar S, Iqbal M, Athar M. **1999**. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrosyltriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis.* 20: 599-606.

Arteaga S, Andrade-Cetto A y Cárdenas R. **2005**. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol.* 98: 231-239.

Aruoma O, Spenser J, Warren D, Jner P, Butler J, Halliwell B. **1997**. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry.* 60: 149-156.

Ávila-Lombardo R. **2004**. Actividad antioxidante *in vitro* de preparaciones comerciales y extractos de ajo. Tesis de Licenciatura. Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Págs. 7, 9-10, 16.

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. **2003**. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans.* 31:1441-1444.

Bonnefont-Rousselot D. **2004**. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol.* 3:41-52.

Carbajal-Cano RC. **2002**. Sistema antioxidante enzimático renal en la nefrotoxicidad por dicromato de potasio. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Págs. 8, 13-14.

Cohen-Kerem R, Koren G. **2003**. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol.* 25:1-9.

Craig J, Callahan M, Huang RC, DeLucia AL. **2000**. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 47: 19-28.

Chaible LM, Alba-Loureiro TC, Maia AA, Pugine SM, Valle CR, Pithon-Curi TC, Curi R, De Melo MP. **2005**. Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. *Vet Parasitol.* 20:121-129

- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. **2003**. Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III. *J Biol Chem*. 38:39027-36031.
- Cheng JS, Jan CR. **2002**. Effect of nordihydroguaiaretic acid on intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations in hepatocytes. *Toxicol in Vitro*. 16: 485-490.
- Fujimoto N, Kohta R, Kitamura S, Honda H. **2004**. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). *Life Sci*. 74:1417-1425.
- Glaser CB, Yamin G, Uversky VN, Fink AL. **2005**. Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 17:157-169.
- Goodman T, Grice HC, Becking GC, Salem FA. **1970**. A cystic nephropathy induced by nordihydroguaiaretic acid in the rat. Light and electron microscopic investigations. *Lab Invest*. 23:93-107.
- Halliwell B. **1990**. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 9:1-32.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed. Oxford, 3era. ed. Nueva York, EUA, 1999. págs. 294-295, 327-328, 335-336, 342-343.
- Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. **1987**. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*. 165:215-219.
- Harper A, Kerr DJ, Gescher A, Chipman JK. **1999**. Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radic Res*. 31:149-160.
- Ho SE, Ide N, Lau BH. **2001**. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine*. 8:39-46.
- Hofmanova J, Soucek K, Pachernik J, Kovarikova M, Hoferova Z, Minksova K, Netikova J, Kozubik A. **2002**. Lipoxygenase inhibitors induce arrest of tumor cells in S-phase of the cell cycle. *Neoplasma*. 49:362-367.
- Huang RC, Li Y, Giza PE, Gnable JN, Abd-Elazem IS, King KY, Hwu JR. **2003**. Novel antiviral agent tetraglycylated nordihydroguaiaretic acid hydrochloride as a host-dependent viral inhibitor. *Antiviral Res*. 58: 57-64.
- Hwu JR, Tseng WN, Gnable J, Giza P, Huang RC. **1998**. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 1. Synthesis, structure identification, and inhibition of tat-regulated HIV transactivation. *J Med Chem*. 41:2994-3000.

Iino K, Iwase M, Sonoki K, Yoshinari M, Iida M. **2005**. Combination treatment of vitamin C and desferrioxamine suppresses glomerular superoxide and prostaglandin E production in diabetic rats. *Diabetes Obes Metab.* 7:106-119.

Johansen SJ, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. **2005**. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 4:5

Kahl R, Kampkotter A, Watjen W, Chovolou Y. **2004**. Antioxidant enzymes and apoptosis. *Drug Metab Rev.* 36:747-762.

Kawamoto EM, Munhoz CD, Glezer I, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R, Gorjao R, Curi R, Scavone C, Marcourakis T. **2005**. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 26:857-864.

Kawashima S. **2004**. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium.* 11: 99-107.

Kelly MR, Xu J, Alexander KE, Loo G. **2001**. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 485:309-318.

Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. **2001**. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med.* 30: 747-756.

Koyama H, Geddes DM. **1998**. Genes, oxidative stress, and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 53:10-14.

La E, Kern JC, Atarod EB, Kehrer JP. **2003**. Fatty acid release and oxidation are factors in lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis. *Toxicol Lett.* 138:193-203.

Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT. **2002**. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol.* 40: 1701-1708.

Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. **2003a**. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med.* 35:317-324.

Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J. **2003b**. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 73:2543-2556.

Maldonado-Jiménez PD. **2004**. La S-alilcisteína y el extracto de ajo envejecido atenúan la nefropatía y el estrés oxidativo inducidos por gentamicina en ratas. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México D.F. págs. 11-12, 25, 76.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 17:24-38.

McDonald RW, Bunjobpon W, Liu T, Fessler S, Pardo OE, Freer IK, Glaser M, Seckl MJ, Robins DJ. 2001. Synthesis and anticancer activity of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and analogues. *Anticancer Drug Des.* 16: 261-270.

Miura Y. 2004. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res.* 45:357-372.

Nishimura K, Tsumagari H, Setoyama T, Morioka A, Lu S, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K. 2004. Prostaglandin F(2alpha) is protective for apoptosis stimulated synergistically with 12-O-tetradecanoyl phorbol-beta-acetate and nordihydroguaiaretic acid in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochim Biophys Acta.* 1682:102-111.

Ohyama K, Yuan B, Bessho T, Yamakawa T. 2001. Progressive apoptosis in chorion leave trophoblast cells of human fetal membrane tissues during in vitro incubation is suppressed by antioxidative reagents. *Eur J Biochem.* 268:6182-6189.

Pedraza-Chaverrí J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernández-Pando R. 2004. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clin Pharmacol.* 4:5.

Pérez-Severiano F, Rodríguez-Perez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A. 2004. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int.* 45:1175-1183.

Rauen U, Viebahn R, Lauchart W, de Groot H. 1994. The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery. *Hepatogastroenterology.* 41:333-336.

Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR. 2002. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol Chem.* 383:671-681.

Schultze-Mosgau MH, Dale IL, Gant TW, Chipman JK, Kerr DJ, Gescher A. 1998. Regulation of c-fos transcription by chemopreventive isoflavonoids and lignans in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Eur J Cancer.* 34:1425-1431.

Symons R, Gutteridge JMC. Free radicals and iron: chemistry, biology and medicine. Ed. Oxford University Press. New York, EUA, 1998. Págs 114-116, 119.

Violi F, Cangemi R, Sabatino G, Pignatelli P. **2004.** Vitamin E for the treatment of cardiovascular disease: is there a future? *Ann N Y Acad Sci.* 1031:292-304.

Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispe JR. **1996.** Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol.* 271:150-158.

Wertz K, Hunziker PB, Seifert N, Riss G, Neeb M, Steiner G, Hunziker W, Goralczyk R. **2005.** beta-carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways. *J Invest Dermatol.* 124:428-434.

West M, Mhatre M, Ceballos A, Floyd RA, Grammas P, Gabbita SP, Hamdheydari L, Mai T, Mou S, Pye QN, Stewart C, West S, Williamson KS, Zelman F, Hensley K. **2004.** The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. *J Neurochem.* 91:133-143.

Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. **2005.** Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol.* 11:1825-1828.