



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFECTO TÓXICO DE COMPUESTOS NATURALES
SOBRE LA VIABILIDAD DE MACRÓFAGOS
HUMANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ELOY EDURNE LÓPEZ PAZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SILVIA GUZMÁN BELTRÁN
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Gracias a la Facultad de Ciencias, y a todas las personas con las que conviví durante los últimos cinco años, en especial a los profesores y compañeros con los que tuve el placer de aprender.

Gracias al INER y a las personas que ahí trabajan, quienes siempre tuvieron un momento para ayudarme y que además me brindaron su amistad.

Gracias a la doctora Silvia Guzmán quien me enseñó como se trabaja en la ciencia y además siempre lo hizo con una sonrisa.

Gracias a mi familia, abuelos, tíos, primos y sobrinos por todo su cariño, apoyo y al empuje que me han dado por todo este tiempo.

Gracias a mis amigos por estar siempre conmigo y darle a estos años una alegría extra, son un amor, en especial los gangrenas y los amigos que hice durante la carrera.

Y en especial gracias a mis papás a quienes está dedicado este trabajo, por darme su confianza y apoyo, por darme consejos tan oportunos, por el cariño y amor. Gracias totales.

Contenido

Resumen	6
Introducción	7
Antecedentes	7
Ácido Nordihidroguayarático	9
N-Acetilcisteína	11
α -Mangostina	12
Modelos de Estudio	14
Macrófagos Derivados de Monocitos (MDM)	14
Macrófagos Derivados de la Línea Celular THP-1	14
Objetivos	15
Justificación	16
Hipótesis	16
Método	16
Diferenciación a macrófagos de células THP-1	16
Obtención de monocitos derivados a macrófagos (MDM)	17
Pruebas de toxicidad	18
Preparación de los stocks	18
Pruebas de toxicidad en M ϕ THP-1	19
Pruebas de toxicidad en MDM	19
Viabilidad celular por MTT	20
Análisis estadístico	20
Resultados	21
Resultados M ϕ THP-1	21
Resultados M ϕ THP-1 expuestos a NDGA	21
Resultados M ϕ THP-1 expuestos a α -Mangostina	22
Resultados M ϕ THP-1 expuestos a NAC	23

Resultados M ϕ THP-1 expuestos a DMSO	24
Resultados MDM	25
Resultados MDM expuestos a NDGA	25
Resultados MDM expuestos a NAC	26
Resultados MDM expuestos a -Mangostina	27
Resultados MDM expuestos a DMSO	28
Discusión	29
Bibliografía	32
Anexos	36

Abreviaturas

DMSO	Dimetil-sulfóxido
ERO	Especies reactivas de Oxígeno
G	Gravedad
IgE	Inmunoglobulina E
MDM	Macrófagos Derivados de Monocitos
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
M ϕ THP-1	Macrófagos derivados de células THP-1
NAC	N-Acetilcisteína
NDGA	Ácido Nordihidroguayarético
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ODM	Objetivos de Desarrollo del Milenio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Células mononucleares de sangre periférica)
PBS	Buffer Fosfato Salino
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SRAG	Síndrome Respiratorio Agudo Grave
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Resumen

Las enfermedades infecciosas han constituido una amenaza para la sociedad, y aunque la medicina se ha ocupado de las pandemias que atacaron durante el siglo XX, la resistencia a los agentes antimicrobianos y las coinfecciones han surgido como un problema de salud mundial.

En la actualidad, gran parte de la población mundial utiliza las plantas medicinales para el tratamiento de múltiples enfermedades (diabetes, bronquitis, tuberculosis, parasitos, varicela, quemaduras, infecciones estomacales, etc.), pues son consideradas seguras, sin embargo, los agentes fitoterapéuticos no han sido evaluados en interacciones con otros medicamentos.

Compuestos como la α Mangostina, el ácido nordihidroguayereútico (NDGA) o la N-Acetilcisteína, son compuestos que presentan actividades biológicas y son utilizados en la medicina tradicional, por lo que es necesario evaluar su efecto en células humanas.

Se utilizaron dos modelos celulares (MDMs y M ϕ THP-1), los cuales fueron expuestos a diferentes tratamientos con los tres compuestos durante un periodo de 72h. Los resultados fueron medidos como el porcentaje de células supervivientes después del tratamiento, mostrando que sólo el NDGA y la α Mangostina afectan a las células cuando se utilizan altas concentraciones, (8 y 15 μ g/mL y 15 y 20 μ g/mL respectivamente); mientras la NAC es tolerada a altas concentraciones. Por esta razón, se sugiere que los compuestos sean empleados como tratamiento preventivo, pues bajas concentraciones pueden proteger a las células de estrés oxidante o de una respuesta inmune exacerbada.

Introducción

Antecedentes

En términos históricos, las enfermedades infecciosas han constituido una amenaza muy grave para la sociedad. Durante la mayor parte del siglo XX, las pandemias se habían ya considerado amenazas del pasado; la medicina moderna se había ocupado para siempre de la peste, la viruela y otras catástrofes de carácter contagioso. No obstante, los cambios ambientales actuales han propiciado variaciones en la distribución geográfica de organismos en general y de parásitos en particular. La resistencia a los agentes antimicrobianos también se ha convertido en un grave problema mundial. Algunas infecciones, antes fáciles de tratar con antibióticos, representan ahora una grave amenaza para la salud a nivel mundial. Por lo tanto, en años recientes, las enfermedades infecciosas como la malaria, tuberculosis, VIH/SIDA, síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) y la posibilidad de bioterrorismo han provocado de nueva cuenta un gran efecto económico y de salud, en países desarrollados o en vías de desarrollo, lo cual indica que esta amenaza sigue presente (Montesinos-Lopez and Hernandez-Suarez, 2007)

La mayoría de las defunciones por enfermedades infecciosas (90%) son provocadas por un puñado de enfermedades (neumonía, tuberculosis, enfermedades diarreicas, paludismo, sarampión y el VIH/SIDA). En teoría, las estrategias de prevención, las vacunas, los antibióticos y los progresos científicos, debería controlar todas estas enfermedades. Sin embargo, en la actualidad, en los países en desarrollo siguen causando muertes a un ritmo alarmante. Estos padecimientos provocan más de la mitad de todas las defunciones prematuras, causando la muerte en niños y jóvenes (OMS, 2011).

Cada tres segundos muere un niño, en la mayoría de los casos por una enfermedad infecciosa. En algunos países, uno de cada cinco niños fallece antes de cumplir cinco años. Cada día mueren de paludismo 3,000 personas, tres de las cuales son niños. Cada año, 1.5 millones de personas fallecen por tuberculosis y otros ocho millones son infectados por primera vez (OMS, 2011).

Durante la última década se han registrado grandes progresos en la lucha contra las

enfermedades infecciosas desatendidas en Latinoamérica y el Caribe, pero el compromiso sostenido de los gobiernos de la región y otras instituciones sigue siendo necesario para controlar y eliminar este grupo de enfermedades (OMS, 2012a).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recopila las Estadísticas Sanitarias Mundiales de sus 194 estados miembros cada año, e incluye un resumen de los progresos realizados hacia la consecución de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) relacionados con la salud y sus metas conexas (OMS, 2012a).

Aún con el descubrimiento y síntesis de nuevos fármacos y nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades es ineficiente al momento de compararlos con el número de enfermedades emergentes como la influenza aviar (AH1N1) o el SRAG o con la aparición de cepas resistentes a los tratamientos. Además, la mayoría de estos compuestos no llegarán al mercado como fármaco, aún así, las principales compañías farmacéuticas no han demostrado interés en evaluar extractos de plantas para un posible uso farmacéutico (Cordell and Colvard, 2005).

En la actualidad, se ha reportado que más del 80% de la población mundial utiliza las plantas medicinales como fuente primaria para el tratamiento de múltiples enfermedades (Camacho-Corona Mdel et al., 2008; González et al., 2004). En México, grupos étnicos emplean a las plantas para curar varias enfermedades como diabetes, bronquitis, tuberculosis, parasitos, varicela, quemaduras, infecciones estomacales, etcétera (Barnes et al., 2007; Jiménez et al., 2010; Santillán et al., 2008).

El gran uso de plantas tradicionalmente medicinales como tratamiento de enfermedades se debe, en parte, a que son consideradas seguras para el uso humano; aunque es una noción válida, no es correcta, pues los agentes fitoterapéuticos no han sido evaluados en interacciones con otros medicamentos, lo que representa un serio problema. Además, el uso de partes de plantas debe garantizar que es la especie correcta, que se encuentra libre de plagas y de plaguicidas, así como de una correcta preparación (Cordell and Colvard, 2005). Sin embargo, los compuestos naturales aislados de las plantas han desempeñado un papel importante en el descubrimiento de fármacos.

La Tuberculosis, una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a los pulmones, es causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. No todas las personas infectadas

desarrollan la enfermedad activa, pues el sistema inmune puede aislar la bacteria y ésta mantenerse en estado latente durante años. Cuando se determina (mediante examen con microscopio de la presencia de bacilos en una muestra de esputo) que una persona está infectada se inicia un tratamiento con medicamentos antituberculosis como, isoniazida, rifampicina o etambutol (OMS, 2012b). Se ha estimado que para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan aproximadamente 350 especies de plantas en el mundo (McGaw et al., 2008) (Okunade et al., 2004).

Ácido Nordihidroguayarático

El ácido nordihidroguayárico (NDGA) es un lignano cuya fórmula química es $C_{18}H_{22}O_4$ (Fig. 1) y su masa molecular es de 302.36 g/mol, que se encuentra en la superficie de las hojas (38.3 mg/g) y raíces (32.5 mg/g) de la planta *Larrea tridentata*, conocida comúnmente como gobernadora o chaparral (Fig. 2). Es un arbusto común de los desiertos del norte de América, México-EUA, donde abarca una extensión de aproximadamente 19 millones de hectáreas (Arteaga et al., 2005).

El té de chaparral ha sido utilizado en la medicina tradicional para tratar más de 50 enfermedades como varicela, alergias, neuritis, influenza o bronquitis pues posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

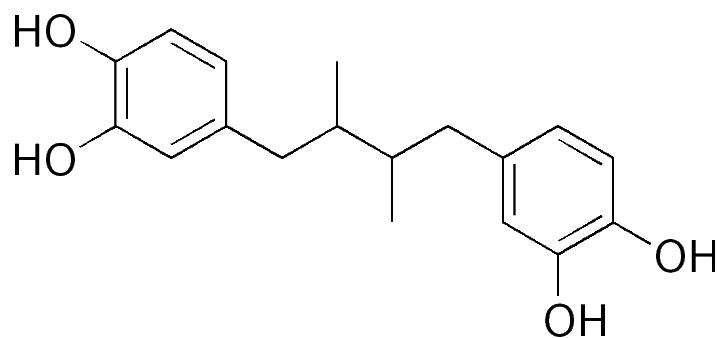


Figura 1. Fórmula química de NDGA



Figura 2. Flor *Larrea tridentata*

La gobernadora es una notable fuente de productos naturales, ya que aproximadamente el 50% del peso seco es materia extraíble, pues la resina contiene 19 flavonoides, flavonoides glicosilados, saponinas, aceites esenciales, alcaloides halogénicos, ceras y lignanos, donde se incluye al NDGA.

Diferentes estudios, han demostrado que el NDGA tiene una potente actividad antiinflamatoria, debido a su habilidad para inhibir a la enzima lipooxigenasa y la formación de los productos subsecuentes (Bokoch and Reed, 1981).

Los efectos benéficos de los tratamientos con NDGA han sido probados en algunos modelos *in vitro*, donde existe la evidencia de presentar actividades antibióticas y antioxidantes (Luo et al., 1998).

Los estudios realizados en cuanto a la toxicidad del NDGA han demostrado que puede inhibir el transporte vesicular intracelular a concentraciones dentro del rango 50-100 μM , donde no solo interrumpe la ruta secretora vesicular sino también la ruta endocítica de las células dendríticas en humanos. A una concentración de 30 μM , el NDGA altera al aparato de Golgi, bloqueando el proceso de reciclaje proteínico, si la concentración aumenta a 100 μM , el bloqueo será irreversible. Por estas razones, la Administración Federal de Drogas de Estados Unidos (FDA) prohíbe el uso del NDGA como suplemento alimenticio (Arteaga et al., 2005).

N-Acetilcisteína

La N-Acetilcisteína (NAC) es un compuesto que contiene un grupo tiol, cuya fórmula química es $C_5H_9NO_3S$ (Fig. 3), con una masa molecular de 163.19 g/mol es precursor de la L-cisteína y puede servir como un precursor para la síntesis de glutatión (van Zandwijk, 1995). La NAC ha sido utilizada como estimulante, antiséptico, expectorante y para tratar problemas del corazón (Aviello et al., 2009). Actúa como antimucolítico, antioxidante y tiene algunas propiedades antiinflamatorias. Las propiedades antimucolíticas de la NAC son atribuidas a los grupos sulfhidrilo (-SH) que contiene, los cuales separan a las mucoproteínas reduciendo la viscosidad de la mucosa, de esta manera NAC previene directamente la adherencia bacteriana al epitelio celular.

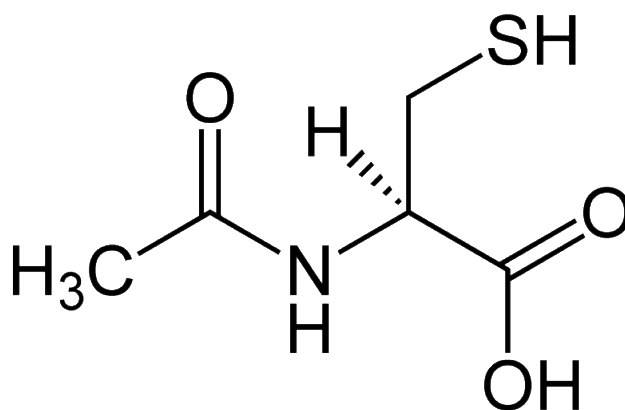


Figura 3. Fórmula química de N-Acetilcisteína

La NAC exhibe propiedades antioxidantes directas e indirectas. Las propiedades directas están relacionadas a los grupos tiol, que interactúan con las especies reactivas de oxígeno; mientras que las propiedades indirectas están relacionadas a su rol precursor de glutatión (Arshad Altaf Bachh, 2007).

Las propiedades antiinflamatorias de la NAC son atribuidas a la inhibición de c-Jun, p38, MAP cinasa y a NF- κ B, el cual regula genes proinflamatorios y antiapoptóticos (Radomska-Leśniewska and Skopiński, 2012).

α -Mangostina

El mangostán, (*Garcinia mangostana*) es un fruto proveniente del sureste de Asia (Fig. 4), con una larga historia de uso en la medicina tradicional de esta área. En China, se ha utilizado el extracto del pericarpio de la fruta por sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antialérgicos, antitumorales, antivirales, antifúngicos y antibacteriales que presenta (Balunas et al., 2008; Liu et al., 2012).

Recientemente, los productos del mangostán se han hecho populares como suplementos alimenticios debido a sus beneficios en la salud comprobados en modelos animales (Bumrungpert et al., 2010).



Figura 4. Fruto del Mangostán

Los principales metabolitos secundarios del fruto son las xantonas y sus derivados, pues muestran potentes actividades farmacológicas. La α Mangostina, el principal compuesto derivado, es una xantona diprenilada y tetraoxigenada con una fórmula química $C_{24}H_{26}O_6$ (Fig. 5) y un peso molecular de 410.46 g/mol (Pinto et al., 2005), que ha demostrado actividad antimicrobiana contra bacterias Gram⁺, contra micobacterias y contra células cancerosas de sangre, seno y colón sin efectos tóxicos en células humanas normales, pues este compuesto puede inducir el arresto del ciclo celular y apoptosis por vía mitocondrial dependiente del calcio y la ATPasa (Koh et al., 2013; Obolskiy et al., 2009).

Se ha comprobado que el extracto de etanólico al 40% del pericarpio del fruto inhibe la liberación de histamina mediada por IgE. Diversas investigaciones indican que las xantonas, principalmente la α y la γ -mangostina, podrían actuar como antagonistas sobre diferentes receptores de histamina, bradiquinina o serotonina (García Font and Ortega Hernández-Agero, 2011)

Con respecto a la toxicidad de α Mangostina, se ha demostrado que bajas concentraciones (4 mg/ml) durante periodos cortos de tiempo 4 a 8 horas no causa muerte celular en fibroblastos gingivales humanos (Kosem et al., 2013). Por ello es esencial determinar las concentraciones biocompatibles con medicamentos utilizados en el tratamiento de enfermedades respiratorias y posteriormente determinar el potencial terapéutico de los compuestos naturales.

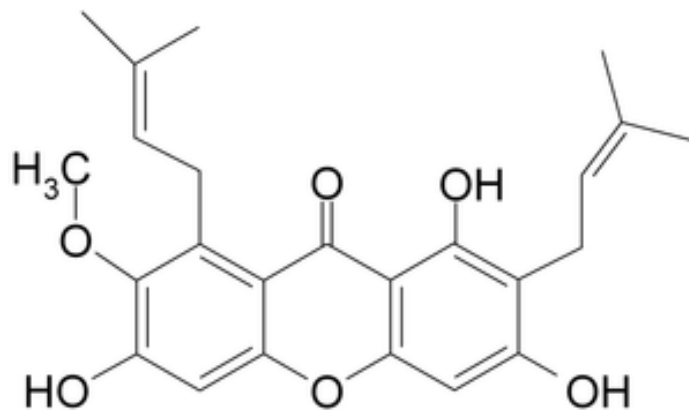


Figura 5. Fórmula química de α Mangostina

Modelos de Estudio

Macrófagos Derivados de Monocitos (MDM)

Los monocitos humanos son parte fundamental en la respuesta inmune innata y adquirida, ya que son los precursores de los macrófagos que funcionan como células fagocíticas y presentadoras de antígeno. Los monocitos son células de origen mieloide producidos en la médula ósea, y derivan de una célula hematopoyética pluripotencial; tienen un tamaño aproximado de 14 μm , con un tiempo de vida muy corto, dentro de un período de 48-72h en el cuerpo.

Su función principal es la defensa del organismo contra diferentes microorganismos, los cuales son reconocidos a través de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos. Entre estos receptores se encuentran los de manosa, scavenger y los tipo Toll. Al encontrarse con un patógeno, el macrófago lo fagocita y se activa, iniciando así diferentes procesos claves para la eliminación del patógeno como lo son las cascadas de señalización y la activación de factores de transcripción que a su vez inducen citocinas proinflamatorias (Bumrungpert et al., 2010).

Macrófagos Derivados de la Línea Celular THP-1

Las células THP-1 provienen de la sangre periférica de un niño de 1 año de edad paciente de leucemia monocítica aguda. Ésta línea celular presenta receptores Fc y C3b y carece de inmunoglobulinas en la superficie. Estas células, también son positivas para la α naftil butirato esterasa, sintetizan lisozimas y son fagocíticas (ATCC® TIB-202™). Las células THP-1 pueden diferenciarse a células macrofágicas adherentes con la estimulación del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y actuar similarmente a los macrófagos (Takemura et al., 2000).

En la tabla 1, se muestra una comparación entre los dos modelos celulares

Tabla 1. Comparativa de la expresión genética en macrófagos humanos		
SIMILITUDES	DIFERENCIAS	
	THP-1	MDMs
Presentan morfología similar y marcadores fenotípicos heterogéneos	Proceden de un niño con leucemia monocítica aguda.	Son aislados de la sangre humana periférica.
Capacidad de adherirse a superficies de cristal	Las THP-1 requieren de estímulos como PMA o VD_3 para inducir diferenciación a macrófagos.	Los monocitos requieren de la estimulación con ciertas citocinas para inducir su diferenciación a macrófagos.
Expresan marcadores de superficie como apolipoproteína E (apo E), lipoproteína lipasa (LPL), receptor para las LDL acetiladas, receptor scavenger	No presentan receptor hepático xalfa (LxRa)	Presentan receptor hepático xalfa (LxRa), importante gen receptor nuclear en macrófagos
- Expresan marcador de superficie CD 14 e interleucina- 1 β (marcador monocítico regulador de diferenciación a macrófagos)	Las M ϕ THP-1 pueden perder su diferenciación	No pierden su diferenciación a macrófagos
Producción de estereasas, lisozimas y expresan marcadores Fc y C3b.	Genes más expresados son Cathepsin G, neutrophil elastasa 2 y proteinasa 3 (encontrados principalmente en neutrófilos).	Expresan genes Ficolin 1 (importante en inmunidad innata), MHC de clase II, interferón gama (importantes en inmunidad adquirida)

(Daigneault et al., 2010), (Kohro et al., 2004), (Gil et al., 2007)

Objetivos

Establecer el efecto de las concentraciones y el tiempo de tratamiento de NDGA, NAC y α Mangostina sobre la viabilidad de los macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1 (M ϕ THP-1) y derivados de monocitos (MDM).

Justificación

Actualmente, el control mundial de las enfermedades infecciosas se enfrenta a grandes desafíos. Los grupos de riesgo (niños y adultos mayores) requieren de atención especial, lo que demanda una actividad de control más compleja y exigente.

La OMS tiene programas para combatir este tipo de padecimientos, sin embargo, la aparición de cepas resistentes a medicamentos y las coinfecciones constituyen todavía un problema de salud pública muy grave.

La mejor aproximación para combatir éste problema es el desarrollo de nuevos fármacos y la aplicación de compuestos que puedan potenciar tanto la respuesta inmune como la actividad farmacológica de los medicamentos.

En este trabajo se pretende determinar el efecto de la N-Acetilcisteína, la α Mangostina y del NDGA sobre la viabilidad de macrófagos humanos (MDM y M ϕ THP-1). Estos compuestos se han seleccionado porque se encuentran en gran proporción en diversas plantas utilizadas dentro de la medicina tradicional; presentan actividad biológica como antioxidantes (NAC, α Mangostina, NDGA), inmunomodulación (NDGA, NAC, α Mangostina) y antimicorbianos (α Mangostina, NDGA); se pueden adquirir de forma pura, lo que permite evaluar directamente su efecto en un modelo celular humano.

Hipótesis

Los compuestos de origen vegetal (NDGA, NAC, α Mangostina), son compuestos bioactivos, por tal razón podrían actuar directamente sobre los macrófagos humanos afectando su viabilidad.

Método

Diferenciación a macrófagos de células THP-1

La línea celular de monocitos humanos THP-1, se obtuvo de la colección de cultivo TIB-202 de la American Type Culture Collection.

El stock de las células THP-1 (1×10^8 células por mL) se descongeló a 37°C y se transfirió a un tubo de 50 mL de fondo cónico de propileno con 10 mL de medio C-10 (Anexo 1). Después de transferir las células, se centrifugaron a 500 G por 10 minutos [Beckman TJ-6R rotor TH-4]. El paquete celular se disgregó tras agitarlo en un vórtex [Fisher Scientific] y se resuspendió en 10 mL de medio THP-1. Las células disueltas se cuantificaron en una cámara de Neubauer [Superior Marienfeld, Germany] mediante la discriminación con azul de tripano. Posteriormente, la suspensión se ajustó a 0.2×10^6 células/mL y se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de O_2 . Los cultivos se incubaron hasta alcanzar una densidad de $0.8-1 \times 10^6$ células/mL. Una vez alcanzada la concentración, se lavaron las células y se resuspendieron en medio THP-1 ajustando la concentración a 0.6×10^6 células/mL.

Las células THP-1 (0.3×10^6 células/ 0.5 mL) se diferenciaron a macrófagos ($\text{M}\phi$ THP-1) mediante la adición de 50 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a la suspensión celular. Después se cultivaron 0.5 mL por pozo en placas de 48 pozos de fondo plano de poliestireno durante 48h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de O_2 .

Al tratar las células con PMA, se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos (Gil, 2007).

Obtención de monocitos derivados a macrófagos (MDM)

Los monocitos utilizados se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Primero, los PBMC se separaron por el método de densidad diferencial, con la ayuda de Ficol Hypaque (Lymphoprep). La sangre se diluyó con medio RPMI en una proporción 1:1 para después centrifugarse a 500 G durante 45 minutos [Beckman TJ-6R rotor TH-4]. Después de centrifugarse, los PBMC se transfirieron a un tubo de 50 mL de fondo cónico de propileno y se lavaron tres veces con medio RPMI centrifugando las células por 10 minutos a 500 G. Una vez lavadas las células, el paquete celular se

resuspendió en 10 mL de medio RPMI complementado (RPMIc) (Anexo 2).

Los monocitos se aislaron gracias a su capacidad de adherencia, al incubarlos en cajas de Petri de 100 cm² durante una hora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de O₂. Después del tiempo de incubación, se retiró el medio por aspiración y se lavaron las células para eliminar a las células que no se adhirieron; las células adheridas se recogieron con la ayuda de un raspador de células (Lifter) y se resuspendieron en 1 mL de RPMIc. La suspensión celular se ajustó a una concentración de 0.6x10⁶ células/mL para después cultivar 0.5 mL por pozo en placas de 48 pozos de fondo plano de poliestireno. Finalmente, los monocitos se incubaron durante siete días a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de O₂ para permitir que se diferencien a macrófagos.

Pruebas de toxicidad

Preparación de los stocks

Los compuestos fueron obtenidos comercialmente de forma pura. El NDGA de Sigma-Aldrich (Núm. Cat. A74540) con una pureza del >97%. La NAC, también de la marca Sigma-Aldrich (Núm. Cat. A7250) con una pureza de ≥99%. Mientras que el α Mangostina tiene una pureza de >98.5% obtenida de Chengdu Biopurify Phytochemicals (Núm. Cat. M07045).

Los compuestos fueron disueltos con la finalidad de tenerlos en un stock de 20 mg/mL. En el caso del NDGA y de la αMangostina la disolución se hizo en 1 mL de Dimetil-sulfóxido (DMSO), por ser hidrofóbicos; el NAC, se disolvió en 1 mL de agua destilada. Una vez disueltos, en DMSO se hicieron diluciones mayores de cada compuesto en buffer salino de fosfatos a pH 7.4 (PBS) (Anexo 3).

Las concentraciones probadas se eligieron con base a la toxicidad reportada para otros tipos celulares (ver Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones probadas de los compuestos naturales.

Compuesto	Concentración	TIPO CELULAR	Referencia
-----------	---------------	--------------	------------

NAC	200-1600 µg	Alveolos humanos	(Radomska-Leśniewska and Skopiński, 2012)
NDGA	0.5-5 µg	Hepatocitos de ratón	(Arteaga et al., 2005)
α- Mangostina	2-20 µg	Neuronas de rata	(Pedraza-Chaverri et al., 2009)

Pruebas de toxicidad en MΦTHP-1

Se evaluó el efecto tóxico de los compuestos naturales en MΦTHP-1 cultivados en placas de 48 pozos en presencia de diferentes concentraciones durante 24h, 48h y 72h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de O₂. Finalizando el tiempo de incubación se monitoreó la viabilidad celular por el método de MTT.

Para determinar el efecto de los compuestos, se cultivaron 0.5 mL de células THP-1 diferenciadas por pozo en placas de cultivo de 48 pozos de fondo plano de poliestireno para después exponerlas a (1, 2, 3, 5 µg/mL de) NDGA, (500, 800, 1000, 1200, 1500, 1600 µg/mL de) NAC y (4, 6, 8, 10 µg/mL de) αMangostina durante tiempos de 24h, 48h y 72h. Concluido los tiempos de incubación, se realizó el método de reducción de MTT para evaluar la viabilidad de los macrófagos.

Para los tres compuestos, se realizaron cuatro experimentos independientes por triplicado, y la evaluación de viabilidad se hizo comparando los valores de las células cultivadas en medio (control) con respecto a las células tratadas. Los valores se informaron como el porcentaje de células viables.

Pruebas de toxicidad en MDM

El efecto tóxico de los compuestos naturales se midió en MDM cultivados en placas de 48 pozos de fondo plano de poliestireno en presencia de diferentes concentraciones durante 72h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de O₂. Los MDM se expusieron durante 72h porque en experimentos previos se observó que a 24h y 48h de incubación no hay afectaciones en su viabilidad, la cual fue monitoreada por el método de reducción de MTT.

Para valorar el efecto tóxico, se cultivaron 0.5 mL de células MDM por pozo en presencia de NDGA (1, 2, 3, 5 µg/mL), NAC (500, 800, 1000, 1200, 1500, 1600 µg/mL) y

α Mangostina (4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$). Transcurrido el tiempo de incubación, se cuantificó la viabilidad celular por el método de reducción de MTT.

Para los tres compuestos, se realizaron cuatro experimentos independientes por triplicado, y la evaluación de viabilidad se hizo comparando los valores de las células cultivadas en medio (control) con respecto a las células tratadas. Los valores se informaron como el porcentaje de células viables.

Viabilidad celular por MTT

El ensayo de MTT detecta a las células metabólicamente activas y por lo tanto vivas, se basa en la reducción metabólica de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) que es amarillo y soluble que cambia a formazán que es azul intenso e insoluble. La reducción se lleva a cabo por la acción de las enzimas mitocondriales como la succinato-deshidrogenasa. Por lo tanto, la concentración de formazán generada es directamente proporcional al número de células viables, que es detectable en el espectrofotómetro (Juárez Figueroa, 2011; Mosmann, 1983).

Para detectar la formación de formazán, se adiciona 30 μl de solución de MTT (5 mg/mL) a cada pozo. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante dos horas, luego se eliminó el sobrenadante por decantación. Posteriormente se adicionó 800 μl de isopropanol ácido para disolver los cristales de formazán. Los cambios de intensidad colorimétrica se monitoreo en el lector de placas a 570 nm de longitud de onda (Multiscan reader).

Análisis estadístico

Se realizó una ANOVA de una vía con una post-prueba de Dunnett utilizando el software de GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows.

Resultados

Resultados M ϕ THP-1

Resultados M ϕ THP-1 expuestos a NDGA

El ácido nordihidroguayereúico no afectó de forma negativa a la viabilidad de los M ϕ THP-1 en concentraciones menores a los 5 μ g (Fig. 6), puesto que el porcentaje de viabilidad cae hasta un 66.2% con 8 μ g/mL y 43.1% con 15 μ g/mL del compuesto después de 24h de exposición. Las concentraciones de 1, 2, 3 y 5 μ g/mL expuestas a 24h presentaron 101%, 102%, 96% y 93% de viabilidad respectivamente (Fig. 6A). Siguiendo con las concentraciones bajas, la viabilidad celular a las 48h fue de 96%, 95%, 95% y 94% (Fig. 6B); mientras que a las 72h se observó 106%, 103%, 98% y 103% de células viables (Fig. 6C).

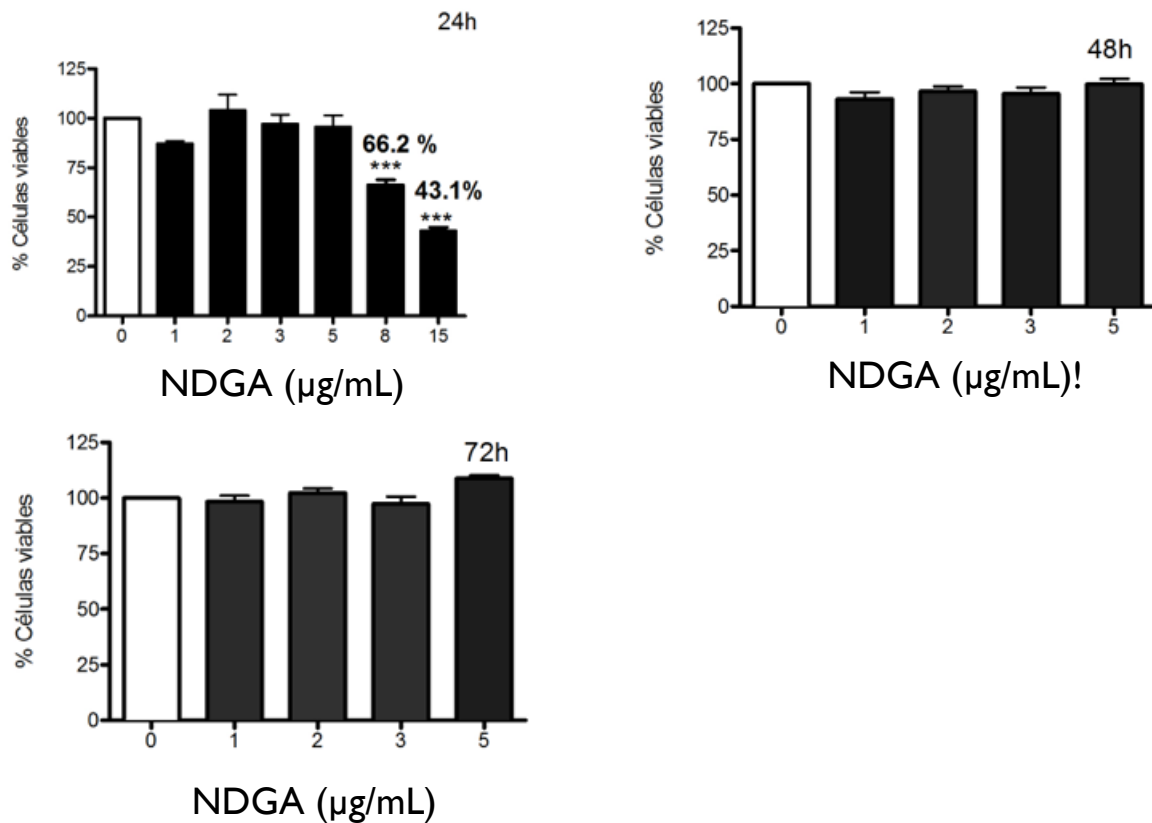


Figura 6. Efecto del NDGA sobre la viabilidad de MφTHP-1 después de 24h (A), 48h (B) y 72h (C) de exposición. Los macrófagos humanos derivados de THP-1 fueron tratados con diferentes concentraciones de NDGA durante 24h, 48h y 72h para después evaluar su viabilidad por el método de MTT. ***P < 0.0001

Resultados MφTHP-1 expuestos a α-Mangostina

La αMangostina (Fig. 7), por su parte sólo afectó de forma negativa la viabilidad de los Mφ THP-1 a altas concentraciones (15 y 20 μg), donde el porcentaje de células vivas decayó hasta un 13%, por esta razón, estas concentraciones se probaron únicamente en el periodo de 24h (Fig. 7A). A concentraciones menores, (4, 6, 8 y 10 μg) no se demostraron alteraciones estadísticamente significativas a la viabilidad celular en ningún tiempo del tratamiento, pues a las 24h hubo porcentajes de 89%, 129%, 130% y 102%; a las 48h (Fig. 7B) de tratamiento hubo 121%, 129%, 131% y 96% de viabilidad; y a las 72h (Fig. 7C) de tratamiento la viabilidad fue de 129%, 136%, 123% y 88%.

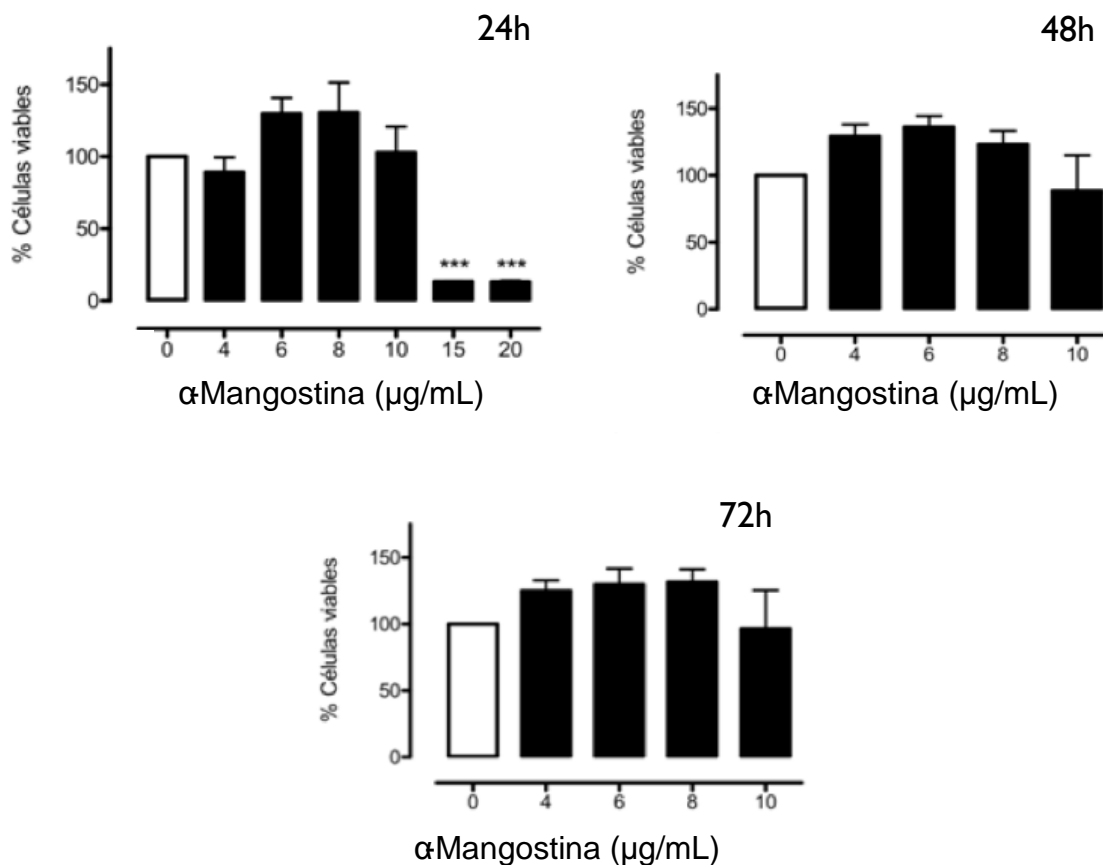
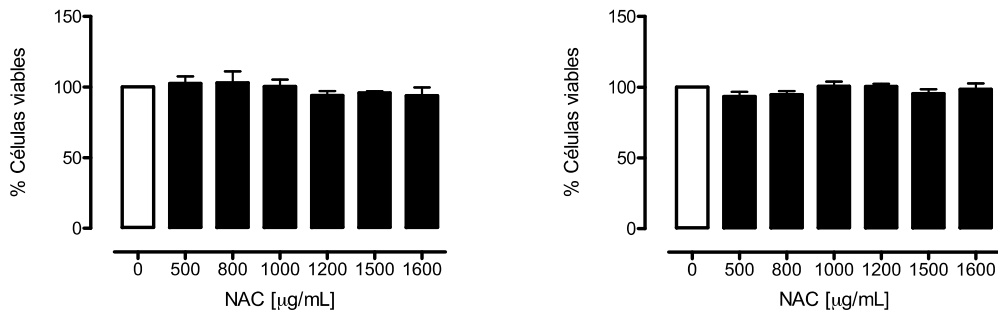


Figura 7. Efecto de la α Mangostina sobre la viabilidad de M ϕ THP-1 después de 24h (7A), 48h (7B) y 72h (7C) de tratamiento con α Mangostina. Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos para después ser incubadas con diferentes concentraciones de α Mangostina durante 24h, 48h y 72h, la viabilidad de las células se determinó con el método de MTT. *** P <0.5

Resultados M ϕ THP-1 expuestos a NAC

Respecto a la NAC, la viabilidad celular no disminuyó de manera estadísticamente significativa respecto al control, cuando se expusieron durante 24h (Fig. 8A), donde se mostró 102%, 103%, 100%, 94%, 95% y 94% de viabilidad respectivamente, a las 48h (Fig. 8B) se presentaron 93%, 94%, 100%, 100%, 95% y 98% de viabilidad; y finalmente durante las 72h, se observó 92%, 101%, 104%, 102%, 91% y 98% de viabilidad respectivamente (Fig. 8C). Se pudo observar que las distintas concentraciones de la NAC probadas no representan un efecto tóxico sobre M ϕ THP-1.



8C

72h

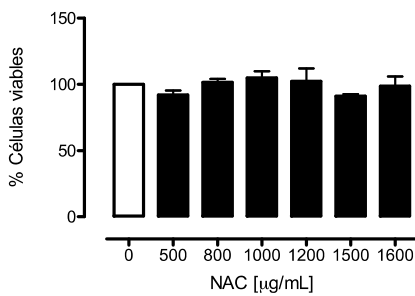


Figura 8. Efecto de la NAC sobre la viabilidad de células MφTHP-1 después de un tratamiento de 24h (8A), 48h (8B) y 72h (8C) con diferentes concentraciones de NAC. A células macrofágicas provenientes de la línea celular THP-1 se les aplicó un tratamiento con diferentes concentraciones de NAC durante 24h, 48h y 72h, su viabilidad se determinó con el método reductor de MTT. $P < 0.5$

Resultados MφTHP-1 expuestos a DMSO

El DMSO se utilizó como vehículo para disolver al NDGA y la α Mangostina a una concentración del 0.1%, se realizaron pruebas para determinar si es que afecta la viabilidad celular (Fig. 9). Para ello, se evaluó su toxicidad durante 24h (Fig. 9A), 48h (Fig. 9B) y 72h (Fig. 9C) a concentraciones de 0.1% y 1%, observando que a la concentración utilizada no afectó estadísticamente la viabilidad de los MφTHP-1, pues los resultados demuestran una viabilidad del 95% a las 24h, 95% a las 48h y 99% a las 72h y al 1% existe una alteración después de 72h de exposición, donde el porcentaje de viabilidad bajó a 91% en comparación al porcentaje de 24h y 48h (93% y 94% respectivamente).

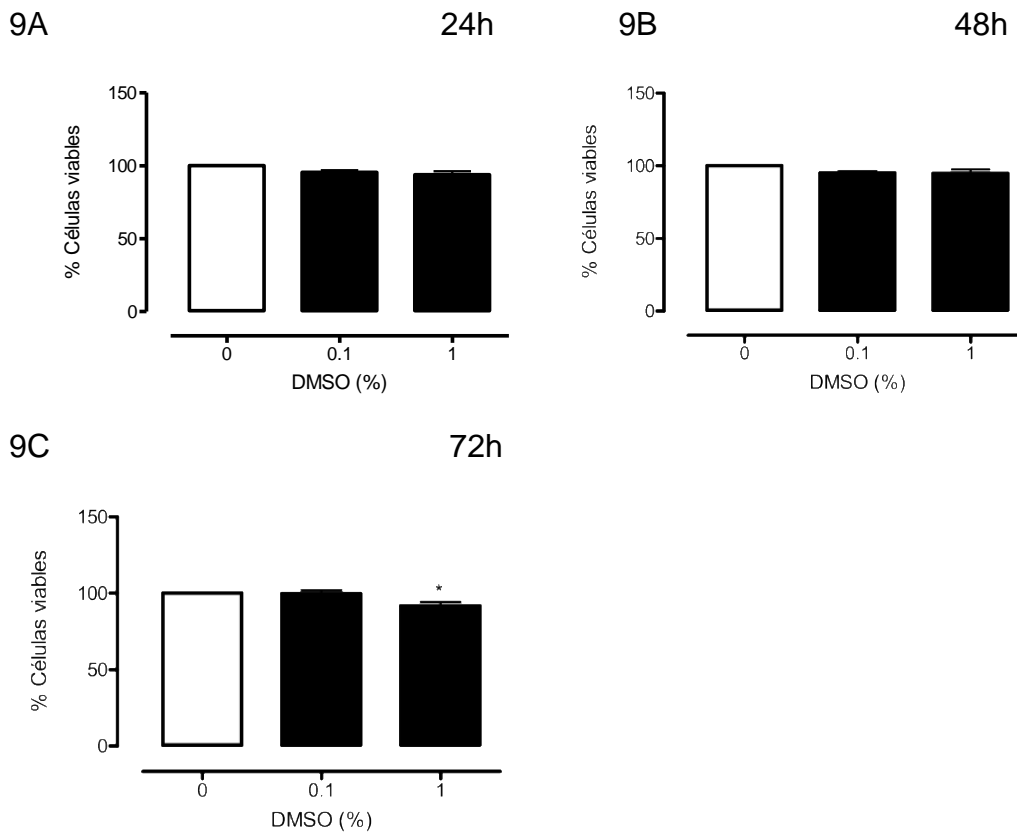


Figura 9. Efecto del DMSO sobre la viabilidad de células Mφ THP-1 después de un tratamiento de 24h (9A), 48h (9B) y 72h (9C) con la concentración de DMSO a la que se disolvieron los compuestos (0.1%) y 10 veces la concentración de disolución (1%). A células macrofágicas provenientes de la línea celular THP-1 se les aplicó un tratamiento con dos concentraciones de DMSO durante 24h, 48h y 72h, su viabilidad se determinó con el método reductor de MTT. *P< 0.5

Resultados MDM

Resultados MDM expuestos a NDGA

El NDGA no afectó negativamente la viabilidad de los MDM (Fig. 10) en concentraciones iguales o menores a 5 µg (1.5, 2, 3, 5 µg) tras 72h de exposición al compuesto. El porcentaje de viabilidad de las células fue de 104%, 106%, 97% y 103% en orden ascendente de concentraciones.

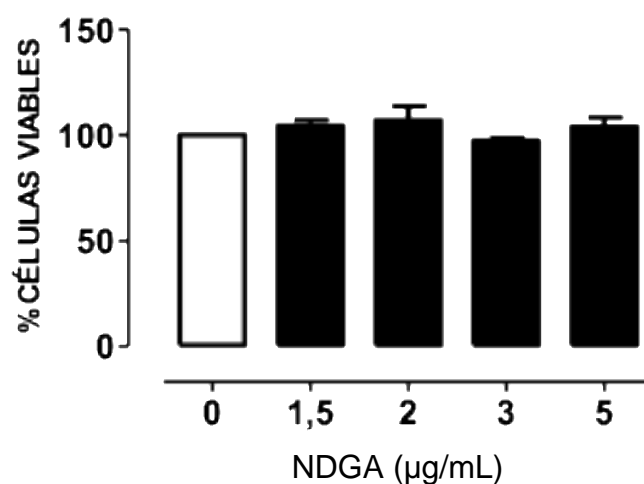


Figura 10. Efecto del NDGA sobre la viabilidad de MDM 72h de exposición a NDGA. Los macrófagos humanos fueron tratados con diferentes concentraciones de NDGA durante 72h para después evaluar su viabilidad por el método de MTT. $P < 0.0001$

Resultados MDM expuestos a NAC

Con el tratamiento de NAC, la viabilidad celular no disminuyó de manera estadísticamente significativa respecto al control, cuando se expusieron durante 72h, se observó 102%, 96%, 98% y 90% correspondientes a las concentraciones de 1000, 1200, 1500 y 1600 μg (Fig. 11). Se puede observar que las distintas concentraciones de NAC probadas no representan un efecto tóxico sobre MDM.

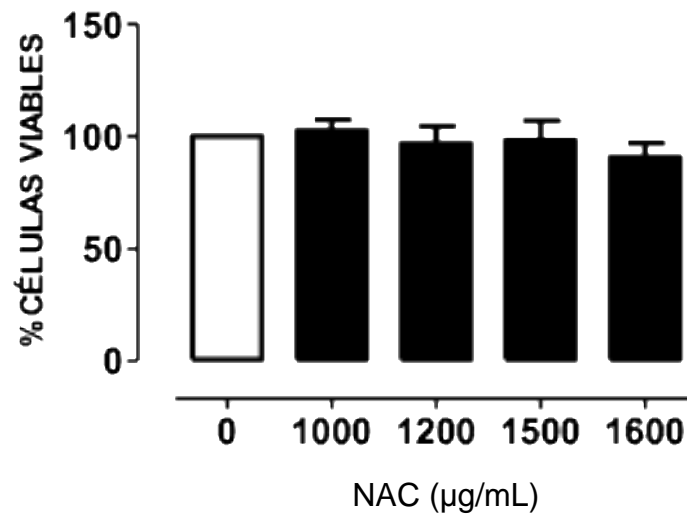


Figura 11. Efecto de la NAC sobre la viabilidad de células MDM después de un tratamiento de 72h. A células macrofágicas humanas se les aplicó un tratamiento con diferentes concentraciones de NAC durante 72h, su viabilidad se determinó con el método reductor de MTT. $P < 0.5$

Resultados MDM expuestos a -Mangostina

La α Mangostina (Fig. 12), por su parte no afectó la viabilidad de los MDM a concentraciones bajas (4, 6, 8 y 10 μ g), pues no se demostraron alteraciones estadísticamente significativas a la viabilidad celular, ya que después de 72h de tratamiento la viabilidad fue de 104%, 98%, 96% y 86%.

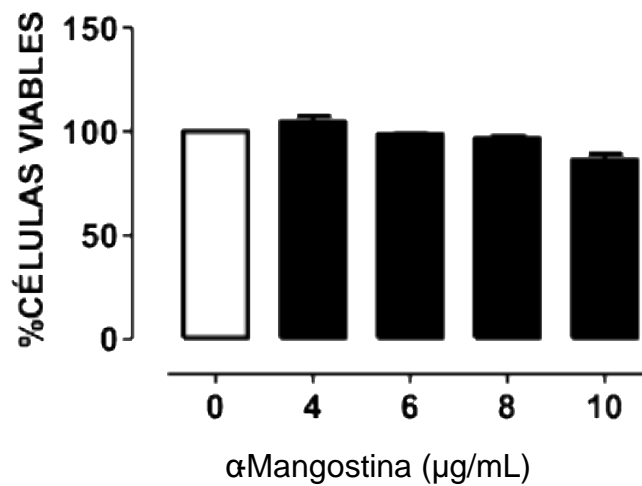


Figura 12. Efecto de la α Mangostina sobre la viabilidad de MDM después de 72h de tratamiento. Las células MDM fueron incubadas con diferentes concentraciones de α Mangostina durante 72h, la viabilidad de las células se determinó con el método de MTT. $P < 0.5$

El DMSO se utilizó como vehículo para disolver al NDGA y la α Mangostina a una concentración del 0.1%, se realizaron pruebas para determinar si es que afecta la viabilidad celular (Fig. 13). Para ello, se evaluó su toxicidad durante 72h a concentraciones de 0.1% y 1%, observando que a la concentración utilizada no afectó estadísticamente la viabilidad de los MDM, pues los resultados demostraron una viabilidad del 101% a las 72h y con el 1% existe una disminución después del tiempo de incubación donde el porcentaje de viabilidad bajo a 98%; aun así la diferencia no fue estadísticamente significativa.

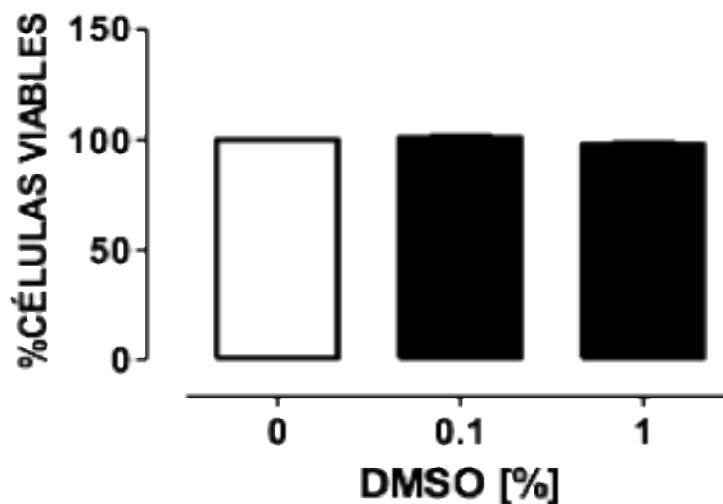


Figura 13. Efecto del DMSO sobre la viabilidad de células MDM después de un tratamiento 72h con la concentración de DMSO a la que se disolvieron los compuestos (0.1%) y 10 veces la concentración de disolución (1%). A células macrofágicas derivadas de monocitos se les aplicó un tratamiento con dos concentraciones de DMSO 72h, su viabilidad se determinó con el método reductor de MTT. $P < 0.5$

Discusión

En este trabajo, se evaluó la toxicidad de los compuestos NDGA, NAC y α Mangostina sobre los modelos celulares de MDM y M ϕ THP-1. Los compuestos, fueron seleccionados porque en experimentos previos (Aburto Rodríguez, 2012) se demostró que poseen actividad antimicrobiana contra *M. tuberculosis* a partir de concentraciones de 5 μ g/mL, en el caso de α Mangostina; y de 200 μ g/mL en los casos de NAC y NDGA.

Los resultados obtenidos demuestran que, el NDGA no afecta la viabilidad celular cuando el tratamiento es menor a los 5 μ g/mL pues los valores se mantienen por arriba del 90%. Sin embargo, existe una reducción de células viables cuando las concentraciones del compuesto sobrepasan los 8 μ g/mL (8 y 15 μ g/mL) donde se observa que la viabilidad decae hasta un 37% y 57%. Estos resultados tienen repercusión en el caso de un posible tratamiento contra tuberculosis, pues la cantidad necesaria para atacar el bacilo es de 200 μ g/mL. Aun así, el NDGA, al ser flavonoide, es similar a la buteina o la isoliquirtigenina, los cuales son capaces de inhibir el crecimiento de la micobacteria o de potencializar el efecto de medicamentos como la isoniacida (Lechner et al., 2008). Además, se ha reportado que el NDGA es un compuesto con las propiedades biológicas de inhibir la lipooxigenasa, impidiendo la acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), actuando como antioxidante; y funciona como antiinflamatorio inhibiendo a TNF- α reduciendo la síntesis de prostaglandinas y leucotrenos (Guzman-Beltran et al., 2013; Kim et al., 2008; Lu et al., 2010).

Con lo que respecta a la NAC, los resultados obtenidos demuestran que los diferentes tratamientos no alteran la viabilidad celular en ningún modelo celular de manera significativa, pues se sabe que las células humanas son capaces de tolerar altas concentraciones del compuesto, el cual es utilizado como fármaco antimucolítico a dosis de 600-1500 mg/día durante un mes o más (Kelly, 1998). Las dosis aplicadas en el experimento son 1000 veces inferiores a las utilizadas por Kelly (1998), por lo que podría aumentarse la dosis y los tiempos de incubación.

Los resultados de la α Mangostina muestran un efecto negativo en la viabilidad de M ϕ THP-1 con dosis altas del compuesto (15 y 20 μ g/mL), apreciables después de 24h de exposición donde se reduce un 87% pero con dosis menor (4, 6, 8 y 10 μ g/mL) no hay alteraciones estadísticamente significativas en la viabilidad de las células. Este dato es compatible con los resultados obtenidos por Suksamrarn (2003), donde demuestra una

dosis de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es capaz de evitar el crecimiento de *M. tuberculosis* a una densidad de 5×10^4 CFU/mL (Suksamrarn et al., 2003).

Gracias a experimentos anteriores, se sabe que los tres compuestos evaluados tienen funciones antioxidantes y de inmunomodulación, por lo que son capaces de proteger a las células de estrés oxidante o de reacciones inflamatorias en bajas concentraciones (Arteaga et al., 2005; Aviello et al., 2009; Balunas et al., 2008; Liu et al., 2012; Radomska-Leśniewska and Skopiński, 2012).

El NDGA, tradicionalmente es utilizado para tratar diversas enfermedades, pues es capaz de bloquear la activación de NF- κ B y atenuar la hipersensibilidad de las vías aéreas, reduciendo las citocinas proinflamatorias (Kim et al., 2008; Lu et al., 2010). Por estas razones, el NDGA podría ser utilizado como un tratamiento preventivo, pues bien, si no es capaz de combatir al bacilo de la tuberculosis podría proteger a las células macrofágicas del daño ocasionado por estrés oxidante y reducir el malestar ocasionado por la inflamación.

La NAC, por su parte, tiene un historial en el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias, como la bronquitis crónica, esto es gracias a su actividad antimucolítica, la cual ha sido utilizada desde hace 40 años, al igual que sus propiedades detoxificantes. En la actualidad, la NAC es utilizada principalmente por sus actividades antioxidantes, pues protegen del estrés oxidante involucrado en enfermedades como cáncer, artritis, diabetes, alteraciones cardiovasculares, enfermedades respiratorias y genotoxicidad provocada por radioterapia (Radomska-Leśniewska and Skopiński, 2012); toda esta actividad puede deberse a su antagonismo con el aminoácido cisteína o a la interacción del grupo -SH, capaz de inhibir enzimas metabólicas (Parry and Neu, 1977; Zygmunt and Martin, 1968). Debido a estas propiedades y a su accesibilidad, la NAC resulta ser una buena opción en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Actualmente, la α Mangostina está siendo estudiada por su efecto antioxidante, antiinflamatorio, al prevenir la expresión de genes inflamatorios (MAPK, NF- κ B y AP-1) inducidos por lipopolisacáridos (LPS) e inducir la expresión de IL-6, TNF- α e IP-10 (Bumrungpert et al., 2010); y capacidad de prevenir la resistencia a la insulina, al diluir sustancias lipofílicas e inhibir enzimas involucradas en la glucólisis como la aldosa y el gliceraldehído-3-fosfato (Aburto Rodríguez, 2012; Nguyen et al., 2013) lo que la convierte

en una opción viable para tratar enfermedades como la tuberculosis durante periodos cortos o como tratamiento preventivo y de cuidado durante periodos largos y con dosis pequeñas.

Con base en los resultados obtenidos, se demostró que los compuestos probados no afectan la viabilidad de las células humanas a dosis pequeñas y con estas mismas dosis hay un beneficio protector. En cuanto a los tipos celulares, los valores de viabilidad son similares, lo que sugiere que los macrófagos derivados de THP-1 y de los monocitos pueden ser utilizados como modelos de infección macrofágica; aunque por la facilidad de obtención y manejo de las células THP-1, resultan una mejor opción de trabajo experimental.

Bibliografía

Aburto Rodríguez, N.A. 2012. Efecto de compuestos naturales sobre el crecimiento de

Mycobacterium tuberculosis H37Ra.60.

- Arshad Altaf Bachh, N.N.S., Rakesh Bhargava, Zuber Ahmed, D.K. Pandey, Khurshid A Dar, Inaamul Haq. 2007. Effect Of Oral N-Acetylcysteine In COPD- A Randomised Controlled Trial. *JK-Practitioner*. 14.
- Arteaga, S., A. Andrade-Cetto, and R. Cardenas. 2005. Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of ethnopharmacology*. 98:231-239.
- Aviello, G., L. Abenavoli, F. Borrelli, R. Capasso, A.A. Izzo, F. Lembo, B. Romano, and F. Capasso. 2009. Garlic: empiricism or science? *Natural product communications*. 4:1785-1796.
- Balunas, M.J., B. Su, R.W. Brueggemeier, and A.D. Kinghorn. 2008. Xanthonenes from the botanical dietary supplement mangosteen (*Garcinia mangostana*) with aromatase inhibitory activity. *Journal of natural products*. 71:1161-1166.
- Barnes, J., L. Anderson, and J. Phillipson. 2007. Herbal Medicines Pharmaceutical Press, EUA. 210 pp.
- Bokoch, G.M., and P.W. Reed. 1981. Effect of various lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on degranulation of polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry*. 256:5317-5320.
- Bumrungpert, A., R.W. Kalpravidh, C.C. Chuang, A. Overman, K. Martinez, A. Kennedy, and M. McIntosh. 2010. Xanthonenes from mangosteen inhibit inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *The Journal of nutrition*. 140:842-847.
- Camacho-Corona Mdel, R., M.A. Ramirez-Cabrera, O.G. Santiago, E. Garza-Gonzalez, P. Palacios Ide, and J. Luna-Herrera. 2008. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytotherapy research : PTR*. 22:82-85.
- Cordell, G.A., and M.D. Colvard. 2005. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of ethnopharmacology*. 100:5-14.
- Daigneault, M., J.A. Preston, H.M. Marriott, M.K. Whyte, and D.H. Dockrell. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*. 5:e8668.
- García Font, N., and T. Ortega Hernández-Agero. 2011. Posibles efectos beneficiosos para la salud del fruto de mangostán. *Revista de Fitoterapia*. 11:10.

- Gil, A., M.C. Ramírez, M.C. Aguilera, and M.C. Mesa. 2007. Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*. 22.
- Gil, A., C. Maria Aguilera, M. Gil-Campos, and R. Canete. 2007. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *The British journal of nutrition*. 98 Suppl 1:S121-126.
- González, M., I.L. López, M.S. González, and J.A. Tena. 2004. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Guzman-Beltran, S., J. Pedraza-Chaverri, S. Gonzalez-Reyes, F. Hernandez-Sanchez, U. Juarez-Figueroa, Y. Gonzalez, K. Bobadilla, and M. Torres. 2013. Nordihydroguaiaretic Acid Attenuates the Oxidative Stress-Induced Decrease of CD33 Expression in Human Monocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Jiménez, M.A., J. Cornejo, and R. León. 2010. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41:22-28.
- Juárez Figueroa, U.E. 2011. El ácido nordihidroguayarático protege de estrés oxidante a monocitos humanos (THP-1).
- Kim, S.Y., T.B. Kim, K.A. Moon, T.J. Kim, D. Shin, Y.S. Cho, H.B. Moon, and K.Y. Lee. 2008. Regulation of pro-inflammatory responses by lipoxygenases via intracellular reactive oxygen species in vitro and in vivo. *Experimental & molecular medicine*. 40:461-476.
- Koh, J.J., S. Qiu, H. Zou, R. Lakshminarayanan, J. Li, X. Zhou, C. Tang, P. Saraswathi, C. Verma, D.T. Tan, A.L. Tan, S. Liu, and R.W. Beuerman. 2013. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochimica et biophysica acta*. 1828:834-844.
- Kohro, T., T. Tanaka, T. Murakami, Y. Wada, H. Aburatani, T. Hamakubo, and T. Kodama. 2004. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 11:88-97.
- Kosem, N., K. Ichikawa, H. Utsumi, and P. Moongkarndi. 2013. In vivo toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *Journal of natural medicines*. 67:255-263.
- Lechner, D., S. Gibbons, and F. Bucar. 2008. Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in *Mycobacterium*. *Phytochemistry Letters*.
- Liu, S.H., L.T. Lee, N.Y. Hu, K.K. Huange, Y.C. Shih, I. Muneakazu, J.M. Li, T.Y. Chou,

- W.H. Wang, and T.S. Chen. 2012. Effects of alpha-mangostin on the expression of anti-inflammatory genes in U937 cells. *Chinese medicine*. 7:19.
- Lu, J.M., J. Nurko, S.M. Weakley, J. Jiang, P. Kougiyas, P.H. Lin, Q. Yao, and C. Chen. 2010. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 16:RA93-100.
- Luo, J., T. Chuang, J. Cheung, J. Quan, J. Tsai, C. Sullivan, R.F. Hector, M.J. Reed, K. Meszaros, S.R. King, T.J. Carlson, and G.M. Reaven. 1998. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *European journal of pharmacology*. 346:77-79.
- McGaw, L.J., N. Lall, J.J. Meyer, and J.N. Eloff. 2008. The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *Journal of ethnopharmacology*. 119:482-500.
- Montesinos-Lopez, O.A., and C.M. Hernandez-Suarez. 2007. [Mathematical models for infectious diseases]. *Salud publica de Mexico*. 49:218-226.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65:55-63.
- Nguyen, H.Q., V.S. Fan, J. Herting, J. Lee, M. Fu, Z. Chen, S. Borson, R. Kohen, G. Matute-Bello, G. Pagalilauan, and S.G. Adams. 2013. COPD Patients with Higher Levels of Anxiety Are More Physically Active. *Chest*.
- Obolskiy, D., I. Pischel, N. Siriwatanametanon, and M. Heinrich. 2009. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy research : PTR*. 23:1047-1065.
- Okunade, A.L., M.P. Elvin-Lewis, and W.H. Lewis. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. 65:1017-1032.
- OMS. 2011. Organización Mundial de la Salud.
- OMS. 2012a. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012.
- OMS. 2012b. Tuberculosis. Vol. 2012. OMS.
- Parry, M.F., and H.C. Neu. 1977. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *Journal of clinical microbiology*. 5:58-61.
- Pedraza-Chaverri, J., L.M. Reyes-Fermin, E.G. Nolasco-Amaya, M. Orozco-Ibarra, O.N. Medina-Campos, O. Gonzalez-Cuahutencos, I. Rivero-Cruz, and R. Mata. 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 61:491-501.

- Pinto, M.M., M.E. Sousa, and M.S. Nascimento. 2005. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Current medicinal chemistry*. 12:2517-2538.
- Radomska-Leśniewska, D.M., and P. Skopiński. 2012. N-acetylcysteine as an anti-oxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications. *Central European Journal of Immunology*. 37.
- Santillán, M., M.E. López, S. Aguilar, and A. Aguilar. 2008. Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *Mexicana* y *A. mexicana* ssp. *Xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79:513-524.
- Suksamrarn, S., N. Suwannapoch, W. Phakhodee, J. Thanuhiranlert, P. Ratananukul, N. Chimnoi, and A. Suksamrarn. 2003. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 51:857-859.
- Takemura, H., H. Yamamoto, H. Kunishima, H. Ikejima, T. Hara, K. Kanemitsu, S. Terakubo, Y. Shoji, M. Kaku, and J. Shimada. 2000. Evaluation of a human monocytic cell line THP-1 model for assay of the intracellular activities of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 46:589-594.
- van Zandwijk, N. 1995. N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*. 22:24-32.
- Zygmunt, W.A., and T.A. Martin. 1968. Cysteine analogs as potential amino acid antagonists in bacteria. *Journal of medicinal chemistry*. 11:623-625.

Anexos

Anexo 1: Medio THP-1

Reactivo	Volumen
· Medio RPMI 1640 (Sigma)	· 500 mL

Se retiran 20 mL de medio para sustituirlos con:

Suplementos:

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

Se retiran 50 mL del medio complementado y se agregan:

Reactivo	Volumen
· Suero fetal bovino (Lonza)	· 50 mL

Anexo 2: Medio RPMIc

Reactivo	Volumen
· Medio RPMI 1640 (Sigma)	· 500 mL

Se retiran 50 mL de medio para sustituirlos con:

Suplementos:

Reactivo	Volumen del stock
· Sulfato de Gentamicina	· 50 µg/mL
· L-Glutamina	· 200 nM
· Suero humano descomplementado	· 50 mL

Anexo 3: Método reductor de MTT

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

La cuantificación del índice de la viabilidad se informó como la proporción de reducción de MTT a formazán del control sin tratamiento contra los diferentes tratamientos. Para ello, se agregaron 150 µg/mL de cultivo de MTT a cada pozo, se incubó por 3h a 37°C. Posteriormente las células se centrifugaron a 725 G por 10 minutos, se eliminó el medio THP-1 y se adicionó isopropanol ácido para disolver los cristales de formazán. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro, Multiskan Ascent [Thermo] a 540 nm.

Solución stock de MTT

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

Solución de isopropanol ácido (25:1)

Reactivo	Cantidad/Volumen
----------	------------------

- 2-propanol (isopropanol) · 192 mL
- HCl 0.1M · 8 mL

Ácido clorhídrico 0.1 M

- | Reactivo | Cantidad/Volumen |
|--------------------|------------------|
| · HCl (Merck) | · 3.646 g |
| · Agua desionizada | · 1000 mL |

Anexo 4: Preparación de los compuestos

NDGA 2 mg/ mL stock	
Reactivo	Cantidad /volumen
NDGA (Sigma)	2 mg
DMSO (Sigma)	1 mL
PBS (Bio-Whittaker)	9 mL

NAC 20 mg/ mL stock	
Reactivo	Cantidad /volumen
NAC (Sigma)	20 mg
Agua destilada estéril	1 mL
PBS (Bio-Whittaker)	9 mL

Alfa-Mangostina 20 mg/mL stock	
Reactivo	Cantidad /volumen
Alfa-Mangostina	4 mg
DMSO (Sigma)	1 mL
PBS (Bio-Whittaker)	9 mL