



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del ácido nordihidroguaiarético en la muerte de células tumorales:
evaluación de la biogénesis mitocondrial

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Gustavo Ignacio Vázquez Cervantes

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Rogelio Hernández Pando
Instituto Nacional de Nutrición, Salvador Zubirán

Ciudad de México. Mayo, 2016



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.

Apoyos

Este trabajo fue apoyado por CONACYT 220046, 252008 y PAPIIT IN20136.

El programa de becas de posgrado de CONACYT.

¡Gracias!

A todos los momentos y lugares que me han llevado a estar escribiendo estas palabras el día de hoy.

A las personas que sin querer o no, directa o indirectamente se han cruzado por mi camino y han sido parte de esta historia.

Porque aunque parezcamos ser una infinitesimal parte del vasto universo, sin uno de nosotros el resultado no sería el mismo.

Índice.

Índice.....	iv
Índice de figuras y tablas.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	1
Introducción.....	3
Biogénesis mitocondrial.....	3
Antioxidantes y biogénesis mitocondrial.....	8
El ácido nordihidroguaiarético.....	8
Cáncer de vejiga.....	12
Justificación.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	13
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares.....	13
Método.....	14
Materiales y reactivos.....	14

Cultivo celular.....	15
Preparación del NDGA.....	16
Viabilidad celular.....	16
Reducción de MTT.....	16
Fluorescencia de FDA.....	16
Determinación de apoptosis y muerte celular.....	17
Potencial de membrana mitocondrial.....	18
Producción de EROs.....	18
Densidad mitocondrial.....	19
Expresión de factores relacionados con biogénesis y dinámica mitocondrial.	
Recolección de extractos celulares.....	19
Cuantificación de proteínas.....	20
Western blot.....	20
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	21
Viabilidad celular.....	21
Apoptosis.....	22
Potencial de membrana mitocondrial.....	24

Producción de EROs.....	27
Densidad mitocondrial.....	29
Western blot.....	30
Discusión.....	33
Conclusiones.....	35
Referencias.....	37

Índice de figuras y tablas.

Figura 1. Esquema general de la vía de señalización para la biogénesis mitocondrial (Modificado de Scarpulla, 2008).....	5
Figura 2. El NDGA disminuyó la viabilidad celular de la línea T24.....	22
Figura 3. El NDGA indujo apoptosis en la línea T24.....	23
Figura 4. Fotografías tomadas con el microscopio del ensayo de potencial de membrana mitocondrial.....	25-26
Figura 5. El NDGA promovió la disminución del potencial de membrana mitocondrial.....	27
Figura 6. Imágenes obtenidas para el análisis de producción de especies reactivas de oxígeno.....	28-29
Figura 7. El NDGA promovió el aumento en la producción de EROs.....	29
Figura 8. El NDGA disminuyó la masa mitocondrial de las células T24.....	30
Figura 9. El NDGA indujo la disminución de los marcadores de biogénesis mitocondrial y el aumento de la fisión mitocondrial.....	32
Figura 10. Esquema general del efecto del NDGA en la biogénesis mitocondrial de las células T24.....	36
Tabla 1. Efectos antitumorales del NDGA.....	11

Abreviaturas.

AMPK.... Proteín-cinasa activada por adenosín monofosfato

CaMKIV..Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo IV

DHE..... Dihidroetidio

DMEM...Medio Eagle modificado por Dulbecco

Drp1..... Proteína relacionada con la dinamina 1

DTT.....Ditiotreitol

EROs.... Especies reactivas de oxígeno

ERR α Receptor α relacionado con el estrógeno

FDA..... Fluoresceína diacetato

HIF-1 α ... Factor inducible por hipoxia 1 α

HRP.....Peroxidasa de rábano

IGF-1.... Factor de crecimiento de insulina 1

JC-1..... Yoduro de tetraetilbenzimidazolilcarbonina

MEF-2....Factor intensificador de miocitos 2

Mfn1..... Mitofusina 1

mtDNA.. Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

MTT..... Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il,1)-2, 5 difenitetrazolio

NDGA.... Ácido nordihidroguaiarético

NF-κB.... Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B
activadas

NRF-1... Factor nuclear respiratorio 1

NRF-2... Factor nuclear respiratorio 2

Nrf-2..... Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2

PBS.....Buffer de fosfatos

PGC-1..... Coactivador-1 del receptor activado por proliferación de peroxisomas

PGC-1α... Coactivador-1α del receptor activado por proliferación de peroxisomas

PPAR..... Receptor activado por proliferación de peroxisomas

SFB.....Suero fetal bovino

SFN..... Sulforafano

SDS.....Sulfato duodecilo de sodio

Sirt1..... Sirtuína 1

Tfam-A... Factor de transcripción mitocondrial A

TGF-β.... Factor de crecimiento transformante β

TPA.....12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

Resumen.

La biogénesis mitocondrial comprende el crecimiento y la división de mitocondrias, por lo que requiere la coordinación entre la síntesis de proteínas nucleares, la replicación del ADN mitocondrial (mtDNA) y la fusión y fisión de las mitocondrias. Estos procesos se encuentran regulados por el coactivador-1 α del receptor activado por proliferación de peroxisomas (PGC-1 α). En el grupo de trabajo se reportó que el sulforafano (SFN), un activador de la vía de Nrf2, es capaz de inducir la muerte de células tumorales en cultivo así como de aumentar los niveles de PGC-1 α y, de la biogénesis mitocondrial. Es posible que otras moléculas con la misma capacidad de inducir la vía de Nrf2 puedan presentar un efecto antitumoral mediante la regulación de la biogénesis mitocondrial. El ácido nordihidroguaiarético (NDGA) es un compuesto de origen natural que ha sido caracterizado como un antioxidante bifuncional que atrapa radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO), y de inducir la expresión de enzimas antioxidantes por la activación del factor de transcripción Nrf2; además existen estudios que describen la actividad anticancerígena del NDGA.

En este trabajo se evaluó el efecto antitumoral del NDGA y su implicación en la regulación de la biogénesis mitocondrial. Para esto se trabajó con la línea de cáncer de vejiga T24 que fue incubada con el NDGA. Se realizaron ensayos de viabilidad celular en los que se observó una reducción de manera concentración dependiente después de 72 horas, así se observó que NDGA es capaz de inducir apoptosis después de 48 horas de tratamiento. Por otra parte se observó que el NDGA aumentó la producción de ERO y disminuyó el potencial de membrana

mitocondrial. Finalmente se encontró que el NDGA promovió disminución de la masa mitocondrial, y de los niveles de factores involucrados con la biogénesis mitocondrial tales como sirtuina 1 (Sirt1), PGC-1, el factor nuclear respiratorio 1 (NRF-1) y el factor de transcripción mitocondrial (Tfam-A), así como un aumento en los niveles de la proteína relacionada con la dinamina (Drp1), indicando fisión mitocondrial, y un desbalance en los niveles de mitofusina 1 (Mfn1), sugiriendo la desregulación de la fusión mitocondrial.

Con estos resultados se puede concluir que el NDGA es capaz de inducir daño celular mediante el aumento en las ERO y la disminución del potencial de membrana mitocondrial y por otro lado atenúa la vía de señalización de PGC-1 α , lo cual provoca la disminución de la masa mitocondrial y la inducción de apoptosis en la línea celular T24.

Introducción.

Biogénesis mitocondrial. Las mitocondrias son importantes para el metabolismo de las células eucariontes ya que en éstas se realiza la producción de ATP a partir del gradiente electroquímico generado por el transporte de electrones de la cadena respiratoria, además son componentes clave para el metabolismo de lípidos. En la célula, las mitocondrias pueden observarse como pequeños organelos individuales ó como una asociación de redes tubulares, dependiendo de las condiciones ambientales, el tipo celular y el tipo de organismo (Kusnetzov et al., 2009). La morfología y el mantenimiento de esta red dependen de los procesos dinámicos mitocondriales (Rafelski, 2013).

Entre estos procesos dinámicos se encuentra la biogénesis mitocondrial, la cual comprende el crecimiento y la división de mitocondrias ya existentes, por lo que requiere la coordinación entre la síntesis de proteínas nucleares, la replicación del ADN mitocondrial (mtDNA) y la fusión y fisión de las mitocondrias (Jornayvaz y Shulman, 2010).

La biogénesis mitocondrial está regulada por distintos factores que forman parte de una cascada de transcripción encabezada por el coactivador-1 α del receptor activado por proliferación de peroxisomas (PGC-1 α ; Puigserver et al., 1998). El PGC-1 α es activado transcripcionalmente por acción de los receptores activados por proliferación de peroxisomas (PPAR), y el factor de unión a AMP cíclico (CREB), cuando es fosforilado por la proteína cinasa A (PKA) o la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo IV (CaMKIV) dependiendo de los

niveles de AMP cíclico (cAMP) o calcio, respectivamente. A nivel postranscripcional PGC-1 α se regula por eventos de fosforilación mediados por la proteín-cinasa activada por mitógeno p38, Akt, la cinasa 1 S6, la proteín-cinasa activada por adenosín monofosfato (AMP, AMPK) y la cinasa 3 β de la glucógeno sintasa; metilación por la arginina-proteína metiltransferasa 1; acetilación por la lisina acetiltransferasa 2A; y desacetilación por la sirtuina 1 (Sirt1; Dominy et al., 2010; Villena, 2015). Además actúa como factor de regulación de transcripción activando al receptor α relacionado con el estrógeno (ERR α), el factor intensificador de miocitos (MEF-2), y a los factores nucleares respiratorios 1 y 2 (NRF-1, NRF-2), los cuales promueven la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam-A) conduciendo a la transcripción y replicación del mtDNA (Virbasius y Scarpulla, 1994). Se ha demostrado que la biogénesis mitocondrial puede ser inducida por la expresión de NRF-1 mediante acción de la hemo-oxigenasa-1 y la activación del factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2; Piantadosi et al., 2008). El efecto Warburg, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), mutaciones al mtDNA y el desarrollo de cáncer alteran la biogénesis mitocondrial (Boland et al., 2013).

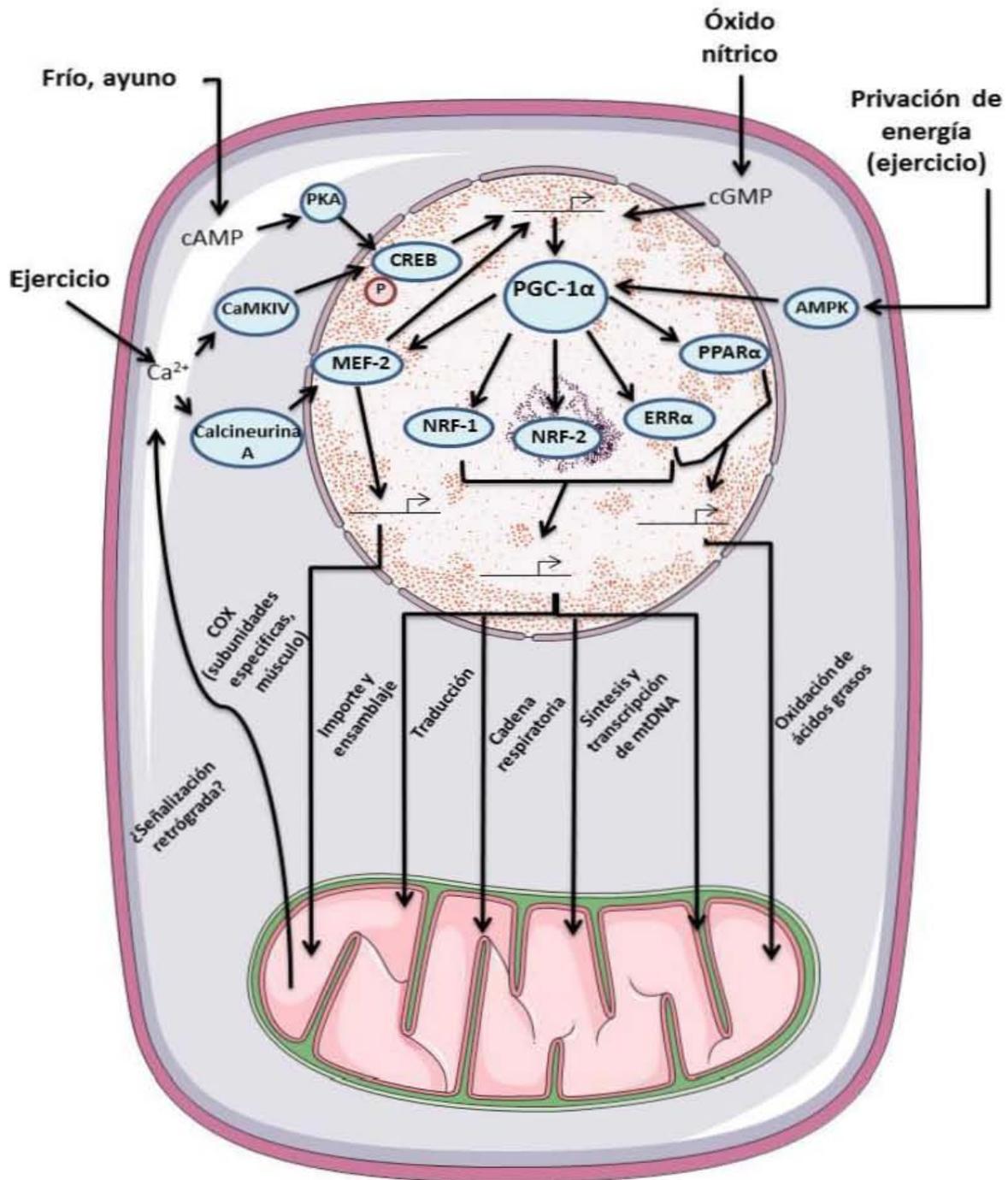


Figura 1. Esquema general de la vía de señalización para la biogénesis mitocondrial (Modificado de Scarpulla, 2008). La expresión de PGC-1 α se induce por el aumento en los niveles de cGMP y la proteína CREB fosforilada por PKA o

por CaMKIV. La localización nuclear de PGC-1 α induce la expresión de factores de transcripción como MEF-2, NRF-1 y 2, ERR α y PPAR α , que inducen la expresión de genes involucrados con la síntesis de proteínas mitocondriales.

El efecto Warburg explica el incremento en la glucólisis de células tumorales (Koppenol et al., 2011; Vander Heiden et al., 2009). Este aumento en el metabolismo de la glucosa promueve la sobrevivencia de las células tumorales mediante la regulación redox del citocromo c y la inhibición de la apoptosis (Vaughn et al., 2008).

Las EROs son producidas en diversos compartimientos celulares, principalmente en la mitocondria como consecuencia de la fosforilación oxidativa y del escape de electrones de la cadena respiratoria que reaccionan con el oxígeno o con iones metálicos, nitrógeno (Lagouge y Larsson, 2013). La producción de EROs se incrementa por deficiencias en el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones, las deshidrogenasas de piruvato, 2-oxoglutarato y glicerol 3-fosfato; el aumento del metabolismo mitocondrial asociado a la activación de AKT, y la expresión de oncogenes como Myc y Ras que disminuyen la actividad de los complejos I y III de la cadena respiratoria y los niveles de superóxido dismutasa (Boland et al., 2013; Brand, 2010; Hamanaka y Chandel, 2010).

En estudios previos se ha demostrado que las EROs producidas en la mitocondria son capaces de promover la tumorigénesis mediante la estabilización del factor inducible de hipoxia α (HIF-1 α), el daño a bases nitrogenadas, incremento en el flujo de calcio, inactivación de fosfatasas y la activación de los factores de transcripción Nrf2 y el factor nuclear potenciador de las cadenas

ligeras κ de las células B activadas (NF- κ B; Hamanaka y Chandel, 2010; Sena y Chandel, 2012).

Se han encontrado mutaciones homoplásicas en el genoma mitocondrial de células de tumores primarios y se han ligado al crecimiento de tumores y al desarrollo de metástasis, además dichas mutaciones pueden producir un incremento en la producción de EROs debido a la pérdida de función de las proteínas de la cadena transportadora de electrones (Polyak et al., 1998; Petros et al., 2005; Ishikawa et al., 2008).

La biogénesis mitocondrial aumenta en melanomas por el aumento en la expresión de PGC-1 α inducida por el factor transcripción específico de melanocitos (Haq et al., 2013; Vazquez et al., 2013), estos melanomas presentan un incremento en la expresión de proteínas y dependencia de metabolismo oxidativo (Vazquez et al., 2013). Además se ha descrito que p53 es capaz de inactivar la expresión de PGC-1 α , explicando posiblemente la reducción en la biogénesis durante el envejecimiento y el aumento de EROs y disfunción mitocondrial durante el desarrollo de cáncer cuando p53 presenta mutaciones (López-Otín et al., 2013; Sahin y DePinho, 2012).

La manera en que los cambios en el tamaño y la forma de la red mitocondrial afectan a la biología básica del cáncer, así como a la determinación del desarrollo del mismo, sugiere un potencial para el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas de esta enfermedad (Boland et al., 2013).

Antioxidantes y biogénesis mitocondrial. La evaluación del uso de antioxidantes sobre la biogénesis mitocondrial se encuentra descrita principalmente en modelos experimentales de prevención del daño oxidativo la adaptación al ejercicio aeróbico en músculo (Merry y Ristow, en prensa; Morrison *et al.*, 2015; Kerksick y Zuhl, 2015, Sun *et al.*, 2015), modelos de neuroprotección (Hagl *et al.*, en prensa; Mäkelä *et al.*, 2016), entre otros.

Se ha descrito que el sulforafano (SFN), un antioxidante indirecto capaz de activar la vía de Nrf2 y la inducción de enzimas antioxidantes, induce la apoptosis de células tumorales, relacionando este efecto al aumento de los niveles de PGC-1 α y la activación de la biogénesis mitocondrial, lo cual produce un aumento en la población de mitocondrias dañadas potenciando las señales pro-apoptóticas (Negrette-Guzmán *et al.*, 2013). Por otra parte, también se ha descrito que un análogo de la vitamina E, MitoVES, promueve la muerte de células tumorales mediante la inhibición de la respiración, la reducción del potencial de membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno, así como mediante la reducción de los niveles de Tfam-A y por tanto de la biogénesis mitocondrial (Truska *et al.*, 2015). Estos trabajos abren las puertas para la evaluación del efecto antitumoral por parte de otros antioxidantes a través de la vía de la biogénesis mitocondrial.

El ácido nordihidroguaiarético. El ácido nordihidroguaiarético (NDGA) es un metabolito secundario encontrado en abundancia en ejemplares de la especie *Larrea tridentata* (Moç & Seseé ex DC.) Coville (1893) perteneciente a la familia Zygophyllaceae (Arteaga *et al.*, 2005; Lü *et al.*, 2010); esta especie conocida

coloquialmente como “chaparral”, “creosote bush” o “gobernadora” se distribuye en el Norte de la República Mexicana y al Sur de los Estados Unidos y ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades renales y del hígado, como diurético, en el tratamiento de infecciones en las vías urinarias y enfermedades venéreas (Arteaga *et al.*, 2005).

El NDGA es un metabolito con características antioxidantes pues es capaz de atrapar anión peroxinitrito, radical hidroxilo, anión superóxido y ácido hipocloroso en sistemas *in vitro*. Además protege contra la nitración de tirosina inducida por ozono en pulmones de rata (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006), también se le ha descrito como un agente neuroprotector capaz de disminuir el estrés oxidativo causado por la acumulación del péptido β -amiloide (Goodman *et al.*, 1994). La actividad antioxidante del NDGA es capaz de atenuar el daño renal y la apoptosis inducidos en modelos de isquemia-reperfusión mediante la translocación de Nrf2 (Zúñiga-Toalá *et al.*, 2013). Así mismo protege contra el daño renal inducido por dicromato de potasio en ratas (Yam-Canul *et al.*, 2008), y el daño renal inducido por cisplatino (Lee *et al.*, 2009).

Además de sus características antioxidantes, el NDGA es efectivo en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer pues inhibe el crecimiento de las células cancerosas, induce apoptosis y la pérdida de función mitocondrial (Lü *et al.*, 2010; Hernández-Damián *et al.*, 2014).

En estudios recientes se ha demostrado que el NDGA es capaz de inhibir al receptor del factor de crecimiento de la insulina (IGF-1) así como de inhibir la

transcripción de genes inducida por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; *Li et al.*, 2009). Se ha probado también que el NDGA inhibe el crecimiento de tumores debido a su capacidad para promover la apoptosis en células de cáncer de mama, carcinoma pancreático y mielomas múltiples (*Lü et al.*, 2010), o mediante la inducción del arresto del ciclo celular en la línea SiHA de cáncer cervical, a través de la inducción de la acetilación de la histona H3 para promover la expresión de la proteína p21; la reactivación del gen p16INK4a metilado en células de cáncer de mama (T47D) y colonorectal (RKO); y la reactivación del gen de la E-cadherina metilado en células de cáncer de mama (*Gao et al.*, 2011; *Cui et al.*, 2008a; *Cui et al.*, 2008b). Otros informes indican una reducción en la viabilidad celular de líneas de cáncer de próstata por del aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediada por el NDGA (*Huang et al.*, 2004). El NDGA también previno el desarrollo de cáncer de piel inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en ratones mediante la reducción de la peroxidación lipídica, de la actividad de la xantina oxidasa, del contenido de peróxido de hidrógeno y del incremento en los niveles de glutatión reducido y el incremento en la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa (*Rahman et al.*, 2011).

Los efectos multifuncionales que presenta el NDGA lo convierten en una herramienta útil para el estudio terapéutico de distintas patologías, y el descubrimiento de sus efectos en el mantenimiento de la homeostasis celular podrían en un futuro promover su uso como tratamiento para distintas enfermedades (*Hernández-Damián et al.*, 2014).

Tabla 1. Efectos antitumorales del NDGA.

	Efecto	Referencia
Inhibición de receptores.	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición del receptor del factor de crecimiento de insulina. 	deLi <i>et al.</i> , 2009
Proapoptótico.	<ul style="list-style-type: none"> Inducción de apoptosis vía mitocondrial en células de cáncer de mama, cáncer pancreático. Aumento de Ca²⁺ intracelular. 	Lü <i>et al.</i> , 2010 Huang <i>et al.</i> , 2004
Regulación epigenética.	<ul style="list-style-type: none"> Acetilación de la histona H3. Desmetilación del gen p16INK4a. Desmetilación del gen de la E-cadherina 	Gao <i>et al.</i> , 2011 Cui <i>et al.</i> , 2008 a y b
Efecto antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición del desarrollo de cáncer de piel aumentando los niveles de enzimas antioxidantes y disminuyendo la peroxidación lipídica. 	Rahman <i>et al.</i> , 2011
Sinergia con cisplatino	<ul style="list-style-type: none"> Efecto sinérgico en el tratamiento con cisplatino en células de cáncer de pulmón y mamario. 	Soriano <i>et al.</i> , 1999 Plaza <i>et al.</i> , 2009

Cáncer de vejiga.

La vejiga es un órgano hueco, flexible y con paredes musculares, situado en la pelvis, su principal función es almacenar la orina formada en los riñones antes de ser expulsada a través de la uretra. La mayoría de los cánceres de vejiga se originan en la capa más interna de las paredes de este órgano, el epitelio transicional, y se esparce a lo largo de las demás paredes de la vejiga; así, el carcinoma de células transicionales es el tipo de cáncer de vejiga más común con 96% de incidencia respecto a otros tipos de cáncer de vejiga como el carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas y carcinomas de células pequeñas (What is bladder cancer?, 2016).

En el ámbito internacional, el cáncer de vejiga ocupa el noveno lugar de incidencia con 330,000 casos en el año 2000, representando el 4% de casos de cáncer en el mundo. En México, el cáncer de vejiga representó el 2.05% del total nacional en 2004, y se incrementó a 2.11% en 2006. Además, representó el 1.5% de defunciones por tumores en 2008 (SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México, 2011).

Justificación.

Se ha descrito que el uso de antioxidantes activadores del factor de transcripción Nrf2, tales como el sulforafano, presentan un efecto proapoptótico en líneas celulares de cáncer mediante la activación de la biogénesis mitocondrial, por lo que el NDGA, una molécula de naturaleza y comportamiento similar al sulforafano,

podría presentar este efecto proapoptótico en células tumorales y podría reforzar el conocimiento etnofarmacológico de este compuesto.

Hipótesis.

Si el NDGA disminuye la viabilidad de células tumorales, este efecto estará relacionado con la regulación de la biogénesis mitocondrial.

Objetivos.

Objetivo general. Determinar si el efecto apoptótico en células tumorales, ejercido por el NDGA, está relacionado a cambios en la regulación de la biogénesis mitocondrial.

Objetivos particulares.

1. Determinar la viabilidad de células de cáncer de epitelio de vejiga posterior al estímulo de NDGA.
2. Determinar el estado de las mitocondrias de las células cancerosas tras el estímulo de NDGA mediante la evaluación de la producción de EROs, el potencial de membrana mitocondrial y la densidad mitocondrial.
3. Determinar la expresión de los siguientes factores asociados a la biogénesis mitocondrial en las células tumorales: Sirt1, el coactivador-1 α del receptor activado por proliferación de peroxisomas (PGC-1), NRF-1, Tfam-A; así como los marcadores de dinámica mitocondrial mitofusina 1 (Mfn1) para fusión mitocondrial, y la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1) para fisión mitocondrial.

Método.

Materiales y reactivos. Para este trabajo se utilizaron: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina y TripleE Express de la marca *Gibco* (Waltham, MA, EUA).

De la marca *JT Baker* (Center Valley, PA, EUA) se utilizó: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato de sodio monobásico (Na₂HPO₄), fosfato de potasio dibásico (KH₂PO₄), cloruro de calcio (CaCl₂), carbonato de sodio (NaHCO₃), glicerol y cloruro de magnesio (MgCl₂).

De *Sigma* (San Luis, MO, EUA) se utilizaron glucosa, ácido 2-[4-(2-hydroxyetil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES), 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), Ditiotreitól (DTT), NDGA de *Larrea divaricata*, dimetil sulfóxido (DMSO), dihidroetidio (DHE), Tween, ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-dilidinitrilo)tetraacético (EDTA) sulfato-duodecilo de sodio (SDS), nonil fenoxipolietoxietanol (NP-40), desoxicolato de sodio y ácido clorhídrico (HCl).

De la marca *ThermoScientific* (Waltham, MA, EUA) se utilizó: 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio (MTT), diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de tetraetilbenzimidazolilcarbonina (JC-1).

El kit Alexa Fluor 488 con anexina V y yoduro de propidio de la marca *Roche* (Penzberg, Ale).

La sonda MitoTracker Green FM de la marca *Cell signaling* (Danvers, MA, EUA).

El reactivo de Bradford de la marca *Bio-rad* (Hercules, CA, EUA).

El sustrato quimioluminiscente para peroxidasa de rábano (HRP) y las membranas de polivinilo de la marca *EMD Millipore Immobilon* (Billerica, MA, EUA).

Las membranas de nitrocelulosa fueron de la marca *GE Healthcare* (Little Chalfont, Reino Unido).

De la marca *Santa Cruz Biotechnology* (Dallas, TX, EUA) los anticuerpos primarios para NRF-1, PGC-1, Tfam-A, Sirt1, Mfn1, Drp1 y tubulina.

Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP para ratón (SAB 100), conejo (SAB 300) y cabra (SAB 400) de la marca *Enzo* (Farmingdale, NY, EUA).

Los anticuerpos fluorescentes IRDye 800CW e IRDye 680RD para ratón, conejo y cabra de la marca *Li-Cor* (Lincoln, NE, EUA).

Cultivo celular. Para este estudio se empleó la línea celular de cáncer de epitelio de vejiga T24 (ATCC HTB4), las células se cultivaron en cajas Petri de 100 mm con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% y penicilina/ampicilina al 1%. Cuando las células alcanzaron del 80% al 90% de confluencia, el medio de cultivo fue retirado, las células se enjuagaron con amortiguador de fosfatos (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM) 1X. Las células se despegaron con TripLE Express y se realizó una dilución 1:2 para obtener dos cajas Petri nuevas. Previo a cada ensayo, las células se despegaron y resembraron en placas de 6, 12, ó 24 pozos; se dejaron crecer

las células 24 horas, posteriormente se les cambió el medio de cultivo por medio de ayuno (DMEM suplementado con SFB al 1% y penicilina/ampicilina al 1%), las células se incubaron durante 12 horas previo al estímulo. Para ensayos de más de 24 horas de estimulación, el medio de cultivo se cambió cada 24 horas.

Preparación del NDGA. Se prepararon alícuotas de NDGA 1 mM diluido en agua y DMSO al 0.05%; cada alícuota se filtró previo a cada ensayo.

Viabilidad celular. Para medir la viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 24 pozos que fueron tratados con 10-150 μM de NDGA durante 72 horas, cambiando el medio de ayuno y adicionando nuevo NDGA cada 24 horas. Concluido el tiempo de exposición se evaluó la viabilidad celular a partir de los ensayos de reducción de bromuro de MTT y de fluorescencia de FDA.

Reducción de MTT. Basado en la reducción del MTT a sales de formazán debido a la acción de deshidrogenasas celulares. Posterior al tiempo de estímulo con NDGA, se enjuagó cada pozo de la placa con PBS 1X y se les adicionó 300 μl de medio de ayuno y 40 μl de MTT 5 mg/ml y se incubó la placa durante dos horas. Posterior al tiempo de incubación se desechó el medio y los cristales morados de formazán precipitados fueron disueltos con 500 μl de HCl 0.1 N en isopropanol, se determinó la absorbancia de las muestras a 570 nm.

Fluorescencia de FDA. Para corroborar el efecto de NDGA en la viabilidad celular, se realizaron ensayos basados en la hidrólisis del FDA por parte de las esterasas de las células vivas (Zbigniew *et al.*, 1994). Después del tiempo de estimulación, el medio de cultivo se desechó y se adicionó FDA 0.01 mg/ml

preparado con amortiguador Ringer (NaCl 2.36 mM, CaCl₂ 0.153 mM, KCl 0.235 mM, NaHCO₃ 0.54 mM, KH₂PO₄ 0.06 mM, glucosa 0.5 mM, HEPES 0.26 g/ml). Se incubó la placa durante cinco minutos a 37°C, después se midió la fluorescencia a 488/530nm.

Determinación de apoptosis y muerte celular. Se evaluó el efecto del NDGA sobre la inducción de apoptosis, para esto las células se sembraron en placas de doce pozos y se incubaron con 10 µM ó 20 µM de NDGA durante 24, 48 o 72 horas, cambiando el medio de cultivo y el NDGA cada 24 horas. Los ensayos de apoptosis se realizaron con la Doctora Rebeca López Marure en la sección de Biología Celular en el Departamento de Fisiología del edificio de investigación del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Concluido el tiempo de tratamiento las células se enjuagaron con solución salina y se despegaron con TripLE Express, las células se pasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron cinco minutos a 1,300 g, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 50 µl del kit Alexa Fluor 488 que contiene anexina V. La anexina V se une a los residuos de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular de células en proceso de apoptosis, y yoduro de propidio, que se intercala en las bases nitrogenadas de células cuya envoltura nuclear se encuentra dañanda; se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente durante cinco minutos a 1,300 g, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 400 µl de solución salina, se determinó la fluorescencia de la anexina V a 488/499 nm y del yoduro de propidio 535/617 nm mediante citometría de flujo.

Potencial de membrana mitocondrial. Se evaluó el efecto del NDGA sobre el potencial de membrana mitocondrial con base al uso de la sonda JC-1, la cual se introduce en la célula y cuando la membrana mitocondrial se encuentra en condiciones normales entra a la mitocondria donde forma agregados que fluorescen de color naranja, mientras que cuando la membrana mitocondrial se encuentra despolarizada la sonda permanece en el citoplasma en forma de monómeros y fluoresce de color verde. Las células se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron con 10 y 20 μM de NDGA durante 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 y 72 horas. Después del tiempo de tratamiento se desechó el medio de cultivo y se adicionó medio de ayuno nuevo con 4 $\mu\text{l/ml}$ de la sonda JC-1 5 mg/ml. Se incubaron las muestras durante 20 minutos a 37°C, después se enjuagaron las células con PBS 1X, se despegaron las células con TripLE Express y se pasaron a placas negras en las que se determinó la fluorescencia de las muestras 485/528 nm y 485/590 nm. Posteriormente se realizó el cociente de fluorescencia 590/528 para determinar el estado del potencial de membrana mitocondrial.

Producción de EROs. Para evaluar el daño celular efectuado por el NDGA, se determinó la capacidad de producción de EROs basado en la fluorescencia del DHE que se intercala entre las bases nitrogenadas de la célula y cuando se oxida fluoresce de color rojo. Las células se sembraron en placas de 24 pozos y fueron tratadas con 10 y 20 μM de NDGA durante 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 y 72 horas, posterior al tiempo de tratamiento se desechó el medio de cultivo y se les adicionó medio de ayuno nuevo con 1 $\mu\text{l/ml}$ de DHE 5 mM. Se incubaron las muestras durante 20 minutos a 37°C, después de la incubación las muestras se enjuagaron

con PBS 1X y se obtuvieron imágenes mediante microscopía de epifluorescencia, las imágenes fueron analizadas con el programa NIS Elements con el que se determinó la intensidad de la fluorescencia por campo.

Densidad mitocondrial. Para determinar si el NDGA tiene un efecto en el número de mitocondrias de la célula se midió la densidad mitocondrial con la sonda MitoTracker Green, la cual se introduce a las mitocondrias. Las células se sembraron en placas de 12 pozos para la medición con citómetro de flujo, y se incubaron con 10 Y 20 μM de NDGA durante 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas. Concluido el tiempo de tratamiento con NDGA, las células se despegaron y recolectaron tubos Eppendorf, se centrifugaron las muestras a 1,300 g durante cinco minutos, se desecharon los sobrenadantes y los botones se resuspendieron con 100 μl de PBS 1X con MitoTracker Green FM 400 nM, las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente las células se centrifugaron a 1,300 g durante cinco minutos, los sobrenadantes se desecharon y las células se resuspendieron en 500 μl de PBS 1X, las muestras se leyeron en el citómetro de flujo midiendo la fluorescencia a 490 nm/516 nm.

Expresión de factores relacionados con la biogénesis y dinámica mitocondrial. Recolección de extractos celulares. Para evaluar el efecto del NDGA en la expresión de factores relacionados con la biogénesis mitocondrial se cultivaron células T24 en cajas Petri de 100 mm y se administraron con 10 μM de NDGA durante 2, 4, 6 y 8 horas. Terminado el tratamiento, las células se enjuagaron con PBS 1x frío adicionado con 1 μl de inhibidor de fosfatasas por tratamiento, posteriormente se adicionó amortiguador RIPA (Tris 50 mM, NP-40

1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, EDTA 2mM) 1x con inhibidor de proteasas para obtener un volumen final de 1 ml por tratamiento. Las células se despegaron de la caja mecánicamente con un raspador, el material colectado se almacenó en tubos eppendorf y se incubó en agitación una noche a 4°C; después del tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos, se colectó el sobrenadante que contiene los extractos de las células.

Cuantificación de proteínas. Se realizó por el método de Bradford. En placas de 96 pozos se realizó una dilución 2:160 de los extractos celulares en un volumen final de 160 µl, posteriormente se adicionaron 40 µl de reactivo de Bradford y se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se determinó la absorbancia de las muestras a 595 nm.

Western blot. Se cargaron 10 µg de proteínas de los extractos celulares en geles de poliacrilamida al 7.5% con SDS, utilizando 1 µl de amortiguador Laemmli (Tris 375 mM, SDS 9%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.03%) 6x por cada 10 µl de muestra como agente desnaturizante. Se hicieron migrar las proteínas en el gel durante una hora y media con una corriente de 100 volts. Posterior a la electroforesis se realizó la transferencia a membranas de polivinilo o de nitrocelulosa durante una hora y media con una corriente de 100 volts. Las membranas se bloquearon durante 30 minutos con una solución de 0.05 g/ml de leche en polvo comercial en buffer TBST (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris 19 mM, Tween 0.1%) 1x, posteriormente las membranas se enjuagaron con TBST 1x y se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en agitación.

Después, las membranas se enjuagaron con TBST 1x cada diez minutos durante treinta minutos y se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano correspondiente; las membranas se incubaron durante dos horas con el anticuerpo secundario y se volvieron a enjuagar con TBST 1x. Las membranas se incubaron con luminol y se revelaron en películas fotosensibles. También se utilizaron anticuerpos secundarios fluorescentes en membranas de nitrocelulosa las cuales se revelaron con el fotodocumentador Odissey Sa a 700 y 800 nm.

Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de cada grupo estudiado. Se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas para determinar la realización de pruebas paramétricas o no paramétricas. Los grupos se compararon con ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey para definir los grupos significativamente diferentes. Los grupos que fueron diferentes con una $p > 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

Resultados.

Viabilidad celular. Para determinar si el NDGA es antitumoral, se inició evaluando su efecto en la viabilidad celular de la línea T24 de cáncer de vejiga. Se encontró que el NDGA redujo significativamente la viabilidad de las células T24 después de 72 horas de tratamiento respecto al control, a partir de 10 μ M, en donde el porcentaje de disminución es de 22.8% con los ensayos de reducción de MTT. De manera similar, con los ensayos de FDA se encontró que el NDGA disminuyó la viabilidad celular en la línea T24 después de 72 horas, sólo que esta vez la

reducción de viabilidad fue significativa a partir de 5 μM , en donde la disminución del porcentaje de viabilidad fue del 33.05% respecto al control (Figura 2). A partir de estos resultados se decidió trabajar con 10 y 20 μM .

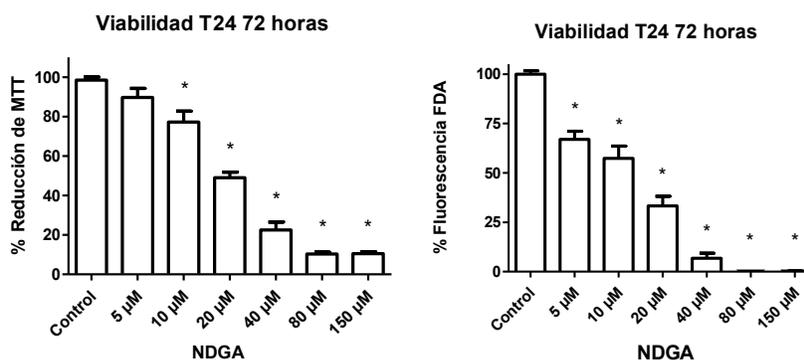


Figura 2. El NDGA disminuyó la viabilidad celular de la línea T24. Viabilidad celular de la línea T24, se observa que la reducción de la viabilidad fue significativa a partir de 10 μM con el ensayo de reducción de MTT y a partir de 5 μM con el ensayo de FDA (* $p < 0.05$ respecto al control ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey, $n=9$).

Apoptosis. Para confirmar los resultados de viabilidad celular y aproximar el tipo de daño que el NDGA induce en células tumorales, se evaluó la apoptosis en la línea T24. Aquí, el NDGA indujo un aumento en el porcentaje de población celular que presentó marcas de apoptosis temprana y tardía además de una disminución en el porcentaje de células vivas (Figura 3A). La disminución de células vivas fue significativa en los grupos tratados con 10 μM de NDGA por 72 horas, así como 20 μM de NDGA por 48 y 72 horas; estos resultados correlacionan con los ensayos de viabilidad celular (Figura 3B). Por otra parte, las células en apoptosis temprana presentaron un aumento significativo en los grupos tratados con 10 μM y 20 μM de NDGA a las 72 horas (Figura 3C) y las células en apoptosis tardía presentaron un

aumento significativo en los grupos tratados con 20 μM de NDGA después de 48 y 72 horas (Figura 3D).

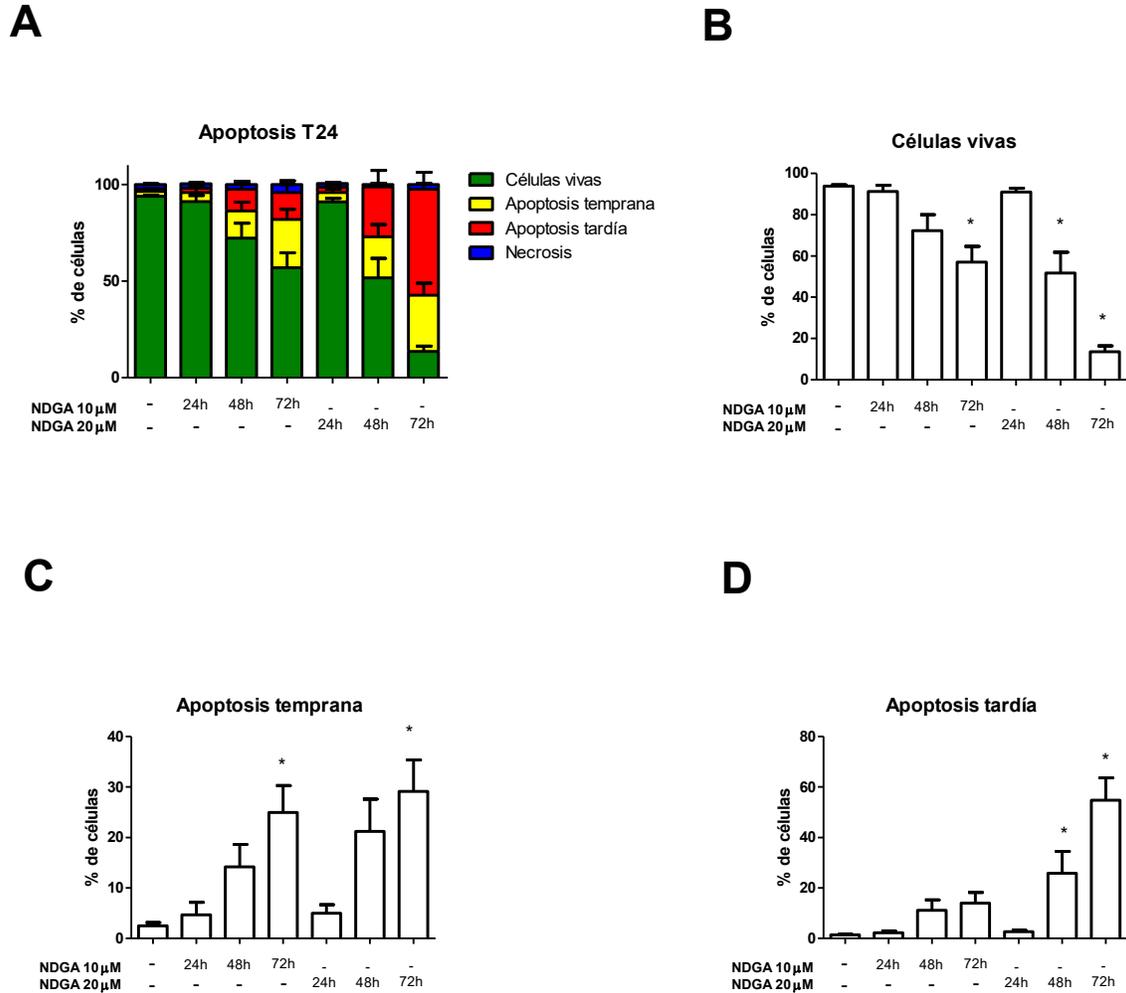
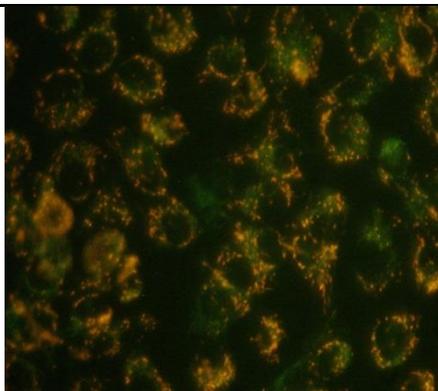


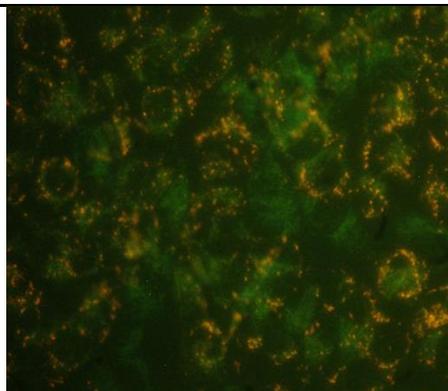
Figura 3. El NDGA indujo apoptosis en la línea T24. **A**, comparación de toda la población celular y sus subpoblaciones obtenidas con la medición de apoptosis. **B**, porcentaje de población de células vivas tras los tratamientos de NDGA, se observó una disminución tiempo dependiente significativa después de 72 horas con 10 μM de NDGA y después de 48 y 72 horas con 20 μM de NDGA. **C**, porcentaje de población de células en apoptosis temprana, se observó un aumento en el porcentaje de células con esta característica en los grupos tratados con 10 μM y 20 μM de NDGA después de 72 horas. **D**, porcentaje de células en apoptosis tardía, se observó un aumento en el número de células con esta característica significativo en los grupos tratados con 20 μM de NDGA después de

48 y 72 horas (* $p < 0.05$ respecto al control, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey, $n=12$).

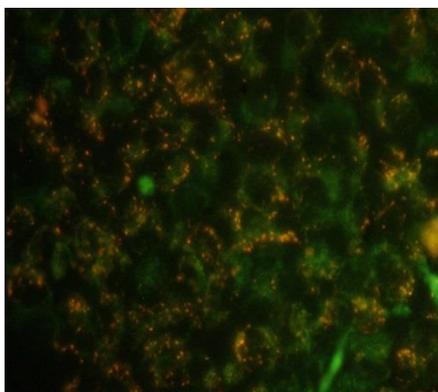
Potencial de membrana mitocondrial. Tomando en cuenta la reducción de la viabilidad celular, se decidió evaluar el efecto del NDGA en otros parámetros que indicaran daño celular en periodos de tiempo más cortos, para ello se determinó el potencial de membrana mitocondrial. Se encontró que 20 μM de NDGA disminuyó el potencial de membrana mitocondrial. La disminución del potencial de membrana mitocondrial se observó desde la primera hasta la sexta hora de tratamiento con NDGA. Adicionalmente, se observó una recuperación del potencial de membrana mitocondrial a partir de las ocho horas. Por otra parte, se observó que después de 24 horas con NDGA los pozos no tenían la misma cantidad de células que tenían los pozos del grupo control (Figura 4, Figura 5).



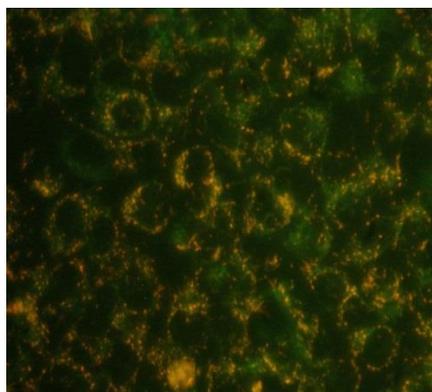
Control 40X



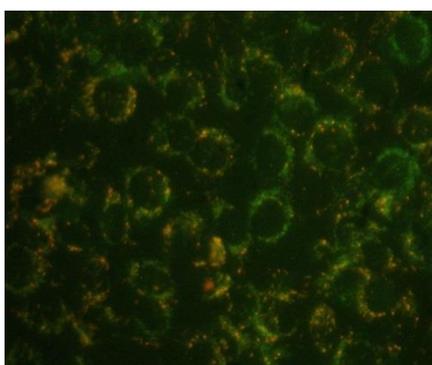
H₂O₂ 40X



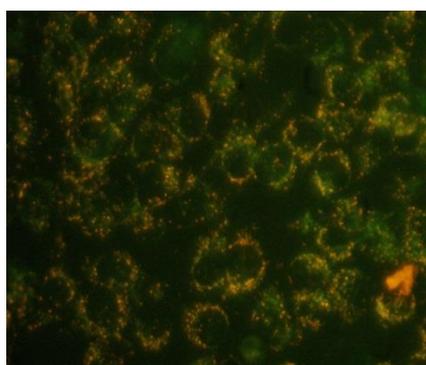
NDGA 20 μ M 1 h 40X



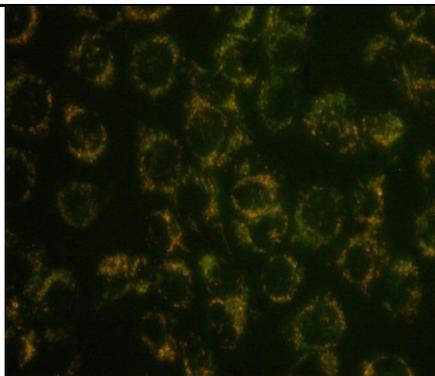
NDGA 20 μ M 3 h 40X



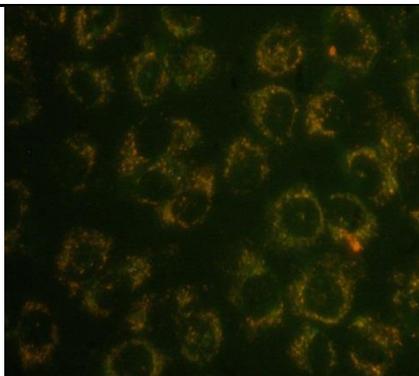
NDGA 20 μ M 6 h 40X



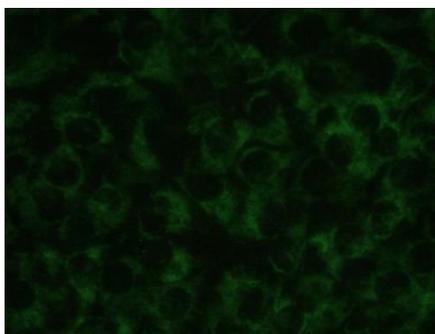
NDGA 20 μ M 8 h 40X



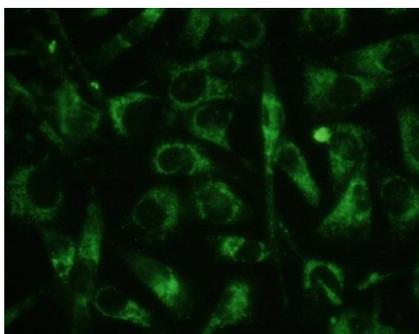
NDGA 20 μ M 12 h 40X



NDGA 20 μ M 24 h 40X



NDGA 20 μ M 48h 40X



NDGA 20 μ M 72h 40X

Figura 4. Fotografías del ensayo de potencial de membrana mitocondrial tomadas en el microscopio.

Potencial de membrana mitocondrial

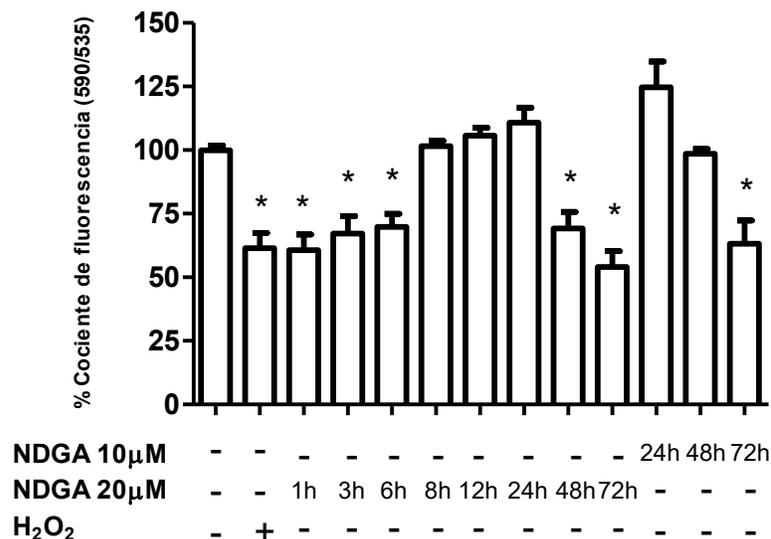
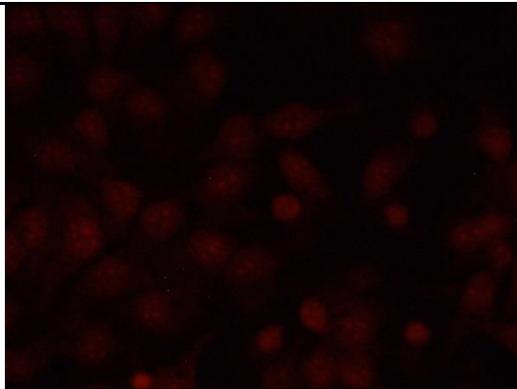
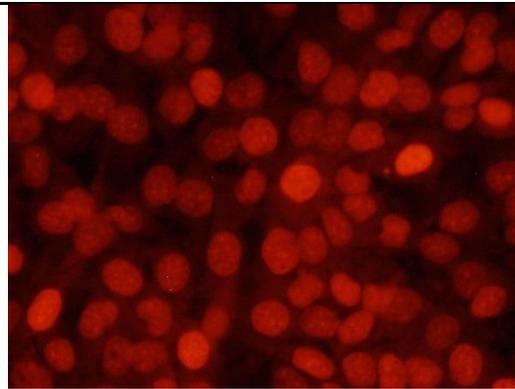


Figura 5. El NDGA promovió la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Cocientes de fluorescencia naranja/verde del JC-1 en células T24 tratadas con 20 μM de NDGA. Se observaron disminuciones en este cociente desde la primera hasta la sexta hora de tratamiento, posteriormente el cociente se recupera indicando una recuperación en el potencial de membrana mitocondrial a partir de las ocho horas de tratamiento (* $p < 0.05$ respecto al control, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey, $n=9$).

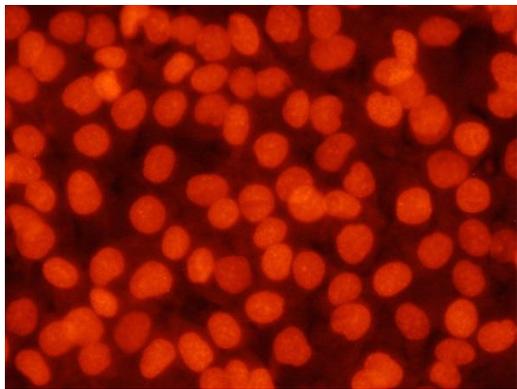
Producción de EROs. Continuando con la determinación de estrés celular inducido por el NDGA, se midió la producción de EROs. Se demostró un aumento observable en la intensidad de la fluorescencia de los pozos de los grupos tratados con NDGA con las fotografías obtenidas (Figura 6); además, el análisis de imágenes reveló que 10 μM de NDGA aumentó los niveles de ERO a partir de las tres horas de tratamiento y los niveles altos de especies reactivas de oxígeno se mantuvieron a tiempos largos (Figura 7).



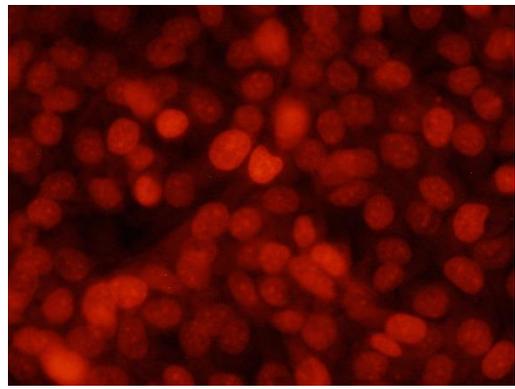
Control 40X



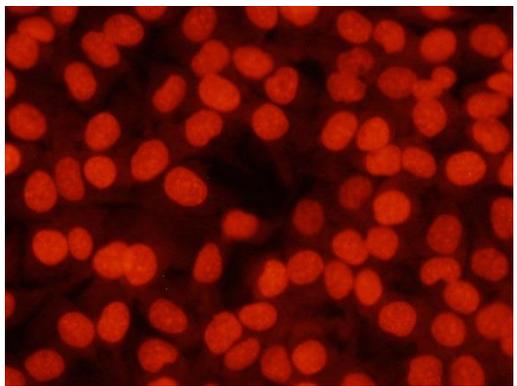
NDGA 10 μM 24 h 40X



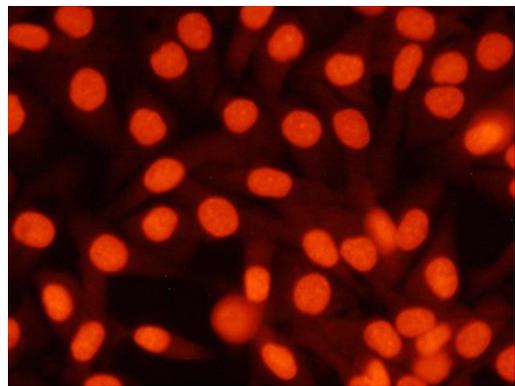
NDGA 10 μM 48 h 40X



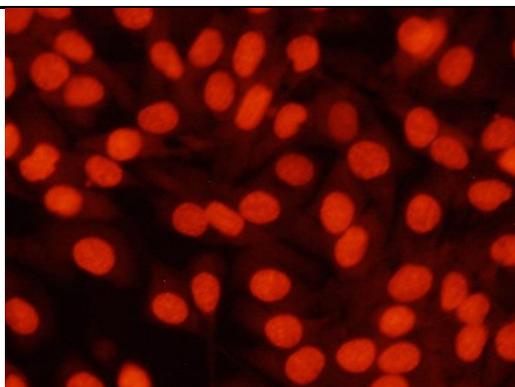
NDGA 10 μM 72 h 40X



NDGA 20 μM 24 h 40X



NDGA 20 μM 48 h 40X



NDGA 20 μ M 72 h 40X

Figura 6. Imágenes obtenidas para el análisis de producción de especies reactivas de oxígeno. Se observa que la fluorescencia roja se intensifica a partir de 24 horas de tratamiento con 10 μ M o 20 μ M de NDGA respecto al control.

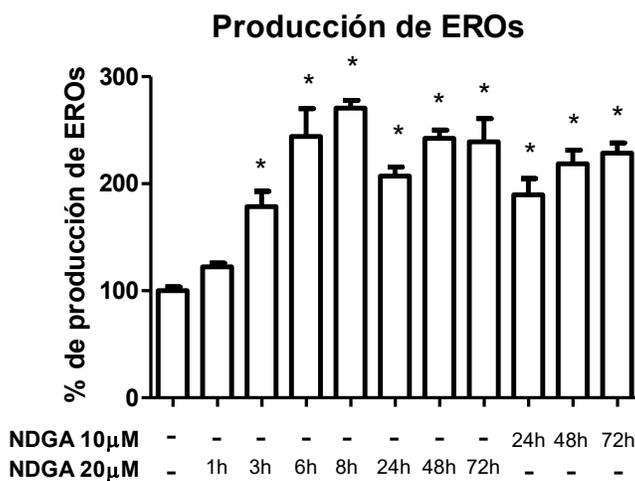


Figura 7. El NDGA indujo el aumento en la producción de EROs. Producción de especies reactivas de oxígeno a partir de la fluorescencia del dihidroetidio, se observó un aumento en la producción de EROs en todos los grupos con tratamiento de NDGA, este aumento fue significativo para el grupo con 10 μ M de NDGA a 48 horas (* p <0.05 respecto al control, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. n =6).

Densidad mitocondrial. Para determinar el papel del NDGA en la biogénesis mitocondrial, se inició midiendo la densidad mitocondrial de las células T24. Se

demostró que la densidad mitocondrial en las células T24 disminuyó significativamente a partir de las dos horas de tratamiento con 10 μM de NDGA, asimismo, la densidad mitocondrial disminuyó significativamente a partir de las 24 horas con 20 μM de NDGA (Figura 8).

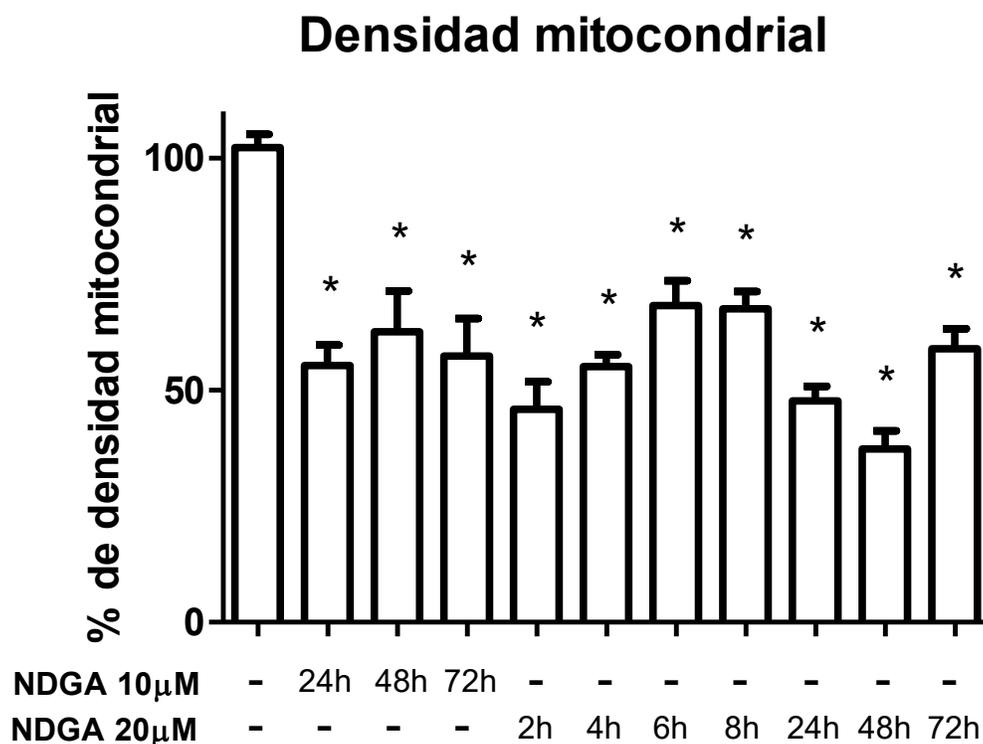


Figura 8. El NDGA disminuyó la masa mitocondrial de las células T24. Se observó que la fluorescencia emitida por la sonda MitoTracker Green disminuyó de manera significativa con 10 μM y 20 μM de NDGA (* $p < 0.05$ respecto al control. ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey $n=9$).

Western blot. Finalmente, se determinó el efecto del NDGA en la expresión de factores relacionados con la biogénesis mitocondrial mediante western blot. El tratamiento con 20 μM de NDGA disminuyó los niveles de los factores involucrados en la biogénesis mitocondrial, PGC-1, NRF-1 y Tfam-A, a partir de

las dos horas, y Sirt1 disminuyó significativamente tras dos, seis y 72 horas de incubación. Por otra parte, Mfn1 y Drp1 variaron a lo largo del tiempo de este trabajo, sugiriendo desbalances en los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Figura 9).

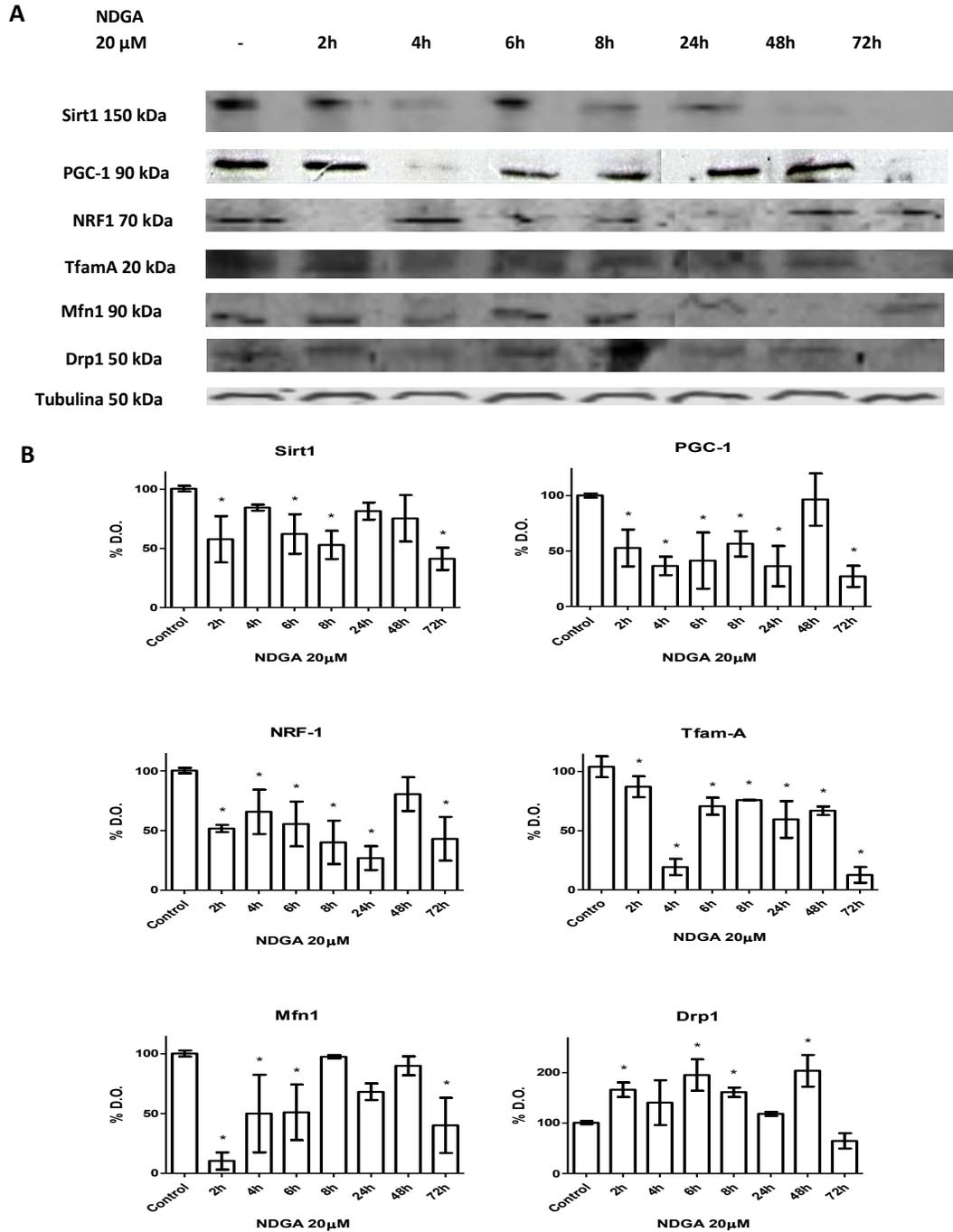


Figura 9. El NDGA indujo la disminución de los marcadores de biogénesis mitocondrial y el aumento de marcadores de fisión mitocondrial. A) Imágenes representativas de los western blots. B) Se muestra el análisis de densitometría de los western blot para Sirt1, PGC-1, NRF-1, Tfam-A, Mfn1 y Drp1 en las células T24 incubadas con 20 μ M de NDGA. Se encontró que los niveles de proteína de PCG-1, de NRF-1 y Tfam-A disminuyeron a partir de las 2 horas de tratamiento, la disminución de Sirt1 también se observó aunque no de manera tiempo-

dependiente. Se observó una tendencia a la disminución de Mfn1 y un aumento de Drp1 (* $p < 0.05$ respecto al control. ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. $n=4$)

Discusión.

En este trabajo se demostró que el NDGA es tóxico en células tumorales de vejiga. Tanto los ensayos de reducción de MTT y FDA así como la medición de apoptosis indican que el NDGA disminuyó la viabilidad significativamente después de 72 horas de tratamiento a partir de una concentración de 10 μM (Figuras 2, 3, 4). Estos resultados correlacionan con el efecto descrito del NDGA sobre otras líneas celulares como la SKBR3 de cáncer de mama en donde la viabilidad celular de esta línea disminuyó aproximadamente 50% después de 72 horas de tratamiento con NDGA 25 μM (Rowe *et al.*, 2008), y las líneas de adenocarcinoma TA3 y TA3-MTX-R en donde la IC_{50} , tras 48 horas de tratamiento, fue de $11.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$ y $17.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$, respectivamente (Plaza *et al.*, 2009).

Se encontró una disminución en el potencial de membrana mitocondrial entre la primera y la sexta hora de tratamiento con NDGA (Figura 7). Estos resultados sugieren que uno de los blancos celulares del NDGA para la disminución de la viabilidad celular es la mitocondria. Existen informes en donde el NDGA es capaz de afectar al potencial de membrana mitocondrial a partir de las 4 horas de tratamiento en células hematopoyéticas de ratón (Biswal *et al.*, 2000) y en células de cáncer colorrectal (Hausott *et al.*, 2003). Estos informes también describen que el NDGA es capaz de inducir apoptosis vía mitocondrial mediante el aumento de los niveles de EROs y la inhibición de la proteína antiapoptótica bcl_x ;

lo cual también concuerda con los resultados aquí descritos acerca de la inducción de la apoptosis y la producción de EROs (Figura 3 y 5).

Asimismo, se demostró que el NDGA es capaz de disminuir la densidad mitocondrial de las células T24, la disminución de la densidad mitocondrial se encuentra directamente ligada con la biogénesis mitocondrial, por lo que se evaluó la expresión de factores ligados con este proceso, los ensayos demostraron que la incubación con 20 μ M de NDGA disminuyó los niveles de proteína de PGC-1, de NRF-1 y de Tfam-A a partir de las dos horas, esta disminución se mantuvo durante todos los tiempos de este trabajo excepto a 48 horas. Además, se observó la disminución de Sirt1, la cual promueve la actividad transcripcional de PGC-1 (Villena, 2015). La disminución en los niveles de proteína de estos factores, indican que la biogénesis mitocondrial se bloquea y esto se refleja en la disminución de la densidad mitocondrial.

Finalmente, se evaluaron los niveles de proteína de Mfn1, indicador de fusión mitocondrial, y de Drp1, indicador de fragmentación mitocondrial. En el caso de Mfn1 se observó la disminución de los niveles de proteína de dos a seis y tras 72 horas de incubación, mientras que los niveles de proteína aumentaron tras dos, seis, ocho y 48 horas de incubación. Estos resultados sugieren un desbalance en la dinámica mitocondrial.

En conjunto los resultados presentados demostraron que el NDGA induce un daño oxidativo que promueve daño mitocondrial, así como afectaciones a la cascada de señalización de la biogénesis mitocondrial, promoviendo la

disminución de la masa mitocondrial a partir de las dos horas de incubación, lo cual, tras 72 hora de incubación promovió el aumento de células apoptóticas y la disminución de la viabilidad celular.

Conclusiones.

El NDGA incrementó la producción de EROs y la desestabilización del potencial de membrana mitocondrial a tiempos cortos; y atenuó la expresión de factores como Sirt1, PGC-1, NRF-1 y Tfam-A, lo cual se refleja en la reducción de la densidad mitocondrial. El estrés celular, el bloqueo de la biogénesis mitocondrial y la fragmentación de la red mitocondrial a lo largo de 72 horas promovieron la disminución de la viabilidad celular y la inducción de apoptosis en la línea T24.

El efecto de la disminución de PGC-1 y de la biogénesis mitocondrial en la muerte de células tumorales demostrado aquí, corrobora la importancia de esta vía en la supervivencia de líneas tumorales ya reportadas. Por otra parte, la toxicidad en células tumorales de vejiga demostrada en este trabajo provee la base para realizar un modelo *in vivo* y demostrar el efecto del NDGA como posible agente quimioterapéutico para estas enfermedades.

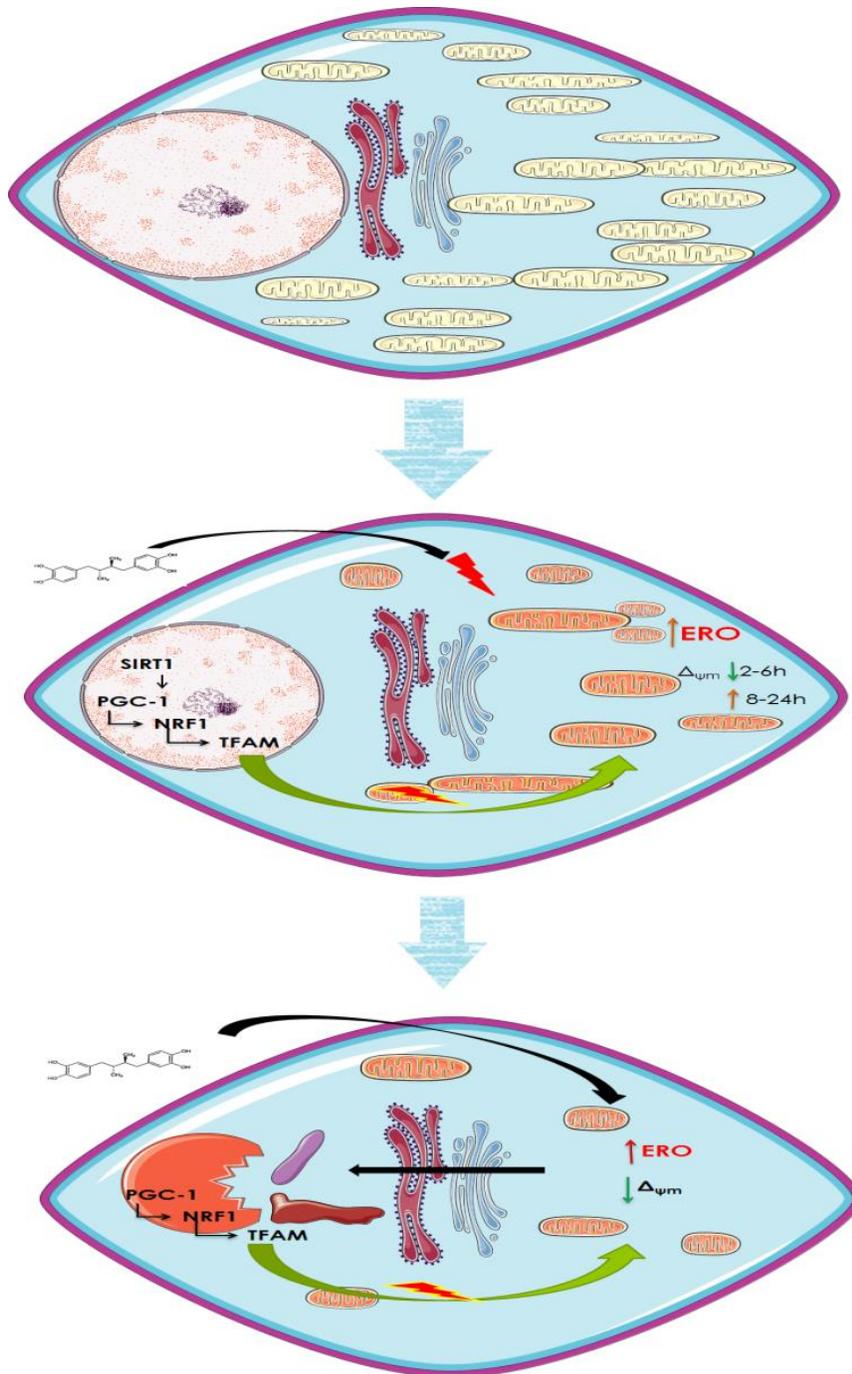


Figura 10. Esquema general del efecto del NDGA en la biogénesis mitocondrial de las células T24. A tiempos cortos el NDGA promovió el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, la disminución del potencial de membrana mitocondrial, así como la disminución de la densidad mitocondrial mediada por la disminución de la expresión de factores de biogénesis mitocondrial. El estrés celular se mantuvo a lo largo del tiempo lo que provocó la inducción de apoptosis de las células T24.

Referencias.

- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of ethnopharmacology*. 2005, 98(3): 231-9.
- Biswal SS, Datta K, Shaw SD, Feng X, Robertson JD, Kehrer JP. Glutathione oxidation and mitochondrial depolarization as mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in lipoxygenase-deficient FL5.12 cells. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2000, 53(1):77-83.
- Boland LB, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2013, 3:292 doi: [10.3389/fonc.2013.00292](https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00292).
- Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*. 2010, 45(7-8):466-72.
- Cui Y, Lu C, Liu L, Sun D, Yao N, Tan S, Bai S, Ma X. Reactivation of methylation-silenced tumour suppressor gene p16INK4a by nordihydroguaiaretic acid and its implication in G1 cell cycle arrest. *Life sciences*. 2008a, 82(5-6): 247-55.
- Cui Y, Lu C, Kang A, Liu L, Tan S, Sun D, Hu J, Ma X. Nordihydroguaiaretic acid restores expression of silenced E-cadherin gene in human breast cancer cell lines and xenografts. *Anticancer drugs*. 2008b, 19(5): 487-94.
- Dominy JE Jr, Lee Y, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Nutrient-dependent regulation of PGC-1alpha's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5. *Biochimica et Biophysica acta*. 2010. 1804(8): 1676-83.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J.

- Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxyxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research*. 2006, 40(5): 523-33.
- Gao P, Zhai F, Guan L, Zheng J. Nordihydroguaiaretic acid inhibits growth of cervical cancer SiHa cells by up-regulating p21. *Oncology letters*. 2011, 2(1): 123-128.
- Goodman Y, Steiner MR, Steiner SM, Mattson MP. Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Research*. 1994, 654(1): 171-6.
- Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences*. 2010, 35(9): 505-13.
- Hagl S, Berressem D, Grewal R, Sus N, Frank J, Eckert GP. Rice bran extract improves mitochondrial dysfunction in brains of aged NMRI mice. *Nutritional neuroscience*. 2015, Aug. 4.
- Haq R, Shoaq J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, Wargo JA, Song JS, Fisher DE, Arany Z, Widlund HR. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*. 2013, 23(3): 302-15.
- Hausott B, Greger H, Marian B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2003, 129(10): 569-76.
- Hernández-Damián J, Andérica-Romero C, Pedraza-Chaverri J. Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid. *Archiv der Pharmazie*. 2014, 347(10): 685-97.
- Huang JK, Chen WC, Huang CJ, Hsu SS, Chen JS, Cheng HH, Chang HT, Jiann BP, Jan CR. Nordihydroguaiaretic acid-induced Ca²⁺ handling and

- cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Life sciences*. 2004, 75(19): 2341-51.
- Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*. 2008, 320(5876): 661-4.
- Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*. 2010, 47:69-84. doi: 10.1042/bse0470069.
- Kerksick CM, Zuhl M. Mechanisms of Oxidative Damage and Their Impact on Contracting Muscle. En Lamprecht M. editor. *Antioxidants in sport nutrition*. CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Boca Raton, Florida, Estados Unidos. Capítulo 1.
- Koppenol WH, Bounds PL, Wang CV. Otto Warburg's contribution to current concepts of cancer metabolism. 2011, 11(5): 325-37.
- Kusnetzov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2009 41(109): 1928-39.
- Lagouge M, Larsson NG. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine*. 2013, 273(6): 529-43.
- Lee DW, Kwak IS, Lee SB, Song SH, Seong EY, Yang BY, Lee MY, Sol MY. Post-treatment effects of erythropoietin and nordihydroguaiaretic acid on recovery from cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Journal of Korean medical science*. 2009, 24 Suppl:S170-5. doi: 10.3346/jkms.2009.24.S1.S170.

- Li F, Pham JD, Anderson MO, Youngren JF. Nordihydroguaiaretic acid inhibits transforming growth factor beta type receptor activity downstream signaling. *European Journal of Pharmacology*. 2009, 616(1-3): 31-7.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of ageing. *Cell*. 2013, 153(6): 1194-217.
- Lü JM, Nurko J, Weakley SM, Jiang J, Kougias P, Lin PH, Yao Q, Chen C. 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*. 2010, 16(5): RA93-100.
- Mäkelä J, Tselykh TV, Kukkonen JP, Eriksson O, Korhonen LT, Lindholm D. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) agonist is neuroprotective and stimulates PGC-1 α expression and CREB phosphorylation in human dopaminergic neurons. *Neuropharmacology*. 2016, 102: 266-75.
- Merry TL, Ristow M. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *Journal of physiology*. 2015, Dic. 7 doi: 10.1113/JP270654.
- Morrison D, Hughes J, Della Gatta PA, Mason S, Lamon S, Russell AP, Wadley GD. Vitamin C and E supplementation prevents some of the cellular adaptations to endurance-training in humans. *Free radical biology & medicine*. 2015, 89: 852-62.
- Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free radical biology and medicine*. 2013, 65: 1078-89.
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC. mtDNA

- mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005, 102(3): 719-24.
- Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf-2 mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. Circulation research. 2008, 103(11): 1232-40.
- Plaza C, Pavani M, Arava-Maturana R, Pezoa J, Mava JD, Morello A, Becker MI, DE Ioannes A, Ferreira J. Chemosensitizing effects of nordihydroguaiaretic acid and its tetra-acetylated derivative on parental and multiresistant TA3 mouse mammary adenocarcinoma cells. In vivo. 2009 23(6): 959-67.
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Wilson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nature Genetics. 1998, 20(3): 291-3.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell. 1998, 92(6): 829-39.
- Rafelski SM. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. BMC Biology. 2013, 11:71. doi: 10.1186/1741-7007-11-71.
- Rahman S, Ansari RA, Rehman H, Parvez S, Raisuddin S. Nordihydroguaiaretic acid from creosote bush (*Larrea tridentata*) mitigates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammatory and oxidative stress responses of tumor promotion cascade in mouse skin. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2011, 2011:734785. doi: 10.1093/ecam/nep076.

- Rowe DL, Ozbay T, Bender LM, Nahta R. Nordihydroguaiaretic acid, a cytotoxic IGF-IR/HER2 inhibitor in Trastuzumab resistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008, 7(7): 1900-1908.
- Sahin E, De Pinho RA. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2012, 13(6): 397-404.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews*. 2008, 88(2): 611-638.
- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*. 2012, 48(2): 158-67.
- SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. (2011). Recuperado el 6 de abril de 2016, de http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_M%C3%A9xico.pdf
- Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr, Chou TC. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer research*. 1999, 59(24): 6178-84.
- Sun Y, Qi Z, He Q, Cui D, Qian S, Ji L, Ding S. The effect of treadmill training and N-acetyl-L-cysteine intervention on biogenesis of cytochrome c oxidase (COX). *Free radical biology and medicine*. 2015, 87: 326-35.
- Truska J, Dong LF, Rohlena J, Stursa J, Vondrusova N, Goodwin J, Nguyen M, Kluckova K, Rychtarcikova Z, Lettlova S, Spacilova J, Stapelberg M, Zoratti M, Neuzil J. Mitochondrially targeted vitamin E succinate modulates expression of mitochondrial DNA transcripts and mitochondrial biogenesis. *Antioxidants & redox signaling*. 2015, 22(11): 883-900.

- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CV. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cellular proliferation. 2009, 324(5930): 1029-33.
- Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nature Cell Biology*. 2008, 10(12): 1477-83.
- Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun C, Pierce K, Clish CB, Granter SB, Widlund HR, Spiegelman BM, Puigserver P. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell*. 2013, 23(3): 287-301.
- Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *The FEBS journal*. 2015, 282(4): 647-72.
- Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, 91(4): 1309-13.
- What is bladder cancer? (2016). Recuperado el 6 de abril de 2016, de <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-what-is-bladder-cancer>.
- Yam-Canul P, Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Villanueva C, Pedraza-Chaverrí J. Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2008, 46(3): 1089-96.

Zbigniew Darzynkiewicz, J. Paul Robinson, Harry A. Crissman. 1994. Methods in cell Biology. Vol. 41. Flow cytometry. Part A. Second edition. Academic Press Inc. USA.

Zúñiga-Toalá A, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepes S, Torres I, Pinzón E, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Nordihydroguaiaretic acid induces Nrf2 nuclear translocation in vivo and attenuates renal damage and apoptosis in the ischemia and reperfusion model. *Phytomedicine, International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 2013, 20(10): 775-9.