



Casa abierta al tiempo



POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Influencia de la glicina y de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* sobre la expresión los genes de las enzimas antioxidantes en células Jurkat

T E S I S

QUE PARA OBTENER:

EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

B.E. HILDA LOZA RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES:

Dr. Daniel Hernández Saavedra.

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

ASESORA:

Dra. Margarita Díaz Flores.

México, D.F.

2010

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR

Dr. Daniel Hernández Saavedra

Investigador Asociado D

Laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI

CO-DIRECTOR

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Laboratorio de Farmacología

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

ASESORA

Dra. Margarita Díaz Flores

Investigadora Asociada D

Laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI

Este trabajo fue realizado en la UIM en Bioquímica, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, en colaboración con el Laboratorio de Farmacología, UAM-Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Daniel Hernández Saavedra y el Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar, y con la asesoría de la Dra. Margarita Díaz Flores.

La maestría en Biología Experimental de la UAM-I se encuentra dentro del padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) con número de registro UAM-I:309-1 y clave del Programa PIFOP-CONACyT-SEP C-PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental recibí una beca otorgada por el CONACyT, con número de registro (CVU/becario) 229804, en el período 2007- 2009.

Agradezco al IMSS por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 99093789.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel Hernández Saavedra

Por ser un gran ejemplo para mí, por guiarme en este proyecto.

Por aconsejarme y por enseñarme que todo se puede siempre

que se ponga el mejor de los esfuerzos.

Muchas Gracias Dr. Daniel.

Al Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar

Por el apoyo y manejo del trabajo y por alentarme en todo momento para

continuar esforzándome cada día un poco más.

A la Dra. Margarita Díaz Flores

Por ser quien me brindo su consejo y su apoyo incondicional.

Por ser un gran ejemplo a seguir y por la paciencia que me brindo

durante todo este proyecto.

Gracias.

Agradezco a mis amigas

Hayde, Claudia, Paulina

porque juntas hemos caminado y vivido esta etapa tan maravillosa

Porque somos amigas en todo momento y gracias a su apoyo, comprensión y cariño

hoy se que todo se puede.

Gracias, las quiero mucho.

A Mario

Por el apoyo que me brindas y por tu sincera e incondicional amistad.

A mis amigos de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Nayeli, Fernanda, Selene, Ángeles, Gerardo y Javier.

Por sus consejos, apoyo y amistad.

A todos los miembros de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, HE del CMNSXXI.

A la Dra. Edith Cortés Barberena del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAMI.

A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAMI.

DEDICATORIAS

Dedico muy especialmente mi trabajo a mis padres Juan y Dominga, quienes todos los días me enseñan que un esfuerzo siempre se ve recompensado, por el gran amor que me tienen y la confianza que han depositado en mí. Muchas Gracias por ser mis papas y por apoyarme siempre. Los amo.

A mi hermano Miguel Ángel, quien siempre ha estado conmigo, alentándome cuando las circunstancias son adversas, quien me ha apoyado incondicionalmente durante mi vida. Muchas Gracias Hermanito, te quiero y siempre estaré cuando me necesites

A Misael porque has recorrido junto conmigo este camino, por toda tu paciencia, apoyo y comprensión. Porque soy feliz a tu lado y porque eres el amor de mi vida, muchas gracias por estar a mi lado.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Influencia de la glicina y de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* sobre la expresión los genes de las enzimas antioxidantes en células Jurkat**”.

Jurado de Examen

Presidente

Dra. Mina Konisberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Secretario

Dra. Margarita Díaz Flores

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Vocal

Dra. Clara Ortega Camarillo

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Vocal

Dr. Julio César Almanza Pérez

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXIGENO (ERO)	1
1.2 PRINCIPALES FUENTES GENERADORAS DE ERO	1
1.3 EFECTOS NOCIVOS DE ERO	4
1.3.1 Daño a lípidos	4
1.3.2 Daño a proteínas	4
1.3.3 Daño al ADN	5
1.3.4 Daño a carbohidratos	6
1.4 ESTRÉS OXIDATIVO	6
1.5 MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	7
1.5.1 Antioxidantes de tipo exógeno	7
1.5.2 Antioxidantes de tipo endógeno	9
1.5.2.1 Tipo enzimático	9
1.5.2.2 Tipo no enzimático	11
1.6 ANTIOXIDANTES Y ENFERMEDAD	11
1.7 GLICINA COMO ANTIOXIDANTE	12
1.8 USO DE GLICINA Y MODELOS DE ESTUDIO	13
1.9 EXTRACTOS DE PLANTAS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	15
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVO	19

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	19
4. HIPÓTESIS	19
5. MÉTODOS	20
5.1 Descripción general del estudio	20
5.2 Análisis estadístico	20
5.3 Línea celular y condiciones de cultivo	20
5.4 Concentración de Glicina	21
5.5 Concentración del extracto de <i>H. sabdariffa</i> .	21
5.6 Tiempos de incubación	22
5.7 Ensayos de proliferación celular	22
5.8 Ensayos para la determinación de proteína total	23
5.9 Ensayos para la medición de actividad enzimática	24
5.10 Aislamiento de RNA total de cultivos celulares	25
5.11 Retrotranscripción	26
5.12 Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	26
5.13 Determinación de $O_2^{\bullet -}$ Y H_2O_2 por citometría de flujo	28
5. 14 Geles de actividad de SOD	29
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES	57
9. PERSPECTIVAS	58
10. BIBLIOGRAFÍA	59

RESUMEN

Aunque se sabe que las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) juegan un papel fisiológico importante, se sabe que cuando su producción es elevada, a lo cual se le ha denominado estrés oxidativo, éste se encuentra asociado con diferentes condiciones fisiopatológicas y con el desarrollo de diversas enfermedades. Esta situación obligó a las células a desarrollar diferentes estrategias de defensa contra ERO, donde se incluyen mecanismos de tipo enzimático y no enzimáticos. Como parte de los mecanismos no enzimáticos se encuentran las vitaminas A, D, E y C, moléculas clásicamente empleadas en la terapéutica antioxidante.

Sin embargo, se ha propuesto el uso de muchas otras moléculas como posibles antioxidantes, tal es el caso del aminoácido más simple, la glicina. Actualmente se sabe que este aminoácido disminuye el daño al hígado causado por drogas hepatotóxicas y bloquea la muerte celular programada, además, reduce el cáncer causado por agentes químicos. En el riñón, reduce la nefrotoxicidad causada por la droga Ciclosporina A y previene la hipoxia y la formación de RL. De la misma manera, existen evidencias del efecto antioxidante de otros compuestos derivados de plantas como son los polifenoles y antocianinas, un ejemplo es *H. sabdariffa*, mejor conocida como jamaica. Se ha demostrado que las antocianinas que se encuentran en el extracto de esta planta probablemente son las responsables de su capacidad antioxidante.

A pesar de las evidencias existentes sobre los efectos antioxidantes de la glicina y de *H. sabdariffa* en los modelos de estrés oxidativo, aún no se conocen los mecanismos moleculares mediante los cuales actúan estos compuestos. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la influencia de la glicina y de un extracto de *H. sabdariffa* sobre la expresión de genes que codifican para las enzimas antioxidantes.

Se encontró que en las células Jurkat tratadas con glicina no hay citotoxicidad significativa en ninguna de las concentraciones utilizadas evaluado por la viabilidad celular. Sin embargo, se observó una disminución en la proliferación después de las 48 horas en respuesta al incremento de la concentración y del tiempo. Se incrementó la

actividad de las enzimas SOD y CAT a las 8 horas y 4 horas de tratamiento, respectivamente. Sin embargo, disminuyen su actividad con la mayor concentración (22.7 mM) después de 16 horas de tratamiento. Con respecto a GPx no se observaron cambios importantes en ninguna concentración. Por otra parte, ambas concentraciones (5.6 y 22.7 mM) inducen la expresión de los tres genes que codifican para las tres enzimas antioxidantes a las 8 horas de tratamiento. El incremento en SOD2 no fue evidente en geles de actividad en donde se determinó la relación SOD2/SOD1. En cuanto a la producción y presencia de $O_2^{\bullet -}$, ambas concentraciones no inducen cambios importantes cuando se comparan con el control. De la misma manera, no se observaron cambios significativos en la producción de H_2O_2 en ambas concentraciones.

En el caso de las células tratadas con el extracto de *H. sabdariffa* hay una notoria citotoxicidad en las concentraciones mayores en donde se observó que hay inhibición de proliferación y disminución hasta de un 40% en la viabilidad. Existe una tendencia a incrementar SOD, mientras que en CAT y GPx no se observan cambios en su actividad a la mayor concentración (20 mg/mL) con respecto al tiempo de tratamiento. Todos los genes incrementan su expresión a las 8 horas de incubación con 20 mg/mL. Los cambios en la actividad de SOD fue evidente en geles de actividad en donde se determino la relación SOD2/SOD1. Hay un incremento en la formación de $O_2^{\bullet -}$ con 0.5 mg/mL del extracto. Se observó una acumulación de H_2O_2 , de manera concentración dependiente después de 4 horas de incubación. Finalmente, se observó que los dos tratamientos tienen una manera distinta de inducir cambios en el sistema antioxidante de las células Jurkat. Por un lado, la glicina puede modificar el metabolismo celular, muy posiblemente por cambios en el balance iónico (concentraciones de Cl^- y Ca^{2+}) y por otro, *H. sabdariffa* en donde los cambios observados están asociados a la sobreproducción de especies reactivas derivadas del oxígeno. Sin embargo, no se debe descartar la importancia de las concentraciones utilizadas en cada caso, pues al parecer la glicina puede inducir señales que en un momento pueden proteger a las células del estrés oxidativo y *H. sabdariffa* en contraste, podría estar propiciando un estrés oxidativo y de esta manera inducir una respuesta protectora a concentraciones adecuadas.

1. INTRODUCCIÓN

Los adelantos científicos, específicamente en medicina, son realmente sorprendentes, tanto en el conocimiento de las enfermedades y sus complicaciones, como en su tratamiento. No obstante, quedan aun muchas dudas que aclarar con respecto al origen de éstas. En los últimos 30 años ha aumentado el interés por estudiar los problemas relacionados con el estrés oxidativo y sus componentes, entre los cuales encontramos a las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno, que incluyen a los radicales libres y a los antioxidantes. Todo esto dado a la importancia que poseen en la bioquímica, la biología y la medicina. Las ciencias médicas están avanzando significativamente en el conocimiento de muy variadas enfermedades, en su fisiopatología, su tratamiento y más importante aún en su prevención. Hoy día, en todo el mundo el estrés oxidativo ha dejado de ser sólo interés de bioquímicos y fisiólogos, para convertirse en una herramienta más en la comprensión y origen de las enfermedades que afectan actualmente a la humanidad. Todos los elementos señalados hasta aquí han motivado la realización de este proyecto, el cual trata de la evaluación de dos compuestos que se han propuesto que tienen capacidad antioxidante, sin embargo, hasta el día de hoy no se conocen los mecanismos mediante los cuales podría existir este efecto.

1.1 ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXIGENO (ERO)

Las rutas bioquímicas del organismo están estrictamente controladas por un orden de mecanismos regulatorios. Algunas de estas reacciones bioquímicas involucran transferencia y liberación de energía y pueden resultar en la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), principalmente radicales libres (RL), que desde el punto de vista químico, son todas aquellas especies químicas, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad (Cheesman y Slater, 1998). Estas moléculas son muy reactivas y tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en el que se forman, son altamente tóxicas y deterioran a las células y tejidos (Cheesman y Slater, 1998). La mayoría de los radicales libres de interés biológico son las

ERO, entre las cuales se encuentran: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el oxígeno singulete ($^{\bullet}O_2$) y el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), además del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es un radical libre en sí, pero está estrechamente relacionado por ser el principal precursor del radical hidroxilo (Cheesman y Slater, 1998). (Figura 1).

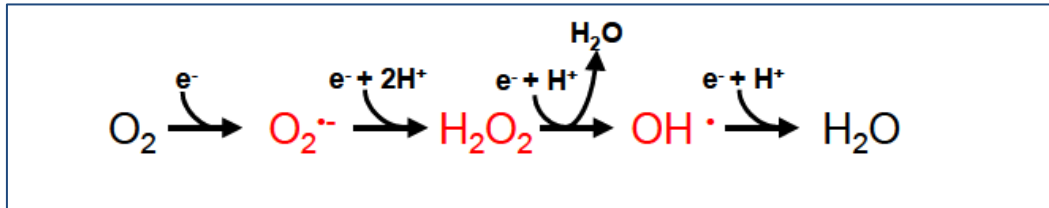


Figura 1. Las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), el radical superóxido $O_2^{\bullet-}$, peróxido de hidrogeno H_2O_2 y el radical hidroxilo $^{\bullet}OH$, se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular O_2 .

1.2 PRINCIPALES FUENTES GENERADORAS DE ERO

El oxígeno molecular (O_2) tiene poca afinidad por electrones por lo que sólo reacciona con aquellos transportadores de electrones en los cuales los estados de oxidación univalentes sean estables. En los sistemas biológicos los candidatos más probables son los centros de hierro-sulfuro, grupos hemo, quinonas y flavinas que, al transferir electrones de forma univalente, son capaces de ceder un primer electrón al O_2 . Estos grupos se encuentran principalmente a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que la convierte en una de las principales fuentes intracelulares productoras de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 . (Messner e Imlay, 2002).

En las células de mamíferos las fuentes potenciales productoras de ERO incluyen la cadena transportadora de electrones mitocondrial y enzimas como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, hemooxigenasas, peroxidadas, hemoproteínas tales como la hemotina y la hematina, y las NADH oxidadas. Una de las fuentes mejor caracterizada de ERO es la NAD(P)H. Este sistema enzimático utiliza NADH o NADPH como donadores de electrones para generar superóxido. Estas proteínas están asociadas a membrana y se expresan en células endoteliales, células del músculo liso vascular, neutrófilos, monocitos y macrófagos (Sumimoto *et al.*, 2005). Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una

fuerente importante de ERO cuando se activan por interleucinas debido a que poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de $O_2^{\bullet-}$ que, en presencia de hierro, se transforma en el $\bullet OH$, que es altamente t3xico. Este mecanismo, en particular, es com3n en los procesos inflamatorios (Babior *et al.*, 1973; McCord 1974).

La xantina oxidasa predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas, generando $O_2^{\bullet-}$. Por lo tanto, es de esperar que los RL se formen en condiciones fisiol3gicas normales en proporciones controlables por los mecanismos defensivos antioxidantes. En el caso de la respiraci3n mitocondrial, del 0.1 al 0.5 % del ox3geno molecular puede ser convertido a super3xido, como producto lateral del flujo de electrones a trav3s de la cadena de transporte electr3nico mitocondrial, esto sucede a nivel del complejo I (NADH deshidrogenasa) y del complejo III (ubiquinona-citocromo bc1) (McCord y Turrens, 1994). Otras fuentes productoras de ERO son los peroxisomas, organelos ubicados en el citosol muy ricos en oxidasas y que potencialmente pueden generar H_2O_2 , el cual es degradado por enzimas espec3ficas como la catalasa y la glutati3n peroxidasa, transform3ndolo en agua y ox3geno molecular (Zangar *et al.*, 2004).

Adem3s de las fuentes intracelulares productoras de ERO, existen compuestos generadores de $O_2^{\bullet-}$, como menadiona o paraquat, que atraviesan la membrana celular y producen un aumento intracelular de este oxidante mediante un proceso denominado *redox-cycling*. Estos compuestos se reducen a expensas del NADPH y NADH intracelulares y, seguidamente, son oxidados por el O_2 , gener3ndose $O_2^{\bullet-}$ (Figura 2). (Hassan y Fridovich, 1979; Kappus y Sies, 1981).

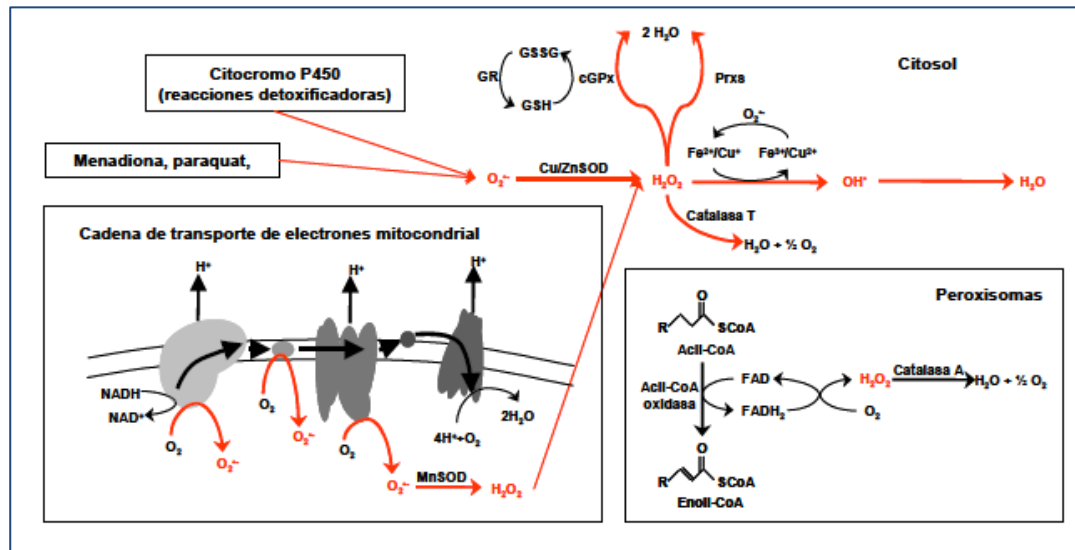


Figura 2. Producción y detoxificación de ERO en células eucariotas.

1.3 EFECTOS NOCIVOS DE ERO

Niveles elevados de ERO son perjudiciales para la célula debido a que pueden reaccionar con biomoléculas tales como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas e inactivar su función.

1.3.1 Daño a lípidos

El radical $\bullet OH$ es un poderoso oxidante que, aunque de difusión celular limitada, puede dañar a la mayoría de los compuestos orgánicos. El radical $\bullet OH$ puede atacar directamente a los lípidos de membrana e iniciar su peroxidación, proceso que tiene como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana y con ello, la alteración de sus propiedades e interacción con otras proteínas. Además, durante el proceso de peroxidación se generan productos de degradación (por ejemplo aldehídos), altamente reactivos que pueden dañar otras moléculas como las proteínas (Gutteridge y Halliwell, 1990).

1.3.2 Daño a proteínas

En las proteínas pueden oxidarse de manera preferente los aminoácidos como la cisteína, fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, induciendo como consecuencia el entrecruzamiento de cadenas peptídicas, la fragmentación de la proteína y la formación

de grupos carbonilos, impidiendo de esa forma el desarrollo normal de sus funciones como transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, así como de actividades enzimáticas que regulan el metabolismo celular (Berlett y Stadtman, 1997).

El H_2O_2 , aunque es menos reactivo que los radicales O_2^{\bullet} y $\bullet\text{OH}$, puede, debido a su elevada capacidad de difusión, reaccionar con gran cantidad de biomoléculas e inactivar su función. El H_2O_2 puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilo (Stadtman y Levine 2003) y al igual que el radical O_2^{\bullet} , puede oxidar directamente enzimas con grupos hierro-sulfuro. Generalmente, estas modificaciones conllevan una alteración en la estructura de la proteína que conduce a la pérdida de función o actividad (Garner *et al.*, 1998).

1.3.3 Daño al ADN

A pesar de que el ADN es un blanco biológico importante para las ERO, el O_2^{\bullet} es relativamente poco reactivo con el ADN. Sin embargo, la mayor parte de los radicales O_2^{\bullet} sufren un proceso de dismutación, generando H_2O_2 , que por si misma presenta una actividad de oxidación muy baja hacia la mayor parte de las biomoléculas. En presencia de metales de transición reducidos, en particular de Fe^{+2} o Cu^+ , el H_2O_2 es convertido, mediante la reacción de Fenton, en el radical $\bullet\text{OH}$ que tiene un poder altamente oxidante.

El radical $\bullet\text{OH}$ tiene la capacidad de no sólo de abstraer átomos de hidrógeno de las moléculas de ADN, si no también de pegarse a las bases formando aductos, lo cual produce una gran diversidad de daños como: daño a las bases, azúcares, entrecruzamientos de proteínas con el ADN, así como rupturas de doble cadena y sencilla y formación de sitios abásicos, todo ello mediante diversos mecanismos (Cadet *et al.*, 1999).

El efecto más nocivo del radical O_2^{\bullet} es el de inactivar ciertas enzimas con centros de hierro-sulfuro (Fe-S) debido a su tendencia a ser electrostáticamente atraído al átomo de hierro de estos centros catalíticos. Tras la unión, el O_2^{\bullet} oxida de forma univalente el centro Fe-S, que en su forma oxidada es inestable y por tanto degradado. El hierro liberado de estos centros Fe-S dañados puede inducir mutagénesis, por lo que la producción del radical O_2^{\bullet} está también relacionada con una alta tasa de mutación (Flint *et al.*, 1993).

1.3.4 Daño a carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras biomoléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical $\bullet OH$ para producir sustancias reactivas. Así mismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de RL, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas (por ejemplo, la despolimerización del ácido hialurónico). La oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de 7 moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas (Fraga *et al.*, 1999).

1.4 ESTRÉS OXIDATIVO

El concepto de estrés oxidativo como desequilibrio implica que en condiciones fisiológicas normales los oxidantes son producidos de manera continua como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidativo y los antioxidantes se encuentran en constante relación con ellos, mientras que en la condición de estrés oxidativo, los oxidantes aumentan o los antioxidantes disminuyen en forma progresiva y continua.

En el ser humano, el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento. Sin embargo, las ERO pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para

atacar y matar a los patógenos. Las ERO son también utilizadas en la señalización celular (Valko *et al.*, 2005).

1.5 MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las células cuentan con una batería de defensa múltiple para contrarrestar el efecto nocivo de los RL. Estas defensas por un lado tienden a impedir su formación y, por otro, los neutralizan una vez formados (moléculas con actividad antioxidante). Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes se clasifican en dos grupos, los de origen exógeno y los de origen endógeno.

1.5.1 Antioxidantes de tipo exógeno

Este grupo lo conforma el α -tocoferol (vitamina E) que pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ampliamente distribuida en los alimentos. Su función principal es la de destruir la mayor parte de las ERO y de otros radicales libres, protegiendo a los ácidos grasos insaturados de la oxidación, con lo que se previene el daño oxidativo de los lípidos de la membrana. Este antioxidante no reacciona acoplado a enzima alguna, sino a través de su sitio activo que es el OH^- en la posición 6 del anillo cromano (Brigelius y Traver, 1999).

La participación de la vitamina E como antioxidante es de suma importancia, por lo que se ha propuesto su uso en la prevención de enfermedades como isquemia cardíaca, toxemia del embarazo, tromboflebitis, fibrosis de seno y en traumas, donde existe una destrucción importante de células. La vitamina E se absorbe en el intestino y es necesario que se encuentren en presencia de grasas (McCall y Frei 2002).

El ácido ascórbico (vitamina C) tiene una potente acción antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos, como secuestrador de ERO, generando la especie radical denominada ascorbilo. Otro mecanismo antioxidante de la vitamina C se asocia con su

capacidad de regenerar antioxidantes de bajo peso molecular como la vitamina E, el glutatión y el β -caroteno, partiendo de sus especies radicales (Halliwell 1996).

La falta de vitamina C origina una enfermedad conocida como escorbuto, que se caracteriza por gingivorragia, gingivitis, aflojamiento de los dientes, resequedad de boca y de ojos, piel seca y alopecia, entre otros síntomas que pueden conducir a la muerte (Hickey y Roberts, 2004).

El β -caroteno es una vitamina abundante en algunas frutas y verduras; es uno de los antioxidantes más efectivos para proteger el organismo de las enfermedades crónicas provocadas por los RL ya que neutraliza al oxígeno singulete. Posee funciones específicas que lo diferencian del resto. En cuanto a las ERO, los carotenoides pueden interactuar con ellas esencialmente de tres maneras: transferencia de electrones, remoción de iones hidrógeno o adición de especies radicales. Además, es precursor de la vitamina A e influye en el sistema inmunológico, favoreciendo la reproducción de glóbulos blancos y protege del cáncer, pues estimula a las células para que secreten mayor cantidad TNF- α (Hemila *et al.*, 2002).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas; y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, ya que retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de $O_2^{\bullet-}$, radical $\bullet OH$, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. Además de que tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales $\bullet OH$ y $O_2^{\bullet-}$, implicados en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica. También se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de

proteger a las LDL de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (Youdim *et al.*, 2002).

1.5.2 Antioxidantes de tipo endógeno

Los antioxidantes endógenos están conformados por los grupos de tipo enzimático y de tipo no enzimático.

1.5.2.1 Tipo enzimático

Primer nivel. Consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar su reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, responsable de más del 90 % de la reducción del oxígeno en el organismo humano (Tzu *et al.*, 2003).

Segundo nivel. Lo constituyen enzimas especializadas en captar el radical O_2^{\bullet} . Éstas son la familia de las superóxido dismutasas (SOD):

Descubiertas por McCord y Fridovich (1969), constituyen la primera fase de defensa antioxidante, son un grupo de metaloenzimas que se encuentran frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes, esenciales para la defensa contra la toxicidad de los metabolitos parcialmente reducidos, durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular. En mamíferos, existen tres tipos de enzimas que constituyen a la familia SOD. La primera es la enzima Cu/Zn-SOD (SOD1) localizada principalmente en el citosol, el núcleo, en la membrana externa de la mitocondria (Fridovich, 1978), la segunda enzima es la EC-SOD (SOD3), ubicada en fluidos extracelulares (Marklund, 1982) y la tercera enzima es la Mn-SOD (SOD2), la cual se concentra en la matriz mitocondrial y es inducida por el incremento en el estado oxidativo celular. Estas enzimas catalizan la conversión de O_2^{\bullet} , en H_2O_2 y O_2 y controlan su concentración intracelular evitando el daño al ADN, así como la oxidación de lípidos y proteínas que pueden resultar en la inactivación de ciertas enzimas (McCord y Fridovich, 1969).

La compartimentación de las diferentes SOD se explica en gran medida por el hecho de que el O_2^{\bullet} no puede cruzar con facilidad las membranas que separan los compartimientos celulares y mitocondriales.

Tercer nivel. Integrado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas están:

a) Catalasa (CAT). Tiene una amplia distribución en el organismo, con una alta concentración en hígado y riñón, baja concentración tanto en tejido conectivo como en epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso. A nivel celular se localiza en: mitocondrias, peroxisomas y citosol de los eritrocitos. Presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Hadju *et al.*, 1977).

b) Glutati6n peroxidasa (GPx). Se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la c6lula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutr6filos, macr6fagos y otras c6lulas fagoc6ticas del sistema inmune. GPx es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducci6n de per6xido de hidr6geno a lipoper6xido (L-OOH), usa como agente reductor el glutati6n reducido (GSH). Existen tres formas de GPx:

- GPx-c o forma celular: tiene mayor afinidad por el per6xido de hidr6geno que por lipoper6xido.
- GPx -p o forma extracelular: presenta afinidad semejante para ambos sustratos.
- GPx-PH: Tiene afinidad espec6fica para los lipoper6xidos.

Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoper6xidos como sustrato (Ya y Diamont, 2003).

1.5.2.2 Tipo no enzimático

1. **Glutati3n:** Es un trip3ptido formado por los amino3cidos γ - glutamil- cisteil- glicina. Se produce en forma natural en las c3lulas animales y lo podemos obtener de la dieta diaria. Tener concentraciones adecuadas de glutati3n en el organismo ayuda a mantener principalmente el equilibrio 3ptimo en la eliminaci3n de RL, as3 mismo contribuye en la desintoxicaci3n de las c3lulas del h3gado debido a que esta prote3na tiene una excelente capacidad de reaccionar con sustancias t3xicas (acetaminof3n, cobre, cadmio y paracetamol) y favorecer su eliminaci3n (Wu *et al.*, 2003).
2. **Coenzima Q:** Son un grupo de coenzimas formadas por una quinona biol3gicamente activa, con una cadena lateral de isoprenos, con una estructura qu3mica similar a las vitaminas E y K. Entre sus funciones podemos destacar su papel como transportador de electrones en la membrana interna mitocondrial, desde el complejo I (NADH deshidrogenasa) o el complejo II (succinato deshidrogenasa) hasta el complejo III (ubiquinona citocromo bc1). En otras membranas muestra una funci3n antioxidante, ya sea de forma directa, contra la formaci3n de lipoper3xidos o de forma indirecta a trav3s del reciclado de otros antioxidantes lip3dicos como la vitamina E, o hidrosolubles como la vitamina C (Sugiyama *et al.*, 2004).

1.6 ANTIOXIDANTES Y ENFERMEDAD

En los 3ltimos a3os se ha tratado de establecer la importancia del da3o oxidativo en la patogenia de numerosas enfermedades, as3 como de valorar el posible uso de la terap3utica antioxidante. En algunos casos, el da3o oxidativo interviene de una manera primaria en el origen de las enfermedades. En otros casos se trata de un fen3meno secundario, que puede tener un papel importante en la evoluci3n de las mismas. Los micronutrientes con acci3n antioxidante, como las vitaminas E y C o el β -caroteno, son las sustancias cl3sicamente empleadas como terap3utica antioxidante, aunque se ha

propuesto el uso de muchas otras, como es el caso de la glicina, cuyo efecto benéfico se comenzó a investigar en la década de los 90.

En un estudio realizado por Matilla y col. (2002) que incluyó 3 grupos de ratas: controles que recibieron una dieta estándar, ratas alimentadas con una dieta estándar y sometidas a shock hemorrágico agudo y posterior retransfusión, y ratas alimentadas con una dieta suplementada con glicina al 5% durante 4 días sometidas a shock hemorrágico y posterior retransfusión. En este último grupo se observó una reducción de los parámetros hepáticos indicadores de estrés oxidativo, TBARS y relación glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), en el grupo alimentado con glicina y sometido a shock hemorrágico (Matilla *et al.*, 2002). Resultados similares obtuvieron Deters y col. en 1997 en un sistema de hipoxia/reoxigenación hepática adicionando glicina al líquido de perfusión, o inyectando glicina previo al shock hemorrágico (Deters *et al.*, 1997). Se sabe también que tras la ingesta de glicina, ésta incrementa su concentración a nivel sanguíneo en alrededor de 1 mM comparado con las concentraciones basales, que se encuentran en un rango de 0.1-0.2 mM, lo cual protege contra el shock causado por pérdida de sangre o presencia de endotoxinas. La glicina reduce los niveles de alcohol en el estómago y mejora la recuperación de hepatitis alcohólica (Iimuro *et al.*, 1996). También reduce la fibrosis causada por drogas experimentales. Disminuye el daño al hígado causado por drogas hepatotóxicas y bloquea la muerte celular programada (Stachlewitz *et al.*, 1999). Además reduce el cáncer causado por químicos como el cadmio, aflotoxinas, tricloroetileno, entre otros (Rose *et al.*, 1997). En el riñón reduce la nefrototoxicidad causada por ciclosporina A, y previene la hipoxia y la formación de radicales libres (Zhong *et al.*, 1998).

1.7 GLICINA COMO ANTIOXIDANTE

La glicina es un aminoácido simple, no esencial, que consiste en una molécula de carbón unida a un grupo amino y a un grupo carboxilo. Las funciones de la glicina se deben a su tamaño pequeño y a una cadena lateral pequeña, lo cual puede afectar las características físicas de este aminoácido, como impartir carga, hidrofobicidad u otros cambios estructurales. Estas propiedades permiten a la glicina desempeñar un papel

importante en la estructura de ciertas proteínas y actuar en varias funciones celulares como modificador biológico (Serrano *et al.*, 1992).

En el sistema nervioso central, la glicina es un neurotransmisor inhibitorio. En el tejido no nervioso se considera biológicamente neutra y se usa como un control isoneutrógeno en estudios de suplementación con otros aminoácidos. Sin embargo, estudios recientes muestran que la glicina actúa sobre células inflamatorias, por ejemplo macrófagos, para suprimir la activación de factores de transcripción, la formación de radicales libres y citocinas (Yamashina *et al.*, 2001). Se ha visto que activa los canales de cloro que estabilizan o hiperpolarizan potencialmente la membrana plasmática, como consecuencia, se induce la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y supresión de los iones intracelulares del hierro, situación que podría explicar sus efectos inmunomodulador y antiinflamatorio (Wheeler *et al.*, 1999).

1.8 USO DE GLICINA Y MODELOS DE ESTUDIO

Existen diferentes tipos celulares que son altamente resistentes a ser dañados por RL ya que están protegidos por sistemas antioxidantes, como mecanismos de defensa. En un modelo de rata sometida a daño oxidativo por ingesta de alcohol se encontró que en los eritrocitos, la glicina tiene propiedades antiperoxidativas, al promover la producción de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx (Senthilkumar y Nalini 2004). También, la glicina puede ejercer diferentes efectos para prevenir la formación de ERO por inactivación de macrófagos, lo cual minimiza la subsiguiente activación de factores de transcripción y la producción de citocinas (Zhong *et al.*, 2003). Así mismo, se ha reportado que la glicina previene el descenso de la actividad de las enzimas hepáticas antioxidantes (SOD, GPx y CAT) tras el choque hemorrágico y revierte el incremento de los RNAm de las mismas. Se ha propuesto que el efecto de la glicina sobre las actividades de las enzimas antioxidantes, podría derivar del bloqueo de la activación de las células de Kupffer, productoras de RL derivados tanto de oxígeno como de nitrógeno y de otros compuestos tales como citocinas (Mauriz *et al.*, 2001). En un estudio realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades en el Centro Médico

Nacional Siglo XXI (México) se demostró que la glicina al disminuyó el estrés oxidativo, medido por la peroxidación de lípidos en pacientes diagnosticados con Síndrome Metabólico (SM), así mismo, se encontró una aparente reducción en la expresión del gen *SOD2* (Loza *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados de dicho estudio no son del todo concluyentes, por lo que es necesario estudiar cambios en la expresión y actividad de la enzima *SOD2* en periodos cortos después de la administración de la glicina.

En esta misma Unidad de Investigación se realizó un estudio con pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2 (DT2) a los cuales se les dio una dosis de 5 gr en cada alimento (3) de este aminoácido durante tres meses, se encontró que existe una disminución significativa en los niveles de TNF- α e incrementa en un 43% los niveles de IFN- γ , estos datos son comparados con el tratamiento con placebo. Además, los pacientes tratados con glicina, mostraron una disminución significativa en hemoglobina glicada y citocinas proinflamatorias. En conclusión, se propuso que la glicina tiene un efecto benéfico en la respuesta inmune adaptativa e innata y puede ayudar a prevenir el daño causado por inflamación crónica en pacientes con DT2 (Cruz *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Alarcón y col. en el 2008, se demostró que la glicina suprime la expresión transcripcional de TNF- α en tejido graso, además, disminuyeron los niveles de IL-6 en plasma y se incrementaron los niveles de adiponectina en ratones control. En ratones a los cuales se les indujo obesidad mediante glutamato monosódico, la glicina inhibe la expresión de los genes de TNF- α e IL-6 en el tejido graso, por otra parte, este aminoácido redujo significativamente los niveles de proteína de IL-6, resistina y leptina. Para determinar el rol de PPAR- γ en la modulación de la respuesta inflamatoria, se examinaron los niveles de expresión de este receptor en el tejido graso. Tras el tratamiento con glicina, este receptor incrementó su expresión en ratones control pero no en ratones obesos. Finalmente la glicina redujo significativamente la tolerancia a la glucosa y aumento de los niveles de insulina en ratones control, pero no en ratones obesos. En conclusión, estos resultados sugieren que la glicina suprime la producción de citocinas proinflamatorias e incrementa la secreción de adiponectina *in vivo* a través de la

activación de PPAR- γ . La glicina puede prevenir la resistencia a la insulina y enfermedades asociadas a la inflamación (Alarcón *et al.*, 2008).

El uso de marcadores que reponen a cambios en el balance oxidante pueden ser importantes para explicar los efectos antioxidantes y antiinflamatorios encontrados con el uso de la glicina. Como se mencionó anteriormente, la enzima SOD2 es la primera línea de defensa antioxidante contra el ataque por RL y es posible observar cambios en la inducción de su expresión en modelos de estudio controlados como es el caso de líneas celulares. Esto resulta interesante, pues a la fecha no se ha descrito a detalle el mecanismo molecular de la capacidad antioxidante de la glicina.

1.9 EXTRACTOS DE PLANTAS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

De la misma manera, existen evidencias del efecto antioxidante de otros compuestos derivados de plantas, como son polifenoles y antocianinas, entre otros, sin que hasta la fecha se hayan definido a detalle sus mecanismos a nivel bioquímico y molecular. Un ejemplo es el extracto obtenido de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica), a la cual se le han atribuido diferentes usos. Su empleo va desde la industria alimenticia en la preparación de bebidas refrescantes, dulces y jaleas hasta el área farmacológica como antiinflamatorio, antiespasmódico, antihipertensivo, antipirético, antibacteriano, antioxidante, antimicrobiano intestinal, antitumoral, antiviral, antiadipogénico, anticlastogénico, dermoestimulante, miorelajante, inmunomodulador, diurético, vasoprotector, sedante, laxante, con efectos neurofarmacológicos, actividad antiamilasa, hipoglucemiante e hipolipemiante (Reanmongkol *et al.*, 2007). Tsai y colaboradores en el 2001 estudiaron la actividad antioxidante de *H. sabdariffa*. En estos estudios las antocianinas fueron propuestas como responsables de la capacidad antioxidante de un extracto acuoso de *H. sabdariffa*. Algunos compuestos polifenólicos en *H. sabdariffa* también se han asociado con sus propiedades antioxidantes, probablemente a través de un efecto directo antioxidante sobre las partículas de lipoproteínas. También se ha observado una tendencia a disminuir la susceptibilidad a la formación de RL, sin embargo aún falta dilucidar el mecanismo de acción para este proceso (Vilasinee *et al.*, 2006). Por

otra parte, Wang reportó un efecto antioxidante de las antocianinas de *H. sabdariffa*, al disminuir significativamente la formación de lactato deshidrogenasa y de malondialdehído en hepatocitos primarios de rata a dosis de 0.1 y 0.2 mg/ml, así como un efecto hepatoprotector al disminuir los niveles séricos de alanina y aspartato aminotransferasas, así como las lesiones hepáticas en ratas tratadas con el agente hepatotóxico ter-butilhidroperóxido, con dosis de antocianinas de 100 y 200 mg/kg (Wang *et al.*, 2000).

En 2004, Suboh reportó que *H. sabdariffa* protege a los eritrocitos contra la peroxidación de lípidos *in vitro*; y concluyó que puede ser útil en condiciones patológicas relacionadas con RL (Suboh *et al.*, 2004). Farombi y su grupo, en el 2007, realizaron una investigación en donde determinaron los efectos hipolipidémicos y antioxidantes de un extracto etanólico de *H. sabdariffa* en ratas tratadas con aloxana. Los resultados fueron comparados con la droga hipolipidémica lovastatina. Se observó una atenuación de la disminución en la actividad de SOD, CAT y GPx en un 36%, 44%, y 64%, respectivamente en el hígado y en un 36%, 44% y 64% en el riñón de ratas después del tratamiento con aloxana. La lovastatina incremento SOD, CAT y GPx en un 32%, 29%, y 64% en el hígado y en el riñón incremento en un 17%, 26% y 73%. Con los datos obtenidos se demostró que *H. sabdariffa* posee fuertes propiedades antioxidantes en ratas tratadas con aloxana y puede ser usada para prevenir el desarrollo de aterosclerosis y patologías relacionadas con la diabetes (Farombi *et al.*, 2007).

Con base en la información anterior, resulta interesante evaluar la asociación de la capacidad antioxidante de este tipo de compuestos sobre la inducción de la primera barrera de protección antioxidante como lo es la enzima SOD2. En ese sentido, modelos de estudio basados en cultivos celulares derivados de enfermedades asociadas a estrés oxidativo podrían ser utilizados, con la idea de describir vías moleculares y metabólicas asociadas específicamente con la patología.

Un tipo celular que está implicado en el desbalance entre antioxidantes y pro-oxidantes son los linfocitos. Existen múltiples patologías asociadas a este desequilibrio, principalmente el cáncer en el cual existe un crecimiento incontrolado de las células que

ha sido correlacionado con una disminución en el contenido de antioxidantes. Se han realizado diversos estudios en linfocitos T derivados de leucemia, específicamente en la línea celular leucémica Jurkat, en donde se ha encontrado que la cantidad y la actividad de la enzima antioxidante SOD2 es muy baja debido a su sensibilidad a inactivación por temperatura y alquilación (Hernández y McCord, 2003; Hernández, *et al.*, 2010). Se ha reportado de igual forma que los bajos niveles de SOD2 mitocondrial están asociados con células tumorigénicas y cáncer. Sin embargo, los mecanismos por los cuales existe este desequilibrio aún no son del todo claros (Oberley y Oberley 1986; Sun. 1990). Por tanto, la línea celular Jurkat resulta ser un modelo *in vitro* adecuado para los fines de este protocolo.

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos 30 años se ha incrementado el interés por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres, las especies reactivas derivadas del oxígeno y los antioxidantes. Todo esto dado por la importancia potencial que el balance redox posee en el entendimiento de las patologías relacionadas al incremento de los radicales libres y su asociación con la enfermedad.

A pesar de las evidencias existentes acerca de los efectos antioxidantes de la glicina e *H. sabdariffa* en los modelos de estrés oxidativo que se describieron, es necesario conocer también sus mecanismos, ya que es probable que ambas propuestas tengan un papel como reguladores de la expresión del gen que codifica para SOD2 y el resto del sistema antioxidante que participan bajo condiciones de estrés oxidativo.

3. OBJETIVO

Evaluar la influencia de la glicina y un extracto de *H. sabdariffa* sobre las enzimas antioxidantes *in vitro*.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la citotoxicidad de la glicina e *H. sabdariffa* sobre las células Jurkat.
2. Medir la expresión de los genes asociados en la eliminación del anión superóxido mitocondrial y productos de catalisis: SOD2, CAT y GPx, en cultivos de células Jurkat incubadas con diferentes concentraciones de glicina y de *H. sabdariffa* a diferentes tiempos.
3. Medir la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, en cultivos de células Jurkat incubadas con diferentes concentraciones de glicina y de *H. sabdariffa* a diferentes tiempos de incubación.
4. Realizar una comparación entre los resultados obtenidos con glicina y con *H. sabdariffa*.
5. Determinar las especies reactivas de oxígeno en las células Jurkat mediante citometría de flujo con los tratamientos propuestos.

4. HIPÓTESIS

Las propiedades antioxidantes de la glicina y un extracto antioxidante de *H. sabdariffa* están relacionadas con la regulación de la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes.

5. MÉTODOS

5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Se trata de una línea de investigación ya aprobada en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades en el Centro Medico Nacional Siglo XXI. Se cultivó una línea celular derivada de linfocitos humanos en tres grupos: grupo control sin tratamiento, grupo con tratamiento de glicina y grupo con tratamiento de extracto de *H. sabdariffa*. Se utilizaron distintas concentraciones de glicina y extracto de *H. sabdariffa*, las cuales fueron incubadas en tiempos de 0 a 72 horas para observar la citotoxicidad de cada compuesto y de 1, 4, 8 y 16 horas para determinar el posible cambio en la expresión de los genes. Parte de cada uno de los grupos fueron utilizados para medir la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx. El resto de la muestra fue utilizada para realizar la extracción de RNA, posteriormente se llevó a cabo la retrotranscripción y por ultimo PCR en tiempo real (RT-PCR), con el fin de observar los cambios en el grado de expresión de los genes asociados en la eliminación de radicales libres. Una vez realizado este proceso se procedió a realizar una comparación entre los resultados obtenidos con glicina y con *H. sabdariffa* mediante análisis estadístico. De igual manera se determinaron los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno en las células Jurkat mediante citometría de flujo.

5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron al menos tres experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y para el analisis de significancia estadística se empleo la prueba Tukey-Kramer. Los valores se consideraron estadísticamente significativos utilizando un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el software NCSS.

5.3 LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO

La línea celular Jurkat fue cedida por la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se trata de una línea derivada de leucemia aguda de linfocitos T humanos que se utilizó para observar los efectos producidos en los linfocitos tras la administración de glicina y *H. sabdariffa* en diferentes concentraciones y a distintos tiempos de incubación.

Mantenimiento de cultivo celular

Las células Jurkat se mantuvieron en medio RPMI 1640, suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado, L- glutamina 200 mM, bicarbonato de sodio 10 mM y gentamicina 10 mg/mL, piruvato de sodio 100 mM, aminoácidos no esenciales 100 mM a pH de 7.2; las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂. Posteriormente se transfirieron a botellas de 50 mL a las cuales se les adicionó cada uno de los tratamientos.

5.4 CONCENTRACIÓN DE GLICINA

Las concentraciones de glicina utilizadas en este estudio se determinaron tomando en cuenta los datos reportados para pacientes diabéticos y con síndrome metabólico que fueron tratados con glicina a dosis de 15 g diarios (Cruz *et al.*, 2008; Loza *et al.*, 2007). Se consideró una media del peso de los pacientes de 82 kg, y una media de 42 mL/kg de plasma, por tanto una media de 3.44 L de plasma total en los pacientes. Se determinó la concentración de glicina en plasma dividiendo los 15 g de glicina entre los 3.44 L de plasma, dando como resultado una concentración de 4.36 g de glicina/L de plasma que corresponde a 0.44% de este aminoácido (11.3 mM). A partir de este dato se establecieron las concentraciones de glicina utilizadas en este proyecto y que fueron las siguientes: 2.8 mM, 5.6 mM, 11.3 mM, 22.7 mM y 45 mM. Cada una de las concentraciones de glicina fue preparada en medio de cultivo RPMI 1X.

5.5 CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE *H. sabdariffa*.

Un extracto caracterizado en su contenido de antocianinas totales de 33.64 mg por cada 120 mg de *H. sabdariffa* fueron proporcionados por el laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa. Los extractos acuosos se obtuvieron por calentamiento a 50°C durante 1 h y fueron deshidratados por liofilización. El polvo obtenido se utilizó para los cultivos de la línea celular Jurkat.

Las concentraciones del extracto de *H. sabdariffa* utilizadas en este estudio se establecieron de acuerdo con lo reportado por Mohameden en 2006 y por Farombi en el 2007, donde se utilizaron dosis de 200 mg/kg en modelos *in vivo* para el estudio de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. Se usaron las siguientes concentraciones: 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL. Cada una de las concentraciones del extracto de *H. sabdariffa* fue preparada en medio RPMI 1640 1X.

5.6 TIEMPOS DE INCUBACIÓN

Los tiempos de incubación y muestreo de células Jurkat fueron de 24, 48 y 72 horas para los ensayos de proliferación celular y para la medición de la expresión de los genes y la actividad específica de cada una de las enzimas, los tiempos fueron de 1, 4, 8 y 16 horas.

5.7 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células Jurkat fueron mantenidas a 37°C y CO₂ al 5% en medio RPMI 1640 1X suplementado con suero fetal bovino al 10%. Una vez que las células Jurkat llegaron a confluencia (3 días aproximadamente) se colocaron en un tubo cónico de 15 mL, se centrifugaron durante 5 minutos a 1140 g/ 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino y atemperado previamente a 37°C. Se contó el número de células por microscopia en la cámara de Neubauer y se procedió a conformar los grupos de estudio. En todos los casos se partió del mismo número de células (5X10⁵). Los grupos tuvieron el siguiente orden: células Jurkat sin tratamiento, tratadas con glicina y tratadas con *H. sabdariffa*, a las concentraciones antes descritas e incubadas a los distintos tiempos mencionados. Una vez

finalizados los tratamientos se retiró el medio, las células se lavaron con PBS y se procedió a determinar la viabilidad celular.

Viabilidad celular

Se tomaron 10 μ L de la suspensión de células y se depositaron en un tubo Eppendorf. Se añadieron otros 10 μ L de solución de azul tripán al 0.4%. Tras 5 minutos incubando a temperatura ambiente, se tomó una muestra de 10-15 μ L y se colocó en la cámara de Neubauer. Se procedió al recuento de las células utilizando un microscopio óptico. Se observaron dos tipos de células: unas birrefringentes, que corresponden a células vivas, y otras teñidas de azul, que son células con daños en la membrana celular y que por tanto han dejado pasar al colorante (células muertas). Se calculó la proporción existente de cada una mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = (\text{N}^{\circ} \text{ células vivas} / \text{N}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{N}^{\circ} \text{ células muertas}) \times 100$$

Células/mL = (nº células en el área /4) (factor de dilución) (mL donde están contenidas las células).

5.8 ENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Se obtuvieron extractos celulares de la siguiente manera. El paquete celular se lavó tres veces en buffer de fosfatos pH 7, suplementado con solución de NaCl 0.15 M para eliminar el medio de cultivo; posteriormente se liso en 500 μ L de buffer en hielo durante 30 segundos en ultrasonido, cuidando que no se calentara la muestra. Las proteínas totales se determinaron por el método de Lowry (1951) modificado. Los extractos de las células Jurkat fueron analizados de la siguiente manera. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA). Las muestras problema se analizaron paralelamente con la curva patrón. Un tubo conteniendo únicamente los reactivos sirvió de blanco para el ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Una vez ajustada la absorbancia, se leyó cada una de las muestras a la misma longitud de onda. Para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras se utilizaron los valores obtenidos de la curva patrón y se cuantificó la cantidad de proteína total en

una hoja de cálculo (Excel). Estos valores se utilizaron para calcular la actividad específica de las enzimas antioxidantes en los extractos celulares.

5.9 ENSAYOS PARA LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Actividad específica de SOD

La actividad SOD se realizó en los extractos celulares con ambos tratamientos. A partir del extracto acuoso, se midió la actividad específica de SOD, la cual se calculó indirectamente, mediante la inhibición de la reducción del citocromo C por el radical superóxido producido por la reacción de la xantina/xantina oxidasa en un ensayo descrito por McCord y Fridovich (1969). A cada una de las muestras se les adicionó una mezcla de Xantina 50 mM, citocromo C 10 mM y EDTA 0.1 mM en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8; la mezcla de reacción, junto con la muestra, se homogenizó y el índice de cambio de absorbancia se realizó a 550 nm en espectrofotómetro a 25°C. Los índices de cambio de la reducción del citocromo C se contrastaron contra el índice de cambio del control de la reacción (mezcla con xantina oxidasa y sin muestra). Cada absorbancia se utilizó para cuantificar superóxido dismutasa con un software para cuantificar SOD, desarrollado por McCord's lab.

Actividad específica de CAT

La actividad de la catalasa fue evaluada de acuerdo a Bermegyer (1955), utilizando un stock fresco de peróxido de hidrógeno. A las muestras de extractos crudos se les adicionó H₂O₂ 20 mM en buffer de fosfato de potasio 50 mM a pH 7 y se incubaron a 25°C, registrando los cambios a 240 nm. La actividad de catalasa fue estimada utilizando un coeficiente de extinción de 43.6 M⁻¹.

Actividad específica de GPx

Para cuantificar la actividad de glutatión peroxidasa en los extractos celulares se utilizó como sustrato glutatión reducido a una concentración final de 1 mM en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM con 0.1 mM de EDTA, 0.25 mM NADPH y azida de sodio 1.5 mM a pH 7.4. Se registro el cambio en la absorbancia a 340 nm y el contenido de glutatión peroxidasa fue estimado utilizando un coeficiente de extinción de 6.2 M^{-1} (método modificado de Rudack *et al.*, 1971).

5.10 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL DE CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la técnica de isotiocianato de guanidina (TRIZOL). Posterior a los distintos tiempos de incubación (1, 4, 8 y 16 horas), 3×10^6 células se recuperaron en tubos Eppendorf de 1 mL, se centrifugaron a 1140 g para eliminar el medio de cultivo y se lavaron con PBS 0.1M para eliminar el resto de medio. Una vez realizado este proceso, se adicionó 1 mL de TRIZOL[®], la suspensión de células se recuperó con jeringa. Posteriormente se centrifugaron a 1140 g y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos Eppendorf de 1 mL. Se agregaron 200 μL de cloroformo por cada mL de TRIZOL[®], agitando vigorosamente con la mano y se dejó en reposo por 3 minutos en frío, con la finalidad de separar las fases. Se centrifugó a 13,300 g por 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa, que es la que contiene al RNA. Se agregaron 500 μL de isopropanol (para precipitar el RNA), se mezcló por inversión y se incubó en hielo 20 minutos. Se centrifugó a 11,020 g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 75% (frío) y se agitó en vortex. Se centrifugó a 13,300 g por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el precipitado. El RNA se resuspendió en 60 μL H₂O libre de RNAsas, y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Cuantificación y pureza

Para la cuantificación del RNA fue necesario hacer una dilución 1:100 de cada muestra. Estas diluciones se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm, donde: $1 A_{260nm} = 40 \mu\text{g RNA/mL}$. Así mismo, la pureza se evaluó por la relación de absorbancia 260/280, esperando tener valores de 1.9 a 2.2 para considerarse altamente puras. Se verificó la integridad del RNA purificado en geles de agarosa 0.9% en buffer TBE teñido con bromuro de etidio (BrEt) y se visualizaron en transiluminador con radiación UV.

5.11 RETROTRANSCRIPCIÓN

Se utilizó el estuche de transcripción reversa Improm II TM Reverse Transcription System (Invitrogen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se combinaron las muestras y controles de RNAs, con sus respectivos “primers” y se incubaron a 25 °C por 5 minutos, colocándose finalmente en hielo.

La retrotranscripción (RT) se realizó de la siguiente forma. Se preparó la mezcla de reacción de RT y se combinó con las mezclas de RNA's previamente realizadas. Se tomó una alícuota de 15 μL de la mezcla de reacción de RT y se añadió a cada una de las muestras a analizar, alcanzando un volumen final de 20 μL . Los tubos fueron incubados a 42 °C por 1 hora y finalmente a 70 °C por 15 minutos para la inactivación de la transcriptasa reversa. Los cDNA obtenidos fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

5.12 REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Se utilizó el Lightcycler® 2.0 Instrument (Roche, USA) y la Universal Probe Library Human Set (Roche, USA.) de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 5 μL de la mezcla de RT-PCR (LightCycler® Taq Man Master) y se añadió a un capilar de PCR localizado dentro de un bloque de enfriamiento, posteriormente se añadieron 5 μL de muestra de cDNA diluido y se cerró cuidadosamente cada capilar. Posteriormente se centrifugó por 1 min a 2375 g. Una vez realizado este paso cada, cada capilar se depositó cuidadosamente dentro del carrusel del Lightcycler® 2.0 Instrument y se corrió el

programa UPL (contenido en el equipo) para el análisis de la curva patrón. Las condiciones de temperatura y número de ciclos fueron las siguientes: 95°C por 10 min y 45 ciclos a 95°C por 10 segundos seguido por 60°C durante 30 segundos y a 72°C por 1 segundo. Finalmente un periodo de enfriamiento a 40 °C por 30 segundos.

Para de cuantificar el grado de expresión de los genes problema se hicieron curvas de calibración para cada una de ellos, así como una curva para un gen constitutivo, en este caso la proteína ribosomal humana RPLP0. Estas curvas se realizaron por diluciones seriales de cada cDNA y se utilizaron para realizar las comparaciones entre los tratamientos.

Curva estándar para cada uno de los genes problema y gen constitutivo.

Se seleccionó una muestra de cDNA control y con ella se realizaron las diluciones seriales. Una vez hechas cada una de las diluciones se procedió a realizar el RT-PCR como se indicó anteriormente. Posterior a la amplificación se seleccionaron las diluciones óptimas para así poder realizar la cuantificación relativa de los genes problema utilizando como referencia la expresión del gen *RPLP0*. Los productos de la amplificación se analizaron en gel de agarosa 2% en buffer TBE teñido con BrEt/65 volts/45 min.

RT-PCR de células Jurkat tratadas con glicina e *H. sabdariffa*.

El análisis con cada unos de los tratamientos se realizó en una misma corrida de RT-PCR. Se realizaron los cálculos necesarios para una reacción total de 3 muestras por duplicado, la reacción incluyó un blanco, tanto para el gen problema como para el gen constitutivo (*RPLP0*). Las condiciones del RT-PCR son las que se describieron con anterioridad, los “primers” y las sondas que se utilizaron se indican en la Tabla 1.

Una vez realizado el RT-PCR se llevó a cabo una cuantificación monocolor, que incluyó una muestra blanco calibrador y una muestra de referencia calibrador que sirvió para determinar el análisis de las muestras con su respectivo duplicado para cada uno de los genes, así mismo se incluyeron las curvas patrón realizadas anteriormente que determinaron la eficiencia y el error del análisis. En la hoja de resultados del software del

equipo LightCycler se observó la media Ct (ciclo de inicio de la amplificación), la relación con la concentración y la relación normalizada que indica el número de veces que el gen amplificó basándose en el blanco y la referencia calibrador. La expresión de cada uno de los genes se determinó mediante el método comparativo 2^{-ddCt} para estimar la expresión relativa. Este método involucra la Ct evaluada mediante PCR en tiempo real de las muestras problema comparado con las muestras control. Tanto el control como las muestras problema fueron normalizadas con el gen constitutivo.

NOMBRE DEL GEN	PRIMERS	SONDA (ROCHE)
Glutation Peroxidasa (GPX 1)	F' ttcccggtcaaccagtt R' agggaattcagaatctcttcggt	2
Catalasa (CAT)	F' cgagttcggttctccac R' ggggtcccgaactgtgtca	67
Mn- SOD (SOD2)	F' ctggacaaacctcagcccta R' tgatggcttccagcaactc	22
Proteína ribosomal (RPLP0)	F' tcccacttgctgaaaaggctc R' agcaggagcagctgtggt	74

Tabla 1. “Primers” y sondas para el análisis de expresión mediante la técnica de RT-PCR para cada uno de los genes.

5.13 DETERMINACION DE $O_2^{\bullet-}$ Y H_2O_2 POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células (1×10^6) fueron incubadas con las distintas concentraciones de glicina y el extracto antioxidante. Posterior a los distintos tiempos de incubación, las células fueron lavadas con PBS. Un volumen de 30 μ L de células se separó con la finalidad de utilizar

dichas células como un control de autofluorescencia. Al resto de las células se les añadió, separadamente, el fluorocromo dihidroetidio (220 μM) para la detección de anión superóxido y dihidrorodamina 123 (1 μM) para la detección de peróxido de hidrógeno. Las células fueron entonces incubadas 15 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se transfirieron 50 μL de la suspensión a tubos de citometría e inmediatamente se cuantificó la fluorescencia en un citómetro de flujo (Dako). Las longitudes de onda utilizadas fueron para DHE 370 nm (EX355/EM420) y para DHR 123 488 nm (EX505/EM534). Los resultados se expresaron como índice de fluorescencia con respecto al porcentaje de población.

5.14 GELES DE ACTIVIDAD DE SOD

Se realizaron geles de poliacrilamida para detectar cambios de actividad SOD en las distintas isoformas SOD2 y SOD1, se utilizaron extractos celulares de las células Jurkat con los tratamientos de glicina e *H. sabdariffa* indicados. La electroforesis se realizó bajo condiciones nativas en geles discontinuos en donde el gel concentrador se utilizó a una concentración de acrilamida del 5 % mientras que el gel separador se utilizó al 10 % de acrilamida. Las condiciones de corrimiento para el gel concentrador fueron 50 volts/cm, mientras que para el gel separador fueron 90 volts/cm a 4°C. Se incluyeron en cada pozo 50 μg de proteína total y se utilizaron estándares de SOD2 y SOD1 humanas (actividad específica de 3000 U/mg).

Posterior al corrimiento del gel de poliacrilamida, se realizó la tinción de actividad que consiste en mezclar 40 mL de solución 1 (NBT 0.3 mM en fosfato de potasio 50 mM y EDTA 1 mM pH7.8) y 2 mL de solución 2 (riboflavina 0.5 mM), la tinción se realizó en oscuridad durante 30 minutos. Posterior a este tiempo, el gel fue colocado en luz blanca para el revelado durante 30 minutos. Para detener la tinción, los geles fueron colocados en agua. Finalmente se realizó un análisis densitométrico de los geles para determinar la relación SOD2/SOD1 en cada muestra.

6. RESULTADOS

Efecto de la glicina sobre la proliferación de las células Jurkat

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la proliferación por conteo directo de las células Jurkat tratadas con distintas concentraciones de glicina. Se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de glicina y después de las 48 horas de tratamiento, la proliferación de estas células va disminuyendo cuando se compara con el control. Sin embargo, esta disminución de la proliferación no es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Efecto de la glicina sobre la viabilidad celular

Posterior a cada uno de los tiempos de incubación en los distintos tratamientos de glicina se determinó la viabilidad de las células Jurkat por el método de exclusión de azul de tripan, donde las células que no absorben el colorante se consideran como vivas al ser observadas en la cámara de Neubauer. La viabilidad de estas células no fue afectada tras el tratamiento con 5.6 mM de glicina en ninguno de los tiempos de incubación (1, 4, 8 y 16 horas). Sin embargo, después del tratamiento con 22.7 mM de glicina, la viabilidad celular mostró un decaimiento a las 16 horas de incubación, estos resultados no fueron estadísticamente significativos cuando se compararon con el control (Figura 4).

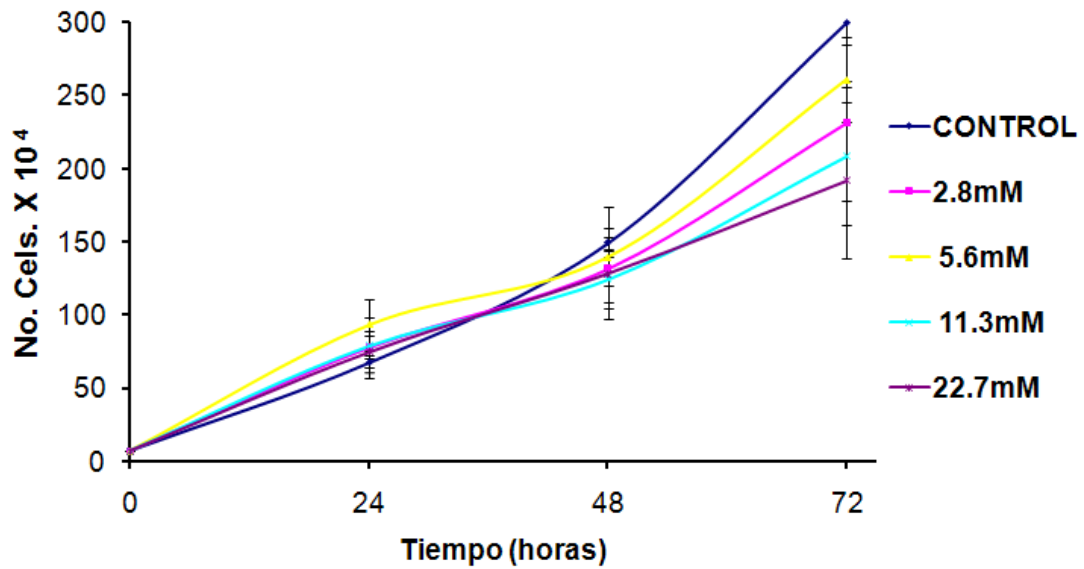


Figura 3. Proliferación de células Jurkat tratadas con distintas concentraciones de glicina. Los resultados se muestran como cambio en el número de células con respecto al tiempo a distintas concentraciones de glicina. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

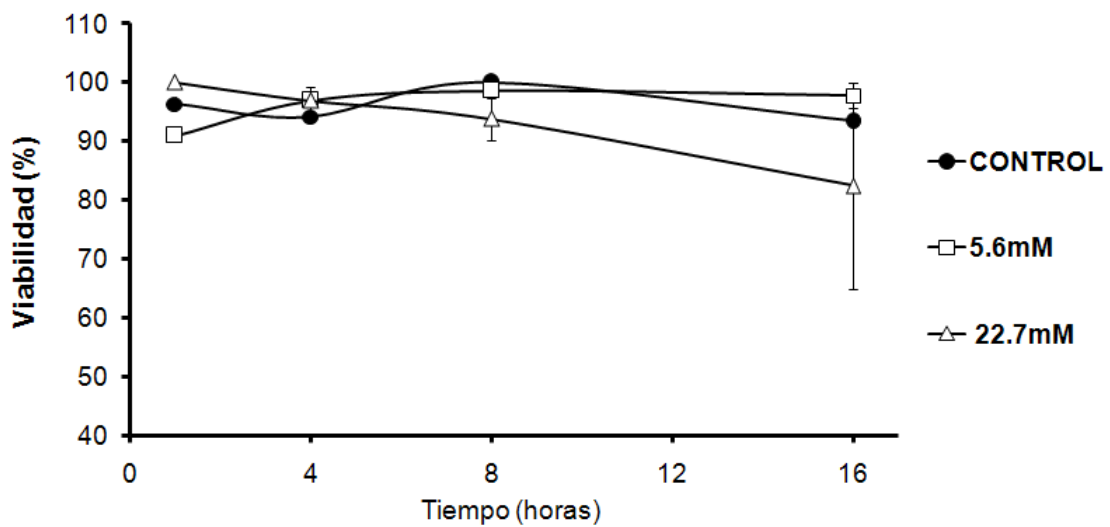


Figura 4. Efecto de la glicina sobre la viabilidad celular. Células Jurkat tratadas con glicina 5.6 y 22.7 mM en tiempos de 1, 4, 8 y 16 horas de incubación. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

Efecto de la glicina sobre la actividad específica de las enzimas antioxidantes

Se determinó la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en las células Jurkat tratadas con 5.6 y 22.7 mM de glicina. La actividad específica relativa de SOD en estas células es mostrada en la Figura 5A, en ella se puede observar que a las 4 horas de tratamiento en ambas concentraciones de glicina, la actividad específica de SOD disminuyó 20% de manera significativa ($p<0.05$) con respecto al control sin tratamiento (100% actividad). El tratamiento con ambas concentraciones incremento la actividad significativamente en un 16% a las 8 horas con respecto al control sin tratamiento. En contraste, únicamente con el tratamiento con 5.6 mM a las 16 horas se observó un incremento de más del 30%, a diferencia del tratamiento con 22.7 mM de glicina, en donde la actividad específica de la enzima mostró una disminución significativa de más del 40% ($p<0.05$) con respecto al control sin tratamiento. La actividad específica de CAT posterior al tratamiento con glicina mostró un incremento significativo del 20% ($p<0.05$) en ambas concentraciones únicamente a las 4 horas de incubación al ser comparados contra el control. Sin embargo, en la primera hora de incubación, al igual que lo observado a las 8 y 16 horas, la actividad de la enzima disminuyó significativamente en ambas concentraciones de glicina, 36% para 5.6 mM y 48% para 22.7mM (Figura 5B) con respecto al control sin tratamiento. La Figura 5C muestra la actividad específica de GPx en células Jurkat tratadas con glicina. En ella se puede observar que únicamente existe un incremento significativo del 14% ($p<0.05$) de la actividad de esta enzima a las 8 horas de incubación con 22.5 mM de glicina al ser comparadas con el control. También se pueden observar una disminución significativa en la actividad de GPx en los tiempos de incubación de 1 y 4 horas en ambas concentraciones 21% y 14 % respectivamente. En contraste, únicamente el uso de glicina 22.7 mM se asoció con una disminución del 15% en la actividad a las 16 horas de incubación, estos resultados son comparados con respecto al control (100% de actividad).

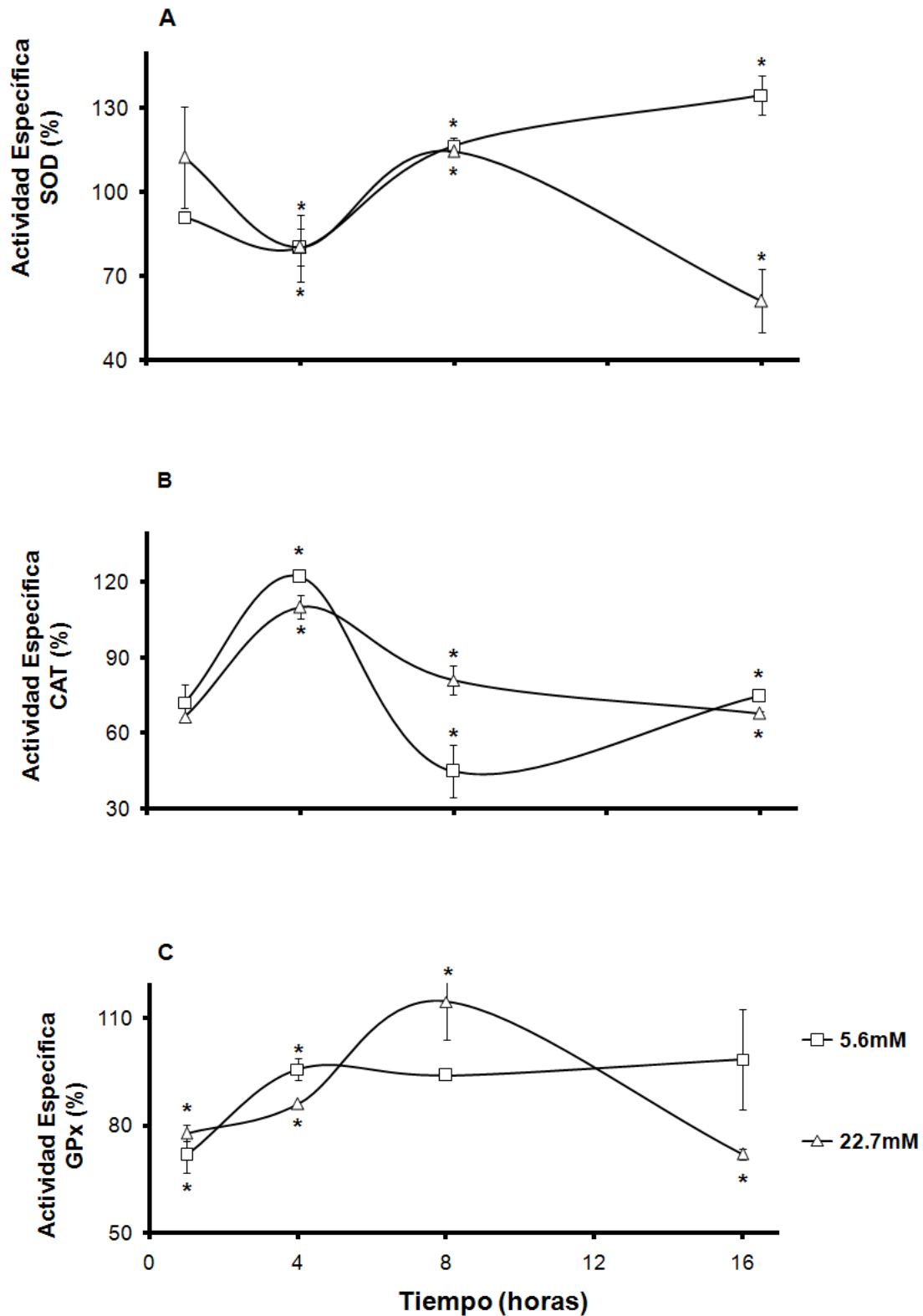


Figura 5. Efecto de la glicina sobre la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. A) Actividad específica de SOD de células Jurkat tratadas con 5.6 y 22.7 mM de glicina durante 1, 4, 8 y 16 horas de incubación. B) Actividad específica de CAT. C) Actividad específica de GPx que fueron obtenidas bajo las mismas condiciones. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n = 3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

Efecto de la glicina sobre la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes

Para medir la expresión de cada uno de los genes de las enzimas antioxidantes se corroboró la pureza e integridad del RNA extraído de cada uno de los tratamientos y controles. La Figura 6 muestra que el RNA se encuentra puro y que el material obtenido es apropiado para ser utilizado en los experimentos de expresión de genes por RT-PCR, observándose las bandas ribosomales 18S y 28S.

Este RNA fue utilizado como templado en la transcripción reversa para la obtención del cDNA y así realizar el RT-PCR para el análisis de posibles cambios en la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes inducidas por los tratamientos. Para verificar la respuesta lineal relacionada con la concentración de templado, se realizaron curvas de calibración para los genes *SOD2*, *CAT*, *GPx* y *RPLP0* mediante diluciones seriales de 1:10 hasta 1:1000. La Figura 2 muestra la linealidad en el método de amplificación al utilizar distintas concentraciones de sustrato (cDNA) de los genes en estudio (Figura 7 A-D).

La Figura 8A muestra los resultados obtenidos de la expresión de *SOD2*. En esta Figura se observa que a las 8 horas de tratamiento la expresión de este gen se incrementa significativamente hasta más de 2 veces ($p < 0.05$) con 5.6 mM hasta 0.7 veces con 22.7 mM de glicina comparados con el control. A diferencia del incremento a las 8 horas de incubación, la expresión de *SOD2* disminuyó significativamente 0.2 veces en los tiempos de incubación de 1, 4 y 16 horas con la concentración de 22.7 mM. La expresión de los genes de *CAT* y *GPx* siguió un patrón similar, en donde también incrementó significativamente su expresión 0.4 veces para *CAT* y el hasta el doble para *GPx* ($p < 0.05$) a las 8 horas de incubación en ambas concentraciones de glicina al ser comparadas con el control. En el caso de la expresión de *CAT*, se observó un incremento de 0.1 veces después de 1 hora de tratamiento con 5.6 mM y una disminución significativa de 0.4 veces a las 4 y 16 horas de incubación con ambas concentraciones. La expresión de *GPx* fue parecida a la de *CAT* sin que se observaran cambios a la primera hora de incubación con ambas concentraciones. Estos resultados se muestran en las Figuras 8B y C. La expresión relativa de cada uno de los genes se determinó mediante el método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

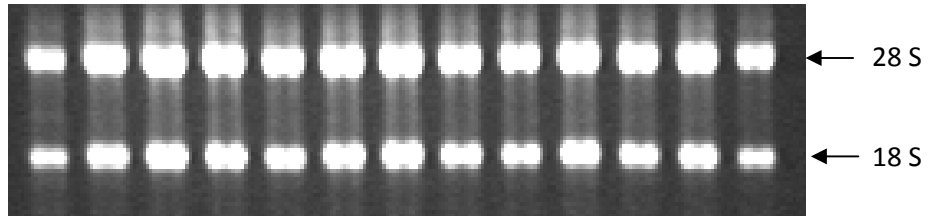


Figura 6. Integridad del RNA después de la extracción por el método de TRIZOL. El RNA total fue analizado en gel de agarosa al 0.9% teñido con BrEt. Muestras representativas de la extracción.

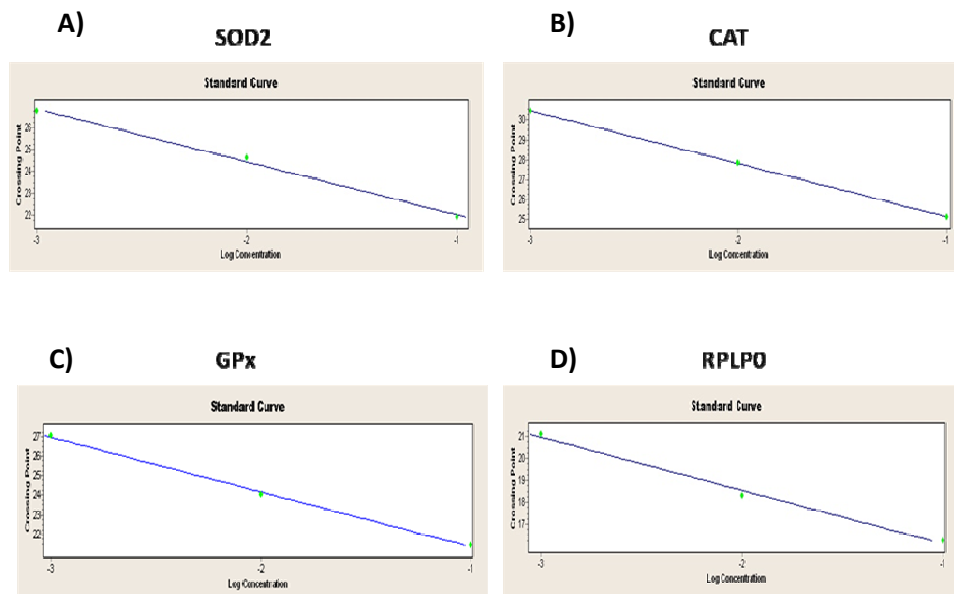


Figura 7. Curvas de calibración de cada uno de los genes de las enzimas antioxidantes. A) *SOD2*, B) *CAT*, C) *GPx*, D) *RPLP0* eficiencia cercana a 2.0 y error ≤ 0.05

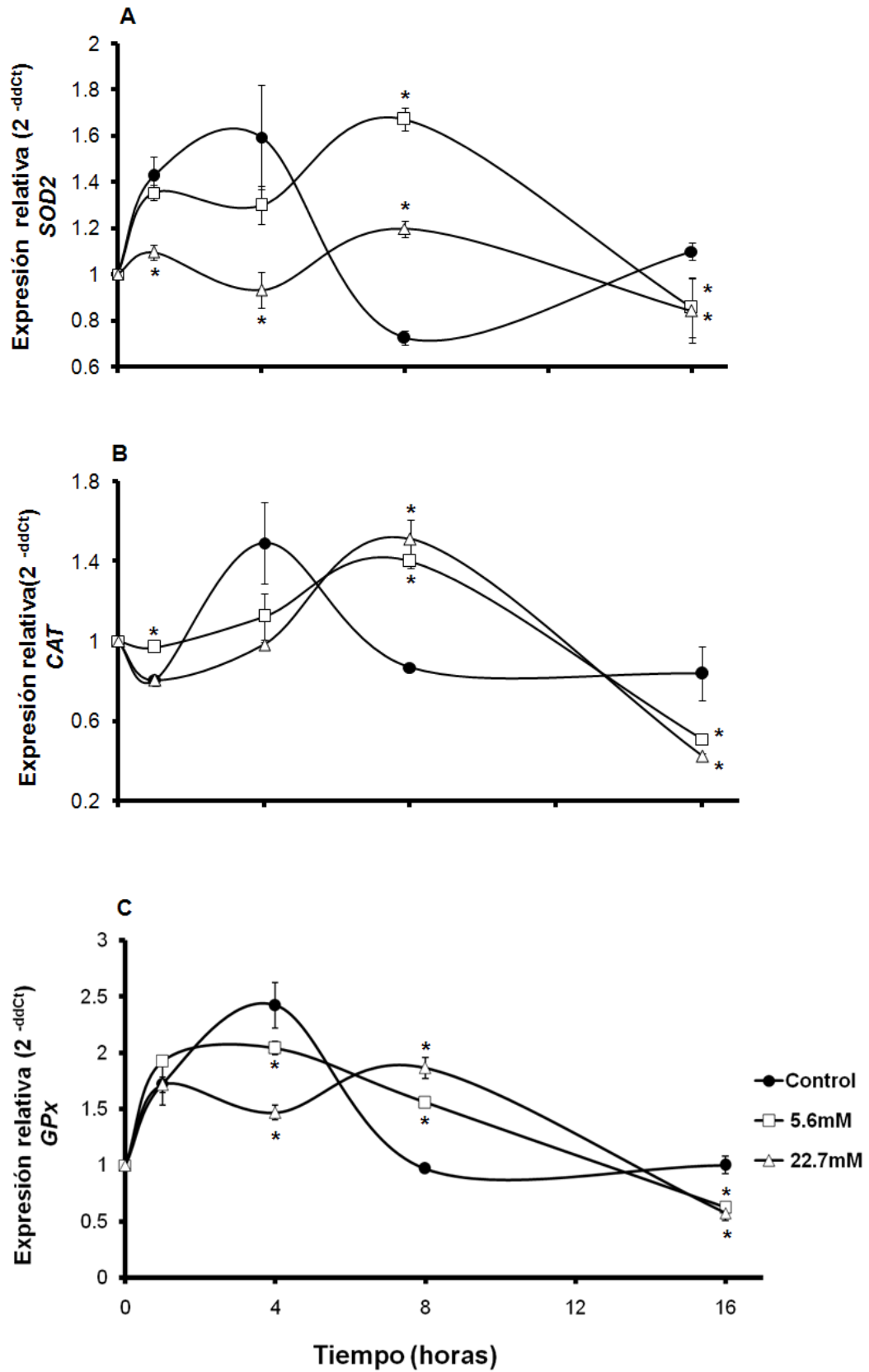


Figura 8. Efecto de la glicina sobre la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. A) Expresión del gen SOD2 de células Jurkat tratadas con 5.6 mM y 22.7 mM de glicina durante 1, 4, 8 y 16 horas de incubación. B) Expresión del gen CAT. C) Expresión del gen GPx. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n = 3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

Efecto de la glicina sobre la producción de O_2^{\bullet} y H_2O_2 en células Jurkat

El estado oxidativo de las células Jurkat tratadas con glicina fue medido mediante citometría de flujo. Los marcadores de estrés oxidativo que se utilizaron para los fines de este estudio fueron dihidroetidio (DHE) que es oxidado por O_2^{\bullet} y dihidrorodamina 123 (DHR 123) que reacciona con H_2O_2 en presencia de peroxidasa, citocromo C o Fe^{2+} , formando en ambos casos fluorocromos detectables a longitudes de onda específicas. La Figura 9 muestra el índice de fluorescencia relativa asociada con la presencia de O_2^{\bullet} en las células Jurkat tratadas con glicina 5.6 y 22.7 mM a las 8 horas de incubación. En ambas concentraciones se observó una disminución significativa en la fluorescencia asociada con la disminución de O_2^{\bullet} al comparar contra el control. Por otra parte, la Figura 10 muestra el índice de fluorescencia de las mismas células incubadas con DHR 123. En esta Figura se puede observar que la fluorescencia asociada a la presencia de H_2O_2 es igual en ambas concentraciones de glicina, sin mostrar diferencias significativas con respecto al control.

Efecto de la glicina sobre la producción de O_2^{\bullet} y H_2O_2 en células Jurkat tratadas con mitógenos

Con la finalidad de determinar si la glicina pudiera tener efectos antioxidantes directos, se realizó un experimento en donde las células fueron incubadas con PQ, Con A y PHA para inducir la producción de radicales libres. Los cambios se evaluaron mediante el uso de los marcadores antes descritos (DHE y DHR 123) los cuales reaccionan específicamente con O_2^{\bullet} y H_2O_2 . Paralelamente se incubaron células en presencia de glicina y los cambios en la fluorescencia fueron evaluados mediante citometría de flujo como en los experimentos anteriores. Los resultados de la fluorescencia inducida por la presencia de RL no muestran cambios cuando son comparados con las muestras tratadas con glicina 11.3 mM (Figura 11 B y D), tanto en la producción y presencia de O_2^{\bullet} y H_2O_2 inducidos por los mitógenos y paraquat (Figura 11 A y C).

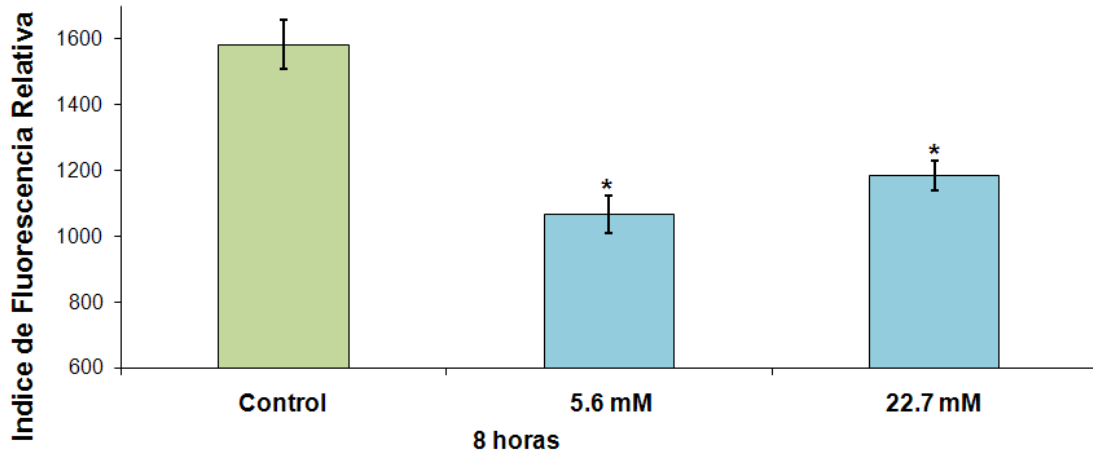


Figura 9. Producción de $O_2^{\cdot -}$ en células Jurkat tratadas con glicina e incubadas con DHE. Los resultados se muestran como media \pm DE del índice de fluorescencia relativa. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

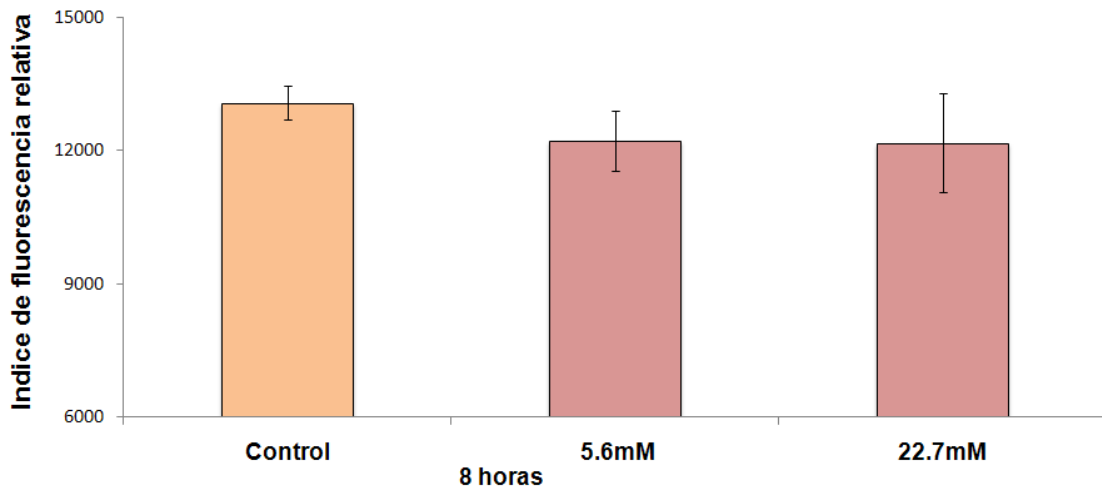


Figura 10 . Producción de H_2O_2 en células Jurkat tratadas con glicina e incubadas con DHR 123. Los resultados se muestran como media \pm DE del índice de fluorescencia relativa. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

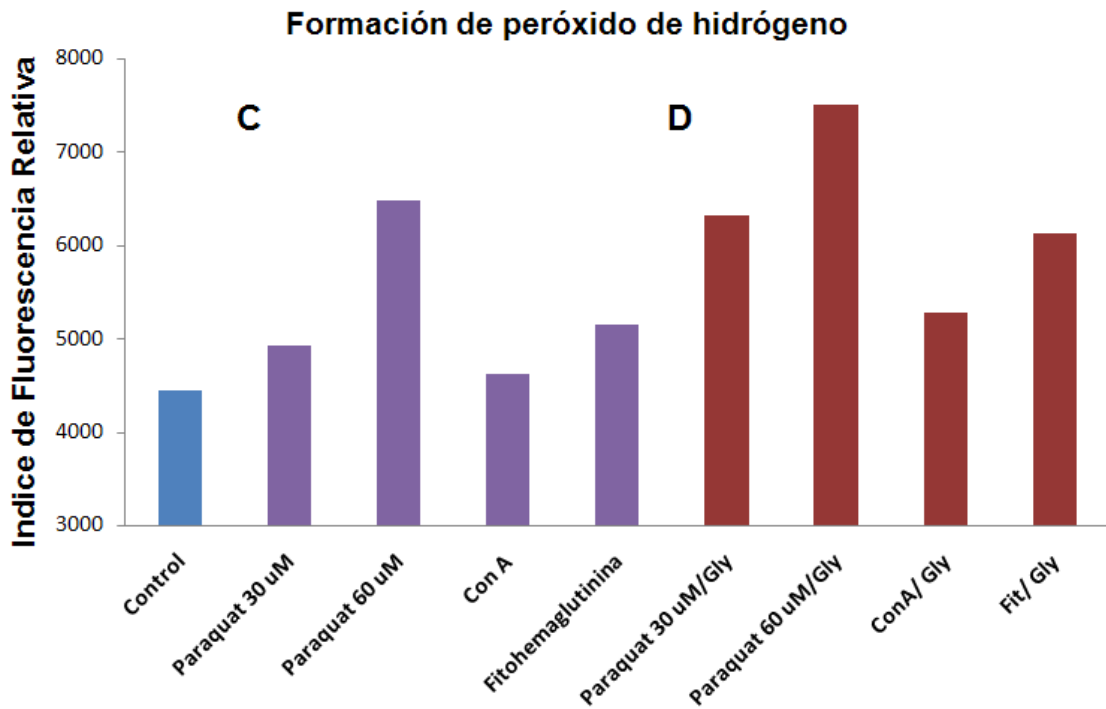
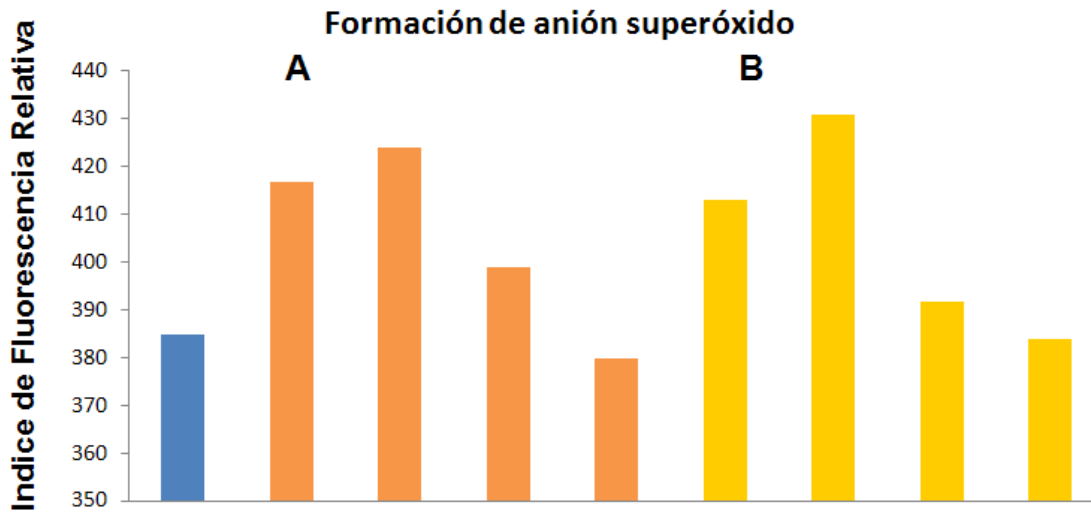


Figura 11. Producción de superóxido y H₂O₂ en células Jurkat. Se utilizaron PQ, Con A y PHA como control en la inducción de la producción de estos radicales en presencia de glicina 11.3 mM.

Efecto de *H. sabdariffa* sobre la proliferación de las células Jurkat

La Figura 12 muestra los resultados obtenidos de la proliferación de las células Jurkat tratadas con distintas concentraciones de *H. sabdariffa*, siendo las concentraciones más altas (10 y 20 mg/mL) y después de 48 horas de tratamiento las que inducen una disminución significativa de la proliferación de estas células, 57% con 10 mg/mL y 63% con 20 mg/mL ($p < 0.05$), cuando son comparadas contra el control.

Efecto de *H. sabdariffa* sobre la viabilidad celular

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la viabilidad de estas células. En la concentración de 0.5 mg/mL no se observan cambios en la viabilidad con respecto al control, sin embargo, con la concentración 20 mg/mL la viabilidad celular disminuyó de manera significativa en un 50% ($p < 0.05$) a las 16 horas de incubación, comparando con el control.

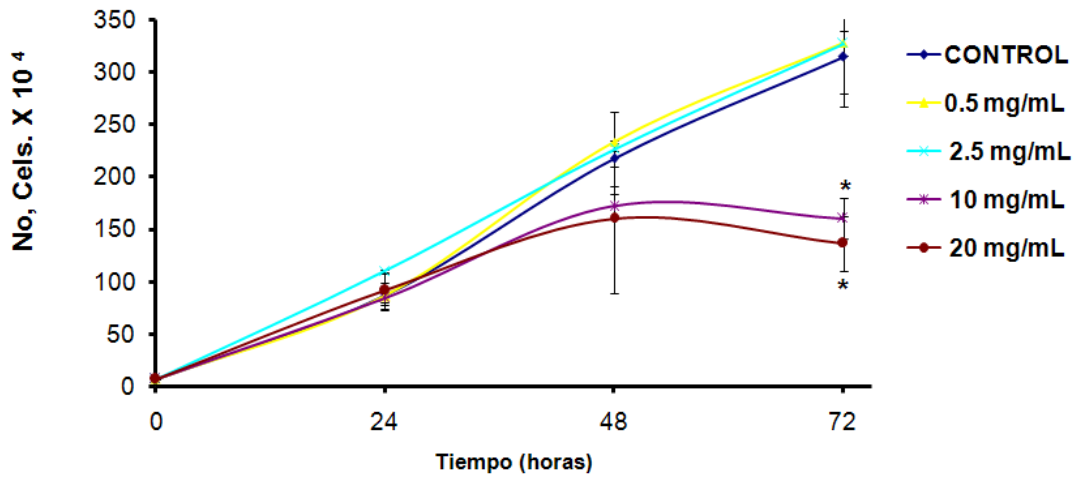


Figura 12. Proliferación de células Jurkat tratadas con distintas concentraciones de *H. sabdariffa*. Los resultados se muestran como cambio en el número de células con respecto al tiempo a distintas concentraciones de *H. sabdariffa*. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

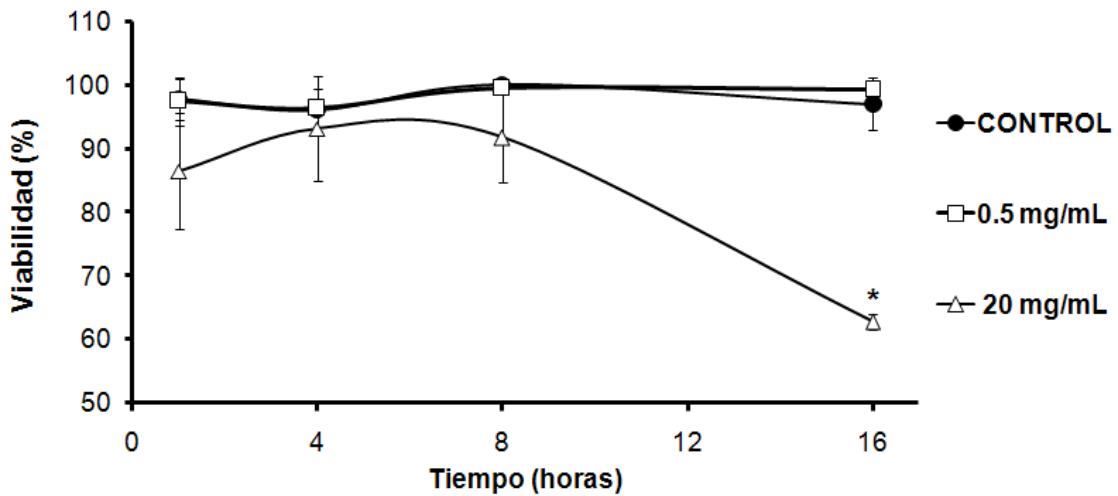


Figura 13. Efecto de *H. sabdariffa* sobre la viabilidad celular. Células Jurkat tratadas con *H. sabdariffa* 0.5 mg/mL y 20 mg/mL en tiempos de 1, 4, 8 y 16 horas de incubación. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

Efecto de *H. sabdariffa* sobre la actividad específica de las enzimas antioxidantes

La actividad específica de SOD en estas células es mostrada en la Figura 14A, en ella se puede observar un incremento significativo (10%) en la primera hora de incubación con una concentración de 20 mg/mL. En contraste, a las 4 horas de tratamiento la actividad específica de SOD tiende a disminuir un 20% con respecto al control (100 %) en ambas concentraciones. En los otros tiempos de incubación no hay diferencias aparentes. La Figura 14B muestra que la actividad específica de CAT es significativamente baja en un 20% en todos los tiempos de incubación en la concentración 0.5 mg/mL a excepción de las 4 horas de incubación, cuando se compara con el control. Se observó también una disminución significativa del 10% con una hora de incubación a la concentración de 20 mg/mL y que no hay cambios aparentes en la actividad de CAT después de las 4 horas de incubación con respecto al control. Por otro lado, la actividad específica de GPx (Figura 14C) mostró un incremento significativo del 41% en la primera hora de incubación con 0.5 mg/mL y con el tiempo de incubación disminuyó significativamente a valores por debajo de aquellos determinados para el control. Con la concentración de 20 mg/mL se observó una disminución significativa con incubaciones de 1, 4 y 8 horas (60%), incrementándose finalmente a las 16 horas de tratamiento (18%).

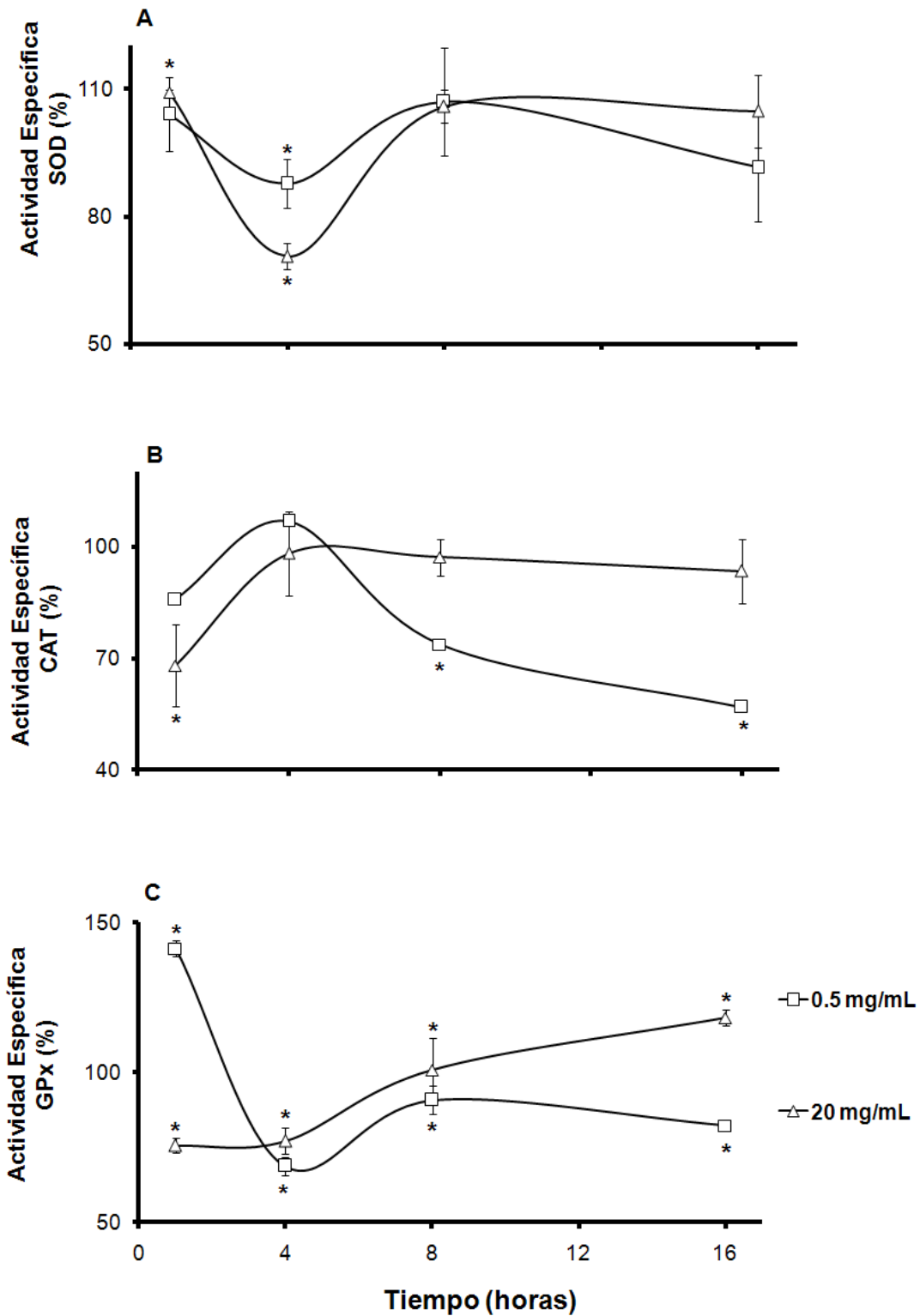


Figura 14. Efecto de *H. sabdariffa* sobre la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. A) Actividad específica de SOD B) Actividad específica de CAT. C) Actividad específica de GPx. Las células Jurkat fueron tratadas con 0.5mg/mL y 20mg/mL de *H. sabdariffa* durante 1, 4, 8, y 16 horas de incubación y los resultados comparados con células control sin tratamiento e incubadas a los mismos tiempos. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

Efecto de *H. sabdariffa* sobre la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes

La Figura 15A muestra los resultados obtenidos de la expresión de SOD2 de las células que fueron tratadas con el extracto de *H. sabdariffa* 0.5. y 20 mg/mL. En esta gráfica se observa que a las 8 horas de incubación la expresión de este gen incrementa significativamente 5 veces ($p < 0.05$) cuando las células son tratadas con 20 mg/mL del extracto. En contraste, la expresión disminuyó con el tiempo de incubación de 4 horas con la concentración de 0.5 mg/mL (0.3 veces). La expresión del gen *CAT* mostró un incremento significativo (0.2 veces) a partir de las 4 horas de tratamiento y hasta de 2 veces con 20 mg/mL con respecto al control. No se observaron cambios en la expresión cuando las células fueron incubadas con 0.5 mg/mL (Figura 15B). De manera similar, la expresión de GPx se incrementó significativamente (0.1 veces) después de las 4 horas y hasta 4 veces a las 8 horas de tratamiento con 20 mg/mL ($p < 0.05$) con respecto al control. La incubación con 0.5 mg/mL resultó en un incremento inicial de 0.2 veces en la expresión de GPx; sin embargo, a las 16 horas de tratamiento la expresión disminuyó significativamente con respecto al control sin tratamiento (Figura 15C). Además se puede observar en las tres gráficas que la expresión de los tres genes sigue el mismo patrón de cambio en relación al control.

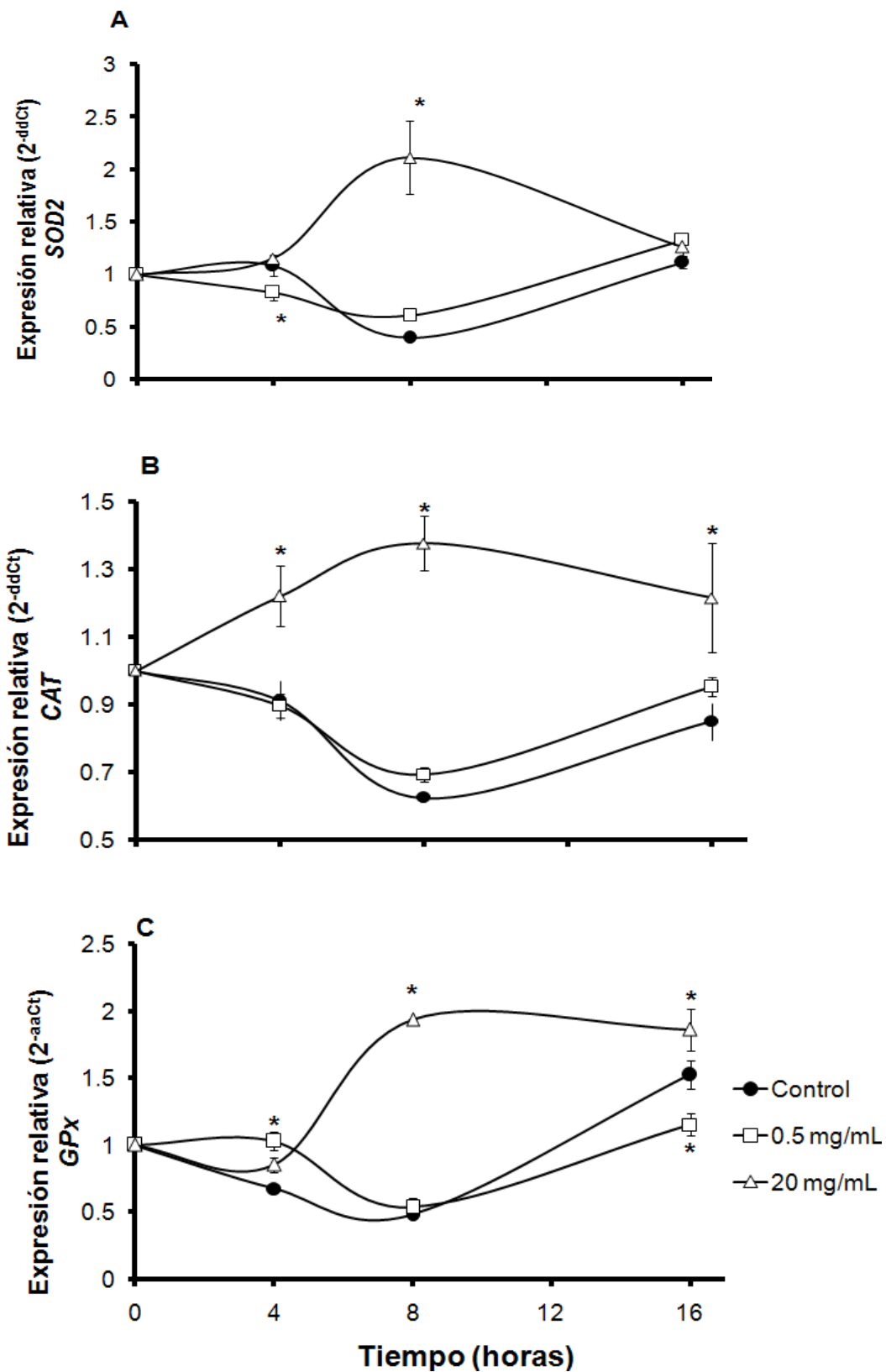


Figura 15. Efecto de *H. sabdariffa* sobre la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. A) expresión del gen *SOD2*. B) Expresión del gen de *CAT*. C) Expresión del gen *GPx*. Las células Jurkat fueron tratadas con 0.5mg/mL y 20mg/mL de *H. sabdariffa* durante 1, 4, 8, y 16 horas de incubación y los resultados comparados con células control sin tratamiento e incubadas a los mismos tiempos. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

Efecto de *H. sabdariffa* sobre la producción de O_2^{\bullet} y H_2O_2 en células Jurkat

La Figura 16 muestra el índice de fluorescencia relativa derivada de la producción de O_2^{\bullet} en las células Jurkat tratadas con *H. sabdariffa* a sus distintas concentraciones. En esta Figura se puede observar que con la menor concentración del extracto (0.5mg/mL) hay un incremento en la producción de este RL cuando se compara con el control. Aunque existe una aparente disminución de la formación de O_2^{\bullet} en las células tratadas con 20 mg/mL del extracto, este decremento no es significativo ya que la desviación estándar que se presenta es grande. Por otra parte, la Figura 17 muestra el índice de fluorescencia relacionado con la producción de H_2O_2 en las células tratadas bajo las mismas concentraciones de *H. sabdariffa* y en el mismo tiempo de incubación (8 horas). En esta Figura se puede observar que la producción o presencia de H_2O_2 se incrementa significativamente y de manera directa con respecto al aumento en la concentración del extracto de *H. sabdariffa*.

Cambios en la actividad de SOD2 en ambos tratamientos

La actividad de SOD2 no se vio afectada significativamente a las 8 horas de tratamiento con las distintas concentraciones de glicina cuando se compara con el control sin tratamiento, como lo muestra la Figura 18A. Se puede observar que con respecto a la actividad de la isoforma SOD1, la actividad SOD2 está presente en todas las concentraciones. En contraste, en la Figura 18B se muestra que a las 8 horas de tratamiento de *H. sabdariffa*, la actividad de SOD2 desaparece a concentraciones altas. El análisis densitométrico de los geles de actividad se presentan en la Figura 19, en donde se puede observar que el tratamiento de glicina induce cambios no significativos en la relación SOD2/SOD1 (Figura 19A). En contraste, el tratamiento de *H. sabdariffa* muestra que la actividad de la enzima SOD2 disminuyó dramáticamente en relación al incremento de la concentración del extracto (Figura 19B). Estas observaciones pudieran correlacionarse con la viabilidad de los cultivos tratados con ambos compuestos.

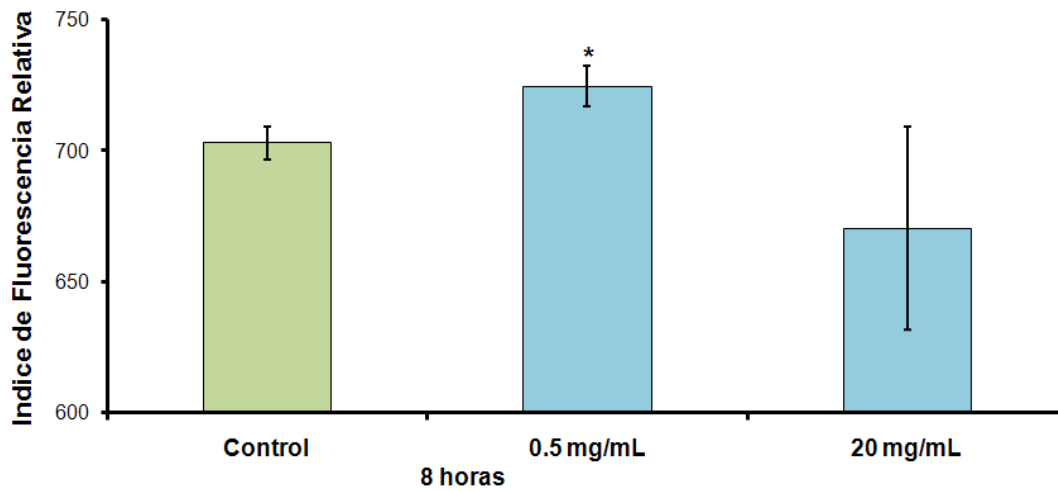


Figura 16. Producción de $O_2^{\cdot -}$ en células Jurkat tratadas con *H. sabdariffa*. Índice de fluorescencia relativa en células tratadas con distintas concentraciones de *H. sabdariffa* durante 8 horas de incubación contra en control sin tratamiento. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

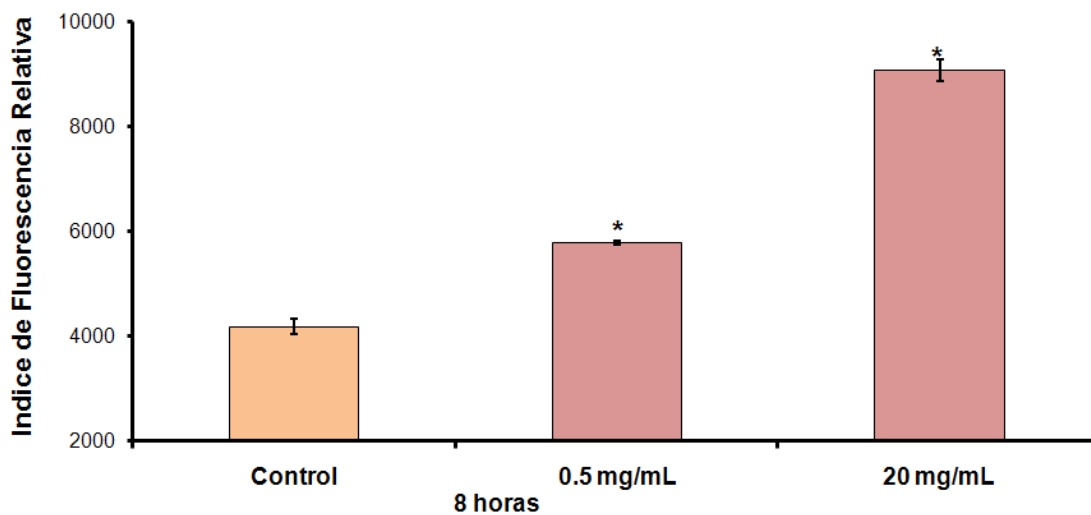


Figura 17. Producción de H_2O_2 en células Jurkat tratadas con *H. sabdariffa*. Índice de fluorescencia relativa en células tratadas con distintas concentraciones de *H. sabdariffa* durante 8 horas de incubación contra en control sin tratamiento. ANOVA, Tukey ($p < 0.05$) $n=3$; *Diferencia significativa con respecto al control.

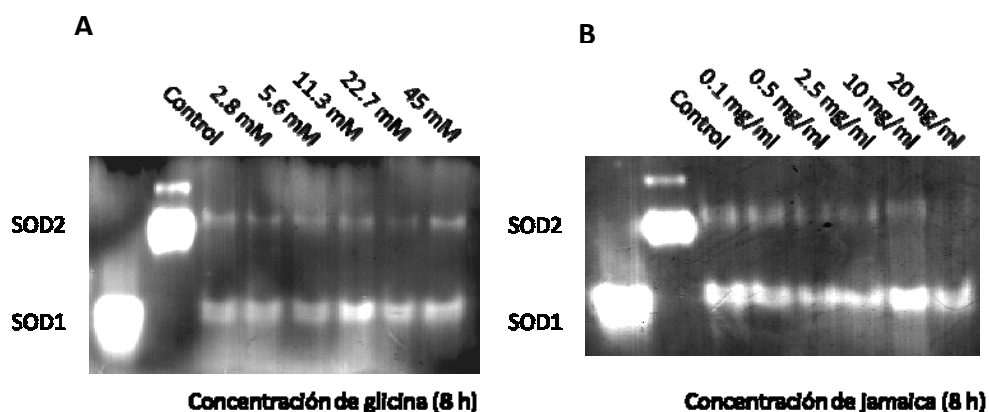


Figura 18. Geles de actividad de SOD. A) Gel de actividad de SOD de células Jurkat tratadas con las distintas concentraciones de glicina. B) Gel de actividad de SOD de células Jurkat tratadas con las distintas concentraciones de *H. sabdariffa*. Se utilizaron como marcadores de actividad SOD y SOD1 humanas.

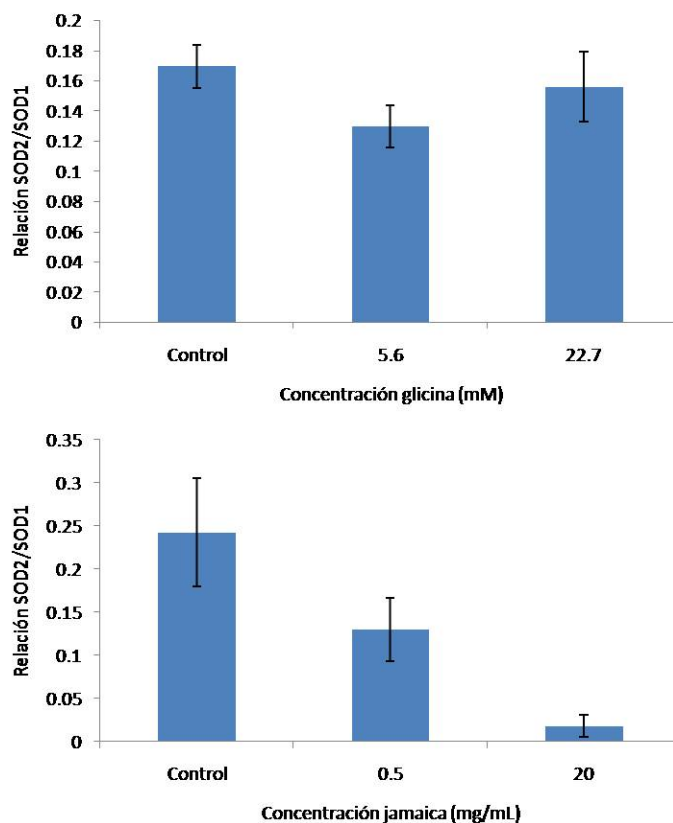


Figura 19. Relación SOD2/SOD1 por análisis densitométrico de los geles de actividad de SOD con los tratamientos de glicina e *H. sabdariffa*. Los resultados se representan como media \pm DE de al menos tres lecturas independientes.

7. DISCUSIÓN

Aunque se sabe que las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) juegan un papel fisiológico importante, se sabe que cuando su producción es elevada, a lo cual se le ha denominado estrés oxidativo, éste se encuentra asociado con diferentes condiciones fisiopatológicas y con el desarrollo de diversas enfermedades. Esta situación obligó a las células a desarrollar diferentes estrategias de defensa contra ERO, donde se incluyen mecanismos de tipo enzimático y no enzimáticos. Como parte de los mecanismos no enzimáticos se encuentran las vitaminas A, D, E y C, moléculas clásicamente empleadas en la terapéutica antioxidante.

Actualmente se ha propuesto el uso de muchas otras moléculas como posibles antioxidantes, tal es el caso del aminoácido más simple, la glicina. Numerosas son las evidencias en relación a la propiedad citoprotectora de este aminoácido, destacando el decremento de la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. Además, reduce el cáncer causado por agentes químicos, previene la hipoxia, bloquea la muerte celular programada y la formación de RL (Stachlewitz *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1998). De la misma manera, existen evidencias del efecto antioxidante de otros compuestos derivados de plantas como son los polifenoles y antocianinas, un ejemplo es *H. sabdariffa*, mejor conocida como jamaica. Se ha demostrado que las antocianinas que se encuentran en el extracto de esta planta posiblemente son las responsables de su capacidad antioxidante ya que tienden a disminuir la formación de RL (Suboh *et al.*, 2004), disminuyendo la formación de malondialdehído, producto final de la lipoperoxidación (Farombi *et al.*, 2007). A pesar de las evidencias existentes sobre los efectos antioxidantes de la glicina y de *H. sabdariffa* en los modelos de estrés oxidativo, aún no se conocen los mecanismos moleculares mediante los cuales actúan estos compuestos.

En ese sentido, modelos de estudio para evaluar el efecto de moléculas antioxidantes, como son los cultivos celulares derivados de enfermedades asociadas a estrés oxidativo, como la línea celular Jurkat (linfocitos de origen canceroso), pueden

ayudar a explicar su efecto en el desbalance entre oxidantes y antioxidantes que pueden resultar en estrés oxidativo (Hernández, 2010).

Se ha demostrado en la línea celular Jurkat que la cantidad y la actividad de la enzima antioxidante SOD2 es muy baja debido a su sensibilidad a inactivación por temperatura y alquilación debido a una mutación (Hernández y McCord, 2003; Hernández *et al.*, 2010). Se ha reportado que los bajos niveles de SOD2 mitocondrial están asociados con procesos tumorigénicos y cáncer (Oberley y Oberley, 1986; Sun, 1990). Por lo que esta línea celular es adecuada para los fines de este protocolo.

El presente estudio muestra evidencias que el tratamiento con glicina tiende a disminuir la proliferación y viabilidad de las células Jurkat de manera dosis y tiempo dependiente, cuando se compara con el control. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Stachlewitz y col. (1999), quienes demostraron que la glicina causa un decremento dosis-dependiente en la proliferación de las células Jurkat. Trabajos previos de este mismo autor demostraron que el mecanismo por el cual este aminoácido disminuye la proliferación es a través de la activación de los canales de Cl⁻ dependientes de glicina, al hiperpolarizar la membrana celular e impidiendo la entrada de Ca²⁺ al interior de la célula, que es requerido para la activación de factores de transcripción necesarios para la proliferación. Estudios similares fueron realizados por Wheeler y col. (2000) quienes demostraron que cuando los neutrófilos son estimulados con endotoxinas, cambios en el potencial de membrana activan la transducción de señales. En presencia de glicina, bloquea el cambio del potencial de membrana y la entrada de Ca²⁺ por lo tanto detiene la transducción de señales. Este mecanismo probablemente explique nuestros resultados en los cambios de la viabilidad de las células Jurkat, en donde a mayor concentración de glicina (22.7 mM), la viabilidad disminuye significativamente.

Por otra parte, los resultados obtenidos con el tratamiento del extracto de *H. sabdariffa* demuestran que existe un efecto citotóxico después de las 48 horas de incubación en la proliferación de manera significativa a dosis de 10 y 20 mg/ mL. En cuanto a la viabilidad solo con 20 mg/mL hay una disminución significativa comparada con

el control. Estos resultados están relacionados con el incremento en la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno observadas tempranamente a las ocho horas, teniendo como consecuencia el incremento del estrés oxidativo y por tanto daño a diferentes moléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN), lo cual resulta en la muerte celular.

Durante el metabolismo celular, se generan normalmente especies reactivas que tienen una capacidad oxidante mayor que el oxígeno molecular (O_2), su eliminación puede evitar daños importantes. En este contexto, las células cuentan con enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) que permiten su eliminación o previenen su formación. Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de SOD y CAT en células tratadas con 5.6 y 22.7 mM de glicina muestran un incremento significativo, a las 8 horas para SOD y a las 4 horas para CAT. La actividad de GPx únicamente mostró un incremento significativo en la mayor concentración de glicina a las 8 horas de tratamiento.

Los cambios en actividad de estas enzimas podrían ser por cambios en el sistema redox en el ciclo celular (proliferación) y el otro por su importancia en la eliminación de subproductos asociados a la producción de energía que pudieran ser dañinos a las células. La enzima SOD2 es regulada en gran parte por cambios en el estado redox celular. Además, es la más importante en la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ formado por la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. De tal manera que el incremento en la actividad específica de SOD a las 8 horas en células tratadas con glicina (5.6 y 22.7 mM) podría deberse, a la producción de $O_2^{\bullet-}$ causada por el metabolismo celular en las primeras horas de proliferación celular, el cual decrece al tiempo que SOD muestra su máxima actividad (8 hrs). En respuesta a la producción de H_2O_2 por la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, la actividad específica de CAT se encuentra incrementada durante las primeras 4 horas de incubación con ambas concentraciones de glicina. Se ha propuesto que dada la afinidad de esta enzima por su sustrato, su función es la eliminación de concentraciones altas de H_2O_2 (Zamocky *et al.*, 1999). Por el contrario, las enzimas que tienen una afinidad mayor por el H_2O_2 como la GPx, actúan preferencialmente a bajas concentraciones de sustrato, lo cual concuerda con lo observado en los cambios de actividad de esta enzima, pues se

incrementa a las 8 horas de tratamiento únicamente con la mayor concentración de glicina. A diferencia de la catalasa esta enzima emplea un agente reductor que se oxida como resultado de la reacción, por tanto, para que la actividad de GPx continúe, el estado reducido de estos sustratos se debe restablecer y ello depende del poder reductor celular, principalmente del NADPH⁺. En contraste, la actividad de la catalasa no depende del estado redox de la célula, de manera que es activa aun cuando el poder reductor celular es bajo (Arthur 2000). Cabe mencionar que la actividad de las enzimas disminuye a las 16 horas de tratamiento con glicina 22.7 mM, lo que podría relacionarse con la eliminación parcial de O₂^{•-} por el incremento inicial de la actividad de SOD, resultando entonces en una disminución en la actividad de las enzimas.

Los resultados de la actividad específica con el tratamiento de *H. sabdariffa* muestran que la actividad de SOD con *H. sabdariffa* 20 mg/mL pudiera asociarse a una condición oxidante y no tanto a la proliferación de estas células. La disminución observada a las 4 horas en ambas concentraciones apoya la anterior observación, puesto que se ha puesto en evidencia la inactivación de SOD por concentraciones de H₂O₂ formado en respuesta a la dismutación de O₂^{•-} formado al inicio de ambos tratamientos. A pesar que la actividad de CAT a la primera hora disminuye siendo significativa con 20 mg/mL, es posible que sea suficiente para catalizar la conversión del H₂O₂. Sin embargo el aumento a las 4 horas de incubación con valores cercanos al 100%, pudiera ser en respuesta al incremento en H₂O₂ mencionado anteriormente. Por otra parte GPx no mostro cambios significativos en ambas concentraciones. Contrario a la actividad de CAT, la GPx aumentó en un 50 % con la concentración de 0.5 mg/mL, lo cual esta asociado con el incremento en la actividad de SOD y es indicativo de un ambiente oxidativo bajo. Por lo que respecta a la concentración de 20 mg/mL, es probable que la actividad de la enzima GPx esta disminuida por la falta del poder reductor.

En comparación a lo encontrado con el tratamiento de glicina, las actividades en estas enzimas se encuentran bajas, lo cual podría ser el resultado de una baja eficiencia en su actividad dada por una sobreproducción de O₂^{•-} o H₂O₂ (Usoh *et al.*, 2005) lo que se puede relacionar directamente con la disminución en la viabilidad.

El incremento significativo a las 8 horas de tratamiento con ambas concentraciones de glicina se correlaciona con la actividad específica de las respectivas enzimas. En la expresión de los genes que codifican para estas mismas enzimas en las células tratadas con *H. sabdariffa* se observó un incremento significativo a las 8 horas de tratamiento únicamente con la concentración mayor del extracto (20 mg/mL), asociado con una actividad cercana al 100%.

Aun cuando en este trabajo no se tiene la evidencia suficiente para conocer el mecanismo por el cual estos genes incrementan su expresión, se conoce que estas enzimas son reguladas por cambios en el balance redox celular. La expresión del gen *SOD2* está regulada en gran parte por dicho balance. Lo anterior sugiere que existe una respuesta adaptativa al desequilibrio oxidativo mitocondrial. El gen *SOD2* contiene secuencias regulatorias que incluyen a NFκB, SP-1 y AP-2 que responden a cambios en el estado redox celular. También, su expresión es inducida por diversas citosinas y factores de transcripción asociados a procesos de tipo proinflamatorio como es el caso de TNF-α, entre otras, así como por inductores de estrés oxidativo como es el caso del mismo O_2^{\bullet} (Visner *et al.*, 1990). De tal manera que el incremento en la expresión de este gen, provocado por cambios redox celulares y muy probablemente por cambios en los niveles de Ca^{2++} , puede asociarse así mismo con un aumento en la expresión del resto de los genes de las enzimas antioxidantes encargadas de la catálisis del H_2O_2 .

Por último, se evaluó la formación de especies reactivas de oxígeno posterior a los tratamientos con glicina y el extracto antioxidante de *H. sabdariffa* mediante el uso de fluorocromos específicos para la detección de O_2^{\bullet} y H_2O_2 por citometría de flujo. Se encontró que de manera significativa y tras el tratamiento con 5.6 y 22.7 mM de glicina la formación de O_2^{\bullet} disminuyó con respecto al control a las 8 horas de incubación, lo cual puede relacionarse con el aumento en la expresión y la actividad específica de la enzima SOD. Sin embargo, no se encontraron cambios en la producción de H_2O_2 , cuando se compara con las células control.

Mediante el uso de los fluorocromos mencionados y citometría de flujo se determinó experimentalmente si la glicina *per se* participa en la eliminación o posiblemente en la formación de ERO. En dicho experimento se utilizaron PQ, Con A, PHA, puesto que se ha demostrado que estos mitógenos participan en la inducción de la formación de O_2^{\bullet} . Existen evidencias de la participación de este anión sobre la proliferación de linfocitos T, siendo la PHA quien tiene un efecto mayor en la formación de O_2^{\bullet} (Hernández y McCord, 2008). De acuerdo a esto, las células fueron tratadas con estos mitógenos a distintas concentraciones y también fueron incluidas células tratadas con glicina 11.3 mM y los mitógenos. Los resultados no mostraron diferencias en la formación de O_2^{\bullet} y H_2O_2 tras los tratamientos con mitógenos con o sin glicina, lo cual descarto la idea de que este aminoácido participa en la formación o eliminación directa de ERO.

Por otra parte, los resultados que muestran la formación de ERO en células tratadas con *H. sabdariffa* se encuentran en las Figuras 12 y 13. En la Figura 12 se puede observar que la producción de O_2^{\bullet} incrementa significativamente con 0.5 mg/mL del extracto, lo cual puede deberse a una baja eficiencia de las enzimas antioxidantes o a la inducción de la producción de este radical por el mismo extracto. Estos datos correlacionan con una alta citotoxicidad dada por el incremento en la formación de H_2O_2 de manera dependiente a la concentración del extracto y por ende una disminución en la viabilidad de estas células.

La evaluación de actividad enzimática de SOD demostró cambios a las 8 horas de incubación en ambas concentraciones de glicina lo cual se correlaciono con el incremento en la expresión del gen *SOD2*, sin embargo la actividad de SOD2 determinada por la relación SOD2/SOD1 en geles de actividad no fue evidente. Aun así, se demostró que no existen cambios significativos en dicha relación a las 8 horas de incubación con todas las concentraciones de glicina utilizadas. En contraste, el tratamiento con el extracto de *H. sabdariffa* se asocio con la disminución de la relación SOD2/SOD1 de manera dosis dependiente, lo cual resulta interesante dada la sensibilidad de la enzima SOD2 de células Jurkat reportada previamente.

En conclusión, en las células Jurkat tratadas con glicina no hay citotoxicidad significativa en ninguna de las concentraciones utilizadas evaluado por la viabilidad celular. Sin embargo, se observa una disminución en la proliferación después de las 48 horas en respuesta al incremento de la concentración y del tiempo. Se incrementa la actividad de las enzimas SOD y CAT a las 8 horas y 4 horas de tratamiento, respectivamente. Sin embargo, disminuyen su actividad con la mayor concentración (22.7 mM) después de 16 horas de tratamiento. Con respecto a GPx no se observaron cambios importantes en ninguna concentración. Por otra parte, ambas concentraciones inducen la expresión de los tres genes que codifican para las enzimas antioxidantes a las 8 horas de tratamiento. El incremento en SOD2 no fue evidente en geles de actividad en donde se determino la relación SOD2/SOD1. En cuanto a la producción y presencia de $O_2^{\bullet-}$, ambas concentraciones no inducen cambios importantes cuando se comparan con el control. De la misma manera no se observaron cambios significativos en la producción de H_2O_2 en ambas concentraciones.

En el caso de las células tratadas con el extracto de *H. sabdariffa* hay una notoria citotoxicidad en las concentraciones mayores en donde se observa que hay inhibición de crecimiento y disminución hasta de un 40% en la viabilidad. Existe una tendencia a incrementar SOD, mientras que en CAT y GPx no se observan cambios en su actividad a la mayor concentración (20 mg/mL) con respecto al tiempo de tratamiento. Todos los genes incrementan su expresión a las 8 horas de incubación con 20 mg/mL. Los cambios en la actividad de SOD fue evidente en geles de actividad en donde se determino la relación SOD2/SOD1. Hay un incremento en la formación de $O_2^{\bullet-}$ con 0.5 mg/mL del extracto. Se observó una acumulación de H_2O_2 , de manera concentración dependiente después de 4 horas de incubación. Finalmente, se observó que los dos tratamientos tienen una manera distinta de inducir cambios en el sistema antioxidante de las células Jurkat. Por un lado, la glicina puede modificar el metabolismo celular, muy posiblemente por cambios en el balance iónico (concentraciones de Cl^- y Ca^{2+}) y por otro, *H. sabdariffa* en donde los cambios observados están asociados a la sobreproducción de especies reactivas derivadas del oxígeno. Sin embargo, no se debe descartar la importancia de las concentraciones

utilizadas en cada caso, pues al parecer la glicina puede inducir señales que en un momento pueden proteger a las células del estrés oxidativo y *H. sabdariffa* en contraste, podría estar propiciando un estrés oxidativo y de esta manera inducir una respuesta protectora a concentraciones adecuadas.

8. CONCLUSIONES

El tratamiento con glicina:

1. No tiene efectos citotóxicos sobre las células Jurkat.
2. Incrementa la actividad específica de las enzimas antioxidantes SOD y GPx a las 8 horas de tratamiento.
3. No modifica la actividad específica de CAT a las ocho horas de tratamiento.
4. Induce la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes a las ocho horas de tratamiento.
5. Disminuye la producción de anión superóxido.

El tratamiento con el extracto de H. sabdariffa:

6. Tiene efectos citotóxicos sobre las células Jurkat.
7. Tiende a incrementar la actividad específica de SOD a las ocho horas de tratamiento.
8. Disminuye la actividad específica de las enzimas CAT y Gpx.
9. Induce la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes a las ocho horas de tratamiento.
10. Incrementa la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar las concentraciones de Ca^{+2} en células Jurkat tratadas con glicina mediante citometría de flujo.
- Determinar concentraciones adecuadas para el extracto de *H.sabdariffa*.
- Determinar la formación de superóxido con mitógenos y con el extracto de *H.sabdariffa*.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alarcon F., Almanza J., Blancas G., Angeles S., Garcia R., Roman R., Cruz M.** (2008). Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. *Eur J Pharmacol*; 599: 152-8.
2. **Arthur J.** (2000). The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*; 57: 1825-35.
3. **Babior B., Kipnes R., Curnutte J.** (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*; 52: 741-50.
4. **Bergmeyer, H.** (1955). Zur messung von katalase-aktivitäten. *Biochem Z*; 327: 255-58.
5. **Berlett B. and Stadtman E.** (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*; 272: 20313-16.
6. **Brigelius R. and Traver M.** (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*; 13: 1145-55.
7. **Cadet J., Delatour T., Douki T.** (1999). Hidroxil radicals and DNA base damage. *Mutat Res*; 424: 9-11.
8. **Cheesman K. and Slater T.** (1998). Free radicals in medicine. *Br Med Bull*; 4: 841-93.

9. **Cruz M, Maldonado B., Mondragon G., Sánchez B., Wacher N., Carvajal S., Kumate J.** (2008). Glycine treatment decreases proinflammatory cytokines and increases interferon- γ in patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*; 31: 694-99.
10. **Deters M., Strubelt O. and Younes M.** (1997). Protection by glycine against hypoxia-reoxygenation induced hepatic injury. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*; 97: 199-213.
11. **Farombi E. and Ige O.** (2007). Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol*; 21: 601-9.
12. **Flint D., Tuminello J., and Emptage M.** (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem*; 268: 22369-76.
13. **Fraga C., Shigenaga M., Park J., Degan P.** (1999). Oxidative damage to DNA during aging. *Proc Natl Acad Sci*; 87: 4533-7.
14. **Fridovich I.** (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*; 201: 875–80.
15. **Garner, B., Witting K., Waldeck A., Christison J., Raftery M., and Stocker R.** (1998). Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem*; 273: 6080-87.
16. **Guttergide J. and Halliwell B.** (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*; 15: 129-35.

17. **Hadju J., Wyss S., Aebi H.** (1977) Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem*; 80: 199-207.
18. **Halliwell B.** (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free Rad Res*; 25: 439-54.
19. **Hassan H. and Fridovich, I.** (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem*; 254: 10846-52.
20. **Hemila H., Kaprio J., Albanes D.** (2002). Vitamin C, vitamin E, and beta-carotene in relation to common cold incidence in male smokers. *Epidemiology*; 13: 32–37.
21. **Hernandez D. and McCord J.** (2003). Paradoxical effects of thiol reagents on Jurkat cells and a new thiol-sensitive mutant form of human mitochondrial superoxide dismutase. *Cancer Res*; 63: 159-63.
22. **Hernandez D. and McCord J.** (2008). Proliferación y apoptosis de linfocitos humanos cultivados, inducidas por anión superóxido. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 46: 533-38.
23. **Hernandez D., Quijano C., Demicheli V., Souza J., Radi R., and McCord J.** (2010). Thiol-sensitive mutant forms of human SOD2, L60F and I58T: The role of Cys140. *Free Radic. Biol. Med.* 2010. En prensa.
24. **Hickey S. and Roberts H.** (2004). *Ascorbate the science of vitamin C*. Napa (California): Lulu Press. 264 p.

25. **limuro Y., limuro Y., Bradford B., Forman D. and Thurman R.** (1996) Glycine prevents alcohol-induced liver injury by decreasing alcohol in the stomach. *Gastroenterology*; 110: 1536–42.
26. **Kappus H. and Sies H.** (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*; 37: 1233- 41.
27. **Loza H., Torres N., Díaz M., Cruz, M., Hernández D.** (2007). Glycine reduces the oxidative stress in patients with Metabolic Syndrome. *FASEB J*; 21: 185.
28. **Lowry, O., Rosebrough N., Farr A. and Randall R.** (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem*; 193: 265-275.
29. **Marklund, S.** (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Nat Acad Sci USA*; 79: 7634–38.
30. **Matilla B., Mauriz L.,Culebras J., González J., González P.** (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr Hosp*; 17: 2-9.
31. **Mauriz J., Matilla B., Culebras J., González P., González G.** (2001). Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radic Biol Med*; 31: 1236-44.
32. **McCall M. and Frei B.** (2002). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radic Biol Med*; 26: 1034-53.
33. **McCord J.** (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*; 85: 529-31.
34. **McCord J. and Fridovich I.** (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*; 244: 6049-55.

35. **McCord J. and Turrens J.** (1994) Ischemia and Reperfusion. In "Current Topics in Bioenergetics: Molecular aspects of Mitochondrial Pathology" (Lee, C.P. ed). Academic Press, Orlando; 17: 173-95.
36. **Messner K. and Imlay J.** (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*; 45: 42563-71.
37. **Oberley L., Oberley T.** (1986). Free radicals, cancer and aging. In J.E. Johnson, Jr., R.Walford, D. Harman and J. Miquel. *Free Radic*; 25: 325-371.
38. **Reanmongkol W. and Itharat A.** (2007). Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L. in experimental animals; *Songklanakarin J Sci Technol*; 1: 29-38.
39. **Rose M., Germolec D., Arteel G., Schoonhoven R. and Thurman R.** (1997) Dietary glycine prevents increases in hepatocyte proliferation caused by the peroxisome proliferator WY-14,643. *Chem Res Toxicol*; 10: 1198–1204.
40. **Rudack D., Gozukura E., Chisholm E., Holten D.** (1971). The effect of dietary carbohydrate and fat on the synthesis of rat liver 6- phosphogluconate dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta*; 252: 305-13.
41. **Senthilkumar R. and Nalini N.** (2004). Effect of glycine on tissue fatty acid composition in an experimental model of alcohol-induced hepatotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 31: 456-61.
42. **Serrano L., Neira J., Sancho J.** (1992). Effect of alanine versus glycine in α -helices on protein stability. *Nature*; 356: 453-55.

43. **Stachlewitz R., Seabra V., Bradford U., Bradham A., Rusyn I., Germolec D.** (1999). Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology*; 29: 737–45.
44. **Stachlewitz R., Smith S., Bunzendahl H., Graves L., and Thurman R.** (1999). Glycine Inhibits Growth of T Lymphocytes by an IL-2-Independent Mechanism. *J. Immunology*; 164: 176-82.
45. **Stadtman E., and Levine R.** (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*; 25: 207-18.
46. **Sugiyama S., Kitazawa M., Ozawa T., Suzuki K., Izawa Y.** (2004). Anti-oxidative effect of coenzyme Q10. *Experientia*; 36: 1002-3.
47. **Suboh S., Bilto Y., Aburjai T.** (2004). Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother Res*; 18: 280-4.
48. **Sumimoto H., Miyano K., Takeya R.** (2005). Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun*; 9: 677-86.
49. **Sun Y.** (1990). Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radical Bio Med*; 8: 583-99.
50. **Tsai P., McIntosh J., Pearce P., Camden B., Jordan B.** (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Res Inter*; 35: 351–56.

51. **Tzu C., Kwam L., Hish C.** (2003). Age dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxide and superoxide dismutase in human liver mitochondria. *Free Radic Biol Med*; 16: 207-14.
52. **Usuh I., Akpan E., Etim E., Farombi E.** (2005). Antioxidant Actions of Dried flower extracts of *Hibiscus Sabdariffa* L. on sodium arsenite induced oxidative stress in rats. *Pak J Nutr*; 4: 135-141.
53. **Valko M., Morris H., Cronin M.** (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*; 12: 1161-208.
54. **Vilasinee A., Anoka A., Nepean H., Montanan C., Hitoshi D., Ankara E., Chuthamane S.** (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J. Ethnopharma.*; 103: 252–60.
55. **Visner G., Dougall W., Wilson J., Burr I. and Nick S.** (1990). Regulation of Manganese Superoxide Dismutase by Lipopolysaccharide, Interleukin-1, and Tumor Necrosis Factor. *J. Biol. Chem.*; 265: 2856- 64.
56. **Wang C., Wang J., Lin W. L., Chu C., Chou F., Tseng T.** (2000). Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against ter-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *F. Chem. Tox.*; 38: 411-16.
57. **Wheeler M., Ikejema K., Enomoto R., Stacklewitz V., Seabra Z., Zhong M., Yin P., Schemmer M., Rose I., Rusyn B., Bradford G., Thurman.** (1999). Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell. Mol. Life Sci*; 56: 843–56.

58. **Wu G., Fang Y., Lupton J., Turner N.,** (2003). Glutathione metabolism and its implications for health. *Ame. Soc Nut Sci*; 48: 94-92.
59. **Ya J. and Diamond A.** (2003). Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium. *Cancer R.*; 63: 3347 -51.
60. **Yamashina S., Konno A., Wheeler M.** (2001). Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr Cancer*; 40: 197-204.
61. **Youdim K., McDonald J., Kalt W., Joseph J.** (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J Nutr Biochem*; 13: 282-88.
62. **Zamocky M., Koller F.** (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol*; 72: 19-66.
63. **Zangar R., Davydov D., Verma S.** (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol*; 199: 316- 31.
64. **Zhong Z., Arteel G., Connor H., Yin M., Frankenberg M., Stachlewitz R.** (1998) Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in the rat kidney: prevention by dietary glycine. *Am. J. Physiol*; 275: 595–604.
65. **Zhong Z., Wheeler D., Xiangli F., Schemmer P., Yin M., Bunzendaal H., Bradford B., Lemasters J.** (2003) L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Clin. Nutr. & Metab. Care*; 6: 229-240.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Influencia de la glicina y de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* sobre la expresión los genes de las enzimas antioxidantes en células Jurkat”.

Jurado de Examen



Presidente

Dra. Mina Konisberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Secretario

Dra. Margarita Díaz Flores

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.



Vocal

Dra. Clara Ortega Camarillo

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.



Vocal

Dr. Julio César Almanza Pérez

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.