



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**DDE: MECANISMOS MOLECULARES DE APOPTOSIS
Y DE RESPUESTA GÉNICA EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES PRESENTA:**

M. en C. JORGE ALEJANDRO ALEGRÍA TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DR. IVAN N. PÉREZ MALDONADO

COMITÉ TUTELAR

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ

DR. ROBERTO GONZÁLEZ AMARO

SAN LUIS POTOSÍ, AGOSTO DE 2009

*.....y cuando creí poseer sabiduría
me di cuenta absorto y con dolor
que no pude añadir ni un codo a mi estatura
y que no hay nada nuevo bajo el sol.*

*Para ti que fuiste, eres y serás y para la forma
de amor terrenal más parecida a tu divinidad: MI
MADRE*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A las doctoras Lety Carrizales y Edna Rico quienes atendieron con sumo cuidado mis dolencias del alma y físicas respectivamente, ¡¡¡Son extraordinarias!!!!*
- ❖ *Al Dr. Díaz-Barriga por mostrarme la forma más heterodoxa y sui géneris de afecto, comprensión y confianza.*
- ❖ *Al Dr. Pérez Maldonado y a los miembros del jurado calificador quienes hicieron sus contribuciones muy a su estilo personal pero siempre con el afán de crecimiento.*
- ❖ *A los amigos que navegaron conmigo en la barca de la ciencia tanto en tiempos de bonanza como ante vientos tempestuosos: Chio, Gaby Domínguez, Keyla, Lidia, Lili Bártres, Mariana, Nadia, Octavio, Paty Cossío, Rebeca Isabel, Rebe Mejía, Raúl, Teresita, y Yei (en orden alfabético para no herir susceptibilidades).*
- ❖ *A todos los integrantes del departamento de Toxicología Ambiental con los que estaba destinado a convivir, desde don Ángel hasta el Dr. Jesús Mejía que me mostraron lo que debo y no debo hacer en lo secular y en lo profesional.*
- ❖ *A la Dra. Patricia Ponce y el Dr. Alberto Flores por enseñarme los rudimentos de la ciencia sin los cuales no habría podido ascender este peldaño.*
- ❖ *Amigos de Semilla de Vida, UCEM y Endodoncia: por que en todo tiempo ama el amigo y es como un hermano en tiempos de angustia.*
- ❖ *A mis primas-hermanas-hijas Maggy y Gaby, por su complicidad en mi diario vivir.*

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Este trabajo se llevó a cabo en el Colegio de Farmacia de la Universidad de Arizona en Tucson bajo la tutoría del Dr. Jay Gandolfi y en el Departamento de Toxicología Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

FINANCIAMIENTO

Proyecto 46559 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y US-México Binational Center for Environmental Sciences and Toxicology en la Universidad de Arizona.

EL DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO A TRAVÉS DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS (PNP-CONACYT)

AGOSTO 2009

RESUMEN

p,p'-Diclorodifenildicloroetileno (DDE) es el metabolito más estable del insecticida organoclorado *p,p'*-diclorodifeniltricloroetano (DDT) y ha sido detectado en poblaciones humanas que habitan zonas endémicas de paludismo en México donde este insecticida fue usado. DDE induce apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (CMN); sin embargo, el mecanismo molecular de muerte celular inducido por este compuesto no es del todo comprendido. En el presente estudio, se aislaron CMN a partir de individuos sanos (no expuestos a DDE) y se incubaron con diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE (0-80 µg/ml) y a diferentes tiempos. Cuando las CMN fueron tratadas con bajas concentraciones de *p,p'*-DDE (10 µg/ml), se indujo una respuesta antioxidante y se detectaron marcadores de inflamación indicando un estado pro-inflamatorio. En cambio, cuando las CMN fueron tratadas con altas concentraciones de *p,p'*-DDE (80 µg/ml), se dispararon varios eventos bioquímicos apoptóticos como son: activación de caspasa 8, Bid, caspasa 9 y caspasa 3 así como degradación de PARP y ubiquitinación. Los resultados descritos en este estudio muestran una posible condición inflamatoria y el involucramiento de la vía intrínseca y extrínseca en la inducción de apoptosis por DDE en CMN.

INTRODUCCIÓN

El DDT [1,1-bis(*p*-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano] fue el plaguicida organoclorado más utilizado en el mundo. Es considerado un contaminante de alta persistencia debido a que su vida media puede superar los 15 años según sean las condiciones ambientales (ATSDR, 2002; Turusov et al., 2002). Los seres humanos son expuestos a este plaguicida principalmente a través de la ingestión de alimentos contaminados. El DDT es metabolizado por el sistema microsomal CYP generándose dos principales metabolitos: *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE siendo éste último el más estable (Kelner et al., 1986; Kitamura et al., 2002). Estos compuestos son altamente lipofílicos (p,p' -DDD < p,p' -DDT < p,p' -DDE) por lo que se acumulan en tejidos adiposos (Kelner et al., 1986; Morgan et al., 1971).

A pesar de que el uso del DDT ha sido prohibido en México desde 1999, se ha detectado junto con sus metabolitos en matrices ambientales (suelo y sedimento) así como en matrices biológicas (peces y sangre humana) en zonas donde este plaguicida tuvo un uso agricultura y para el combate del paludismo (Stapleton, 1998, Yáñez et al., 2004). *p,p'*-DDE es el metabolito que se ha encontrado en mayor concentración (Yáñez et al., 2004). Un estudio realizado en niños de áreas con incidencia de paludismo en el estado de Chiapas, reportó una concentración media de *p,p'*-DDE en sangre de 58.2 µg/l (Herrera-Portugal et al., 2005). Se han obtenido resultados muy similares en otros estudios donde se detectó *p,p'*-DDE en todas las muestras de sangre de niños habitantes de

áreas de alto riesgo de exposición a DDT en nueve estados de la república mexicana (Trejo-Acevedo et al., 2009), por lo que la alta persistencia ambiental y biológica de este metabolito compete a la problemática de salud pública en México. (López-Carrillo et al., 1996).

Además, la exposición a *p,p'*-DDE se ha relacionado con daño a la salud humana asociándose con neurotoxicidad (Colosio et al., 2003; Ribas-Fito et al., 2003), desorganización endocrina al modificar la interacción con receptores hormonales (Li et al., 2008) y alteraciones en el sistema reproductivo al actuar como anti-estrógeno (De Jager et al., 2006).

Estudios más recientes han mostrado que el DDT y sus metabolitos son capaces de inducir apoptosis en células mononucleares de sangre periférica a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Pérez-Maldonado et al., 2004; Pérez-Maldonado et al., 2005). Además, se encontró una asociación entre el porcentaje de células apoptóticas y los niveles de DDE en sangre de niños expuestos (Pérez-Maldonado et al., 2004 y 2006). Sin embargo, los mecanismos moleculares de apoptosis inducidos por el DDT y sus metabolitos siguen siendo estudiados.

El principal objetivo de este trabajo fue elucidar los mecanismos moleculares de apoptosis inducidos por el metabolito más estable del DDT: el *p,p'*-DDE. Los primeros estudios *in vitro* permitirán reconocer moléculas clave que podrían

utilizarse como marcadores moleculares de exposición y/o efecto en poblaciones expuestas a estos contaminantes.

A partir de una curva dosis-respuesta en donde fueron estudiadas diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE sobre un cultivo de CMN, se seleccionaron dos concentraciones para ser evaluadas (10 y 80 µg/ml) a diferentes intervalos de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de CMN. Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas a partir de sangre heparinizada de diez voluntarios sanos de entre 20 y 30 años de edad nunca expuestos a DDT por medio de una centrifugación en gradiente de densidad Ficoll–Hypaque (Sigma, St Louis, MO, USA). Después de un lavado con solución salina de buffer-fosfatos (PBS), las células mononucleares fueron colocadas en frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad de 1X10⁶ cel/ml suspendidas en RPMI 1640 (Diagnostic Inc., Mequon, WI, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 mg/ml (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) incubándose por lo menos 24 h a 37°C con 5% de CO₂ antes de los tratamientos con *p,p'*-DDE.

Cultivo de células Jurkat. A partir de células criopreservadas de la línea de leucemia humana Jurkat T (ATCC: CLR-1990), se obtuvo un cultivo en medio RPMI 1640 (Diagnostic Inc., Mequon, WI, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 mg/ml (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) en frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad de 1X10⁶ cel/ml. Las células se incubaron por 24 h a 37°C con 5% de CO₂ y posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE.

Exposición a *p,p'*-DDE. Se preparó una solución de *p,p'*-DDE disuelta en acetona a una concentración de 100 mg/ml la cual fue almacenada a 4°C hasta su utilización. Las células fueron tratadas con esta solución a diferentes diluciones para alcanzar una concentración final de 10, 20, 30, 40, 60 y 80 µg/ml (Yáñez et al., 2004; Pérez-Maldonado et al., 2004). Para evitar efectos por la acetona sobre las células, la concentración del vehículo no excedió de 0.5 % en el medio. Como control positivo de apoptosis se utilizó arsenito de sodio 10 µM (De la Fuente et al., 2002). Los compuestos químicos empleados fueron de Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA).

Viabilidad celular. La viabilidad celular fue determinada con el ensayo del 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). En breve, la densidad fue ajustada a 1×10^4 células por pozo e incubadas durante un tiempo máximo de 24 h en placas de 96 pozos de fondo plano a un volumen final de 200 µl por pozo sólo con medio de cultivo (control), con medio más acetona al 0.5% (control de vehículo) o concentraciones incrementadas de *p,p'*-DDE (0–80 µg/ml). Después del tiempo de incubación, se añadieron 20 µl por pozo de reactivo MTT (CellTiter 96 ® PROMEGA, Madison, WI, USA) y se incubaron por 4 h. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro multiwell scanning (Beckman Coulter DU 640) a 490 nm. La viabilidad celular fue definida en términos de porcentaje considerando el 100% de viabilidad al valor numérico obtenido con el control de vehículo. Todos los tratamientos

fueron comparados con el control aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por una prueba de Dunnett.

Aislamiento de ARN. Las células mononucleares fueron suspendidas en 3 ml de medio RPMI (3×10^6 células) en frascos de 25 cm² durante 0, 1, 2, 3 y 4 h y tratadas con 10 y 80 µg/ml de *p,p'*-DDE (Yáñez et al., 2004; Pérez-Maldonado et al., 2004). Después del periodo de incubación, las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas con PBS para el aislamiento de ARN total el cual se realizó con columnas RNeasy Mini Spin (Qiagen, Inc, Valencia, CA, USA). La concentración de ARN fue determinada por análisis espectrofotométrico a 260 nm. La calidad del ARN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Síntesis de ADNc y RT-PCR tiempo real. El ADNc se sintetizó utilizando un Kit de transcripción en reversa (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las sondas Taqman ® y los oligos para los ensayos de expresión de genes fueron de Applied Biosystems (Foster City, CA) y son especificados a continuación: p53, Hs00153349_m1; Bax, Hs00180269; Bcl-2, Hs00153350; SOD1, Hs00166575_m1; TNFα Hs00174128_m1; NFκB1, Hs00231653_m1; GAPDH, Hs99999905_m1. Las reacciones de PCR fueron realizadas en placas de 96 pozos de claridad óptica y en un termociclador ABI 9000 (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron: 95°C por 3 min seguido por 40 ciclos de 94°C por 20 seg, 55°C por 20 seg y 72°C por 20 seg.

Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado con al menos un control positivo y uno negativo. Para verificar la reproducibilidad de los resultados se realizaron tres experimentos independientes. Se construyó una curva estándar relacionando el ciclo umbral (Ct) con el número de copias del templado, determinado el Ct de cada gene con el Software del termociclador. La concentración del transcrito de cada gen fue calculada usando la curva estándar y ajustando a la expresión de GAPDH como control endógeno para normalizar la expresión de los genes estudiados. Se consideró expresión diferencial cuando: i) hubo un cambio mínimo de dos veces con respecto al control, ii) hubo diferencias en el nivel de expresión entre los tratamientos con *p,p'*-DDE (10 y 80 µg/ml) vs. control con una significancia estadística de $P < 0.05$ y dando un valor arbitrario al control de 1.

Extracción de proteínas y western blot. Las células cultivadas en medio RPMI (3×10^6) fueron colectadas por centrifugación después de exponerse a diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE (0-80 µg/ml) durante 1, 2, 3 y 4 h. Después de lavarlas con PBS frío, se lisaron con 200 µl de solución amortiguadora para radioinmunoprecipitación (RIPA) cuya composición es la siguiente: Tris-HCl 50 mm, pH 7.4, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.25%, NaCl 150 mm y EDTA 1mM. A esta solución se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA) y ortovanadato de sodio 2 mM (Sigma-Aldrich) como inhibidor de fosfatasa, ambos se adicionan a la solución RIPA justo antes de utilizarse. Las muestras fueron sometidas a

ultrasonido y centrifugadas a 14,000 rpm por 10 min a 4°C. La concentración de proteínas se determinó en el sobrenadante utilizando ácido bicinónico (BCA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y se prepararon alícuotas con 20 µg de proteína cada una almacenándose a -80°C hasta su utilización. Para el análisis de western blot, 20 µg de cada muestra se incubaron en baño maría por 5 min con volúmenes iguales de buffer de carga (5mmol/l Tris-HCl, 10% SDS, 10% glicerol, 10% β-mercaptoetanol y 2mg/ml de azul de bromofenol). De inmediato, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 % y transferidas a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA) para ser bloqueadas por una hora en una solución de leche en polvo descremada al 5 % disuelta en amortiguador salino Tris-Tween-20 (TBST). Las membranas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario contra PARP1 (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/1000), Bax (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., dilución 1/2000), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., dilución 1/2000), Bid (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/800), caspasa-8 (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/1000), caspasa-9 (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/800), caspasa-3 (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/1000), ubiquitina (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/1500), p-IkB-α Ser 32 (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/1500), COX-2 (Cayman Chemical, Inc., Ann Arbor, MI, dilución 1/1000) SOD1 (Cell Signaling Technology, Inc., dilución 1/2000), y GAPDH usado como control de carga (Calbiochem, dilución 1/3000). Para la detección de los anticuerpos primarios, se usaron anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa de rábano por detección quimioluminiscente

(ECL) y sustrato (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Las películas reveladas fueron analizadas por densitometría usando un densitómetro de imágenes GS-710 (Bio-Rad, Hercules, CA) en modo de transmitancia.

Análisis estadístico. Los datos del ensayo MTT , RT-PCRq tiempo real y las densitometrías fueron expresados como el promedio de tres réplicas \pm DE. Para evaluar las diferencias a lo largo del tiempo (0, 1, 2, 3 y 4 h) a dosis fijas de *p,p'*-DDE (10 y 80 μ g/ml), se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc Tukey. La expresión diferencial de genes con 10 y 80 μ g/ml de *p,p'*-DDE vs. control a tiempos fijos de exposición, fue analizada con la prueba t de Student. El análisis de los datos se realizó en el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

RESULTADOS

Efectos citotóxicos de *p,p'*-DDE sobre células mononucleares de sangre periférica a las 24 h de exposición. El intervalo de concentración para evaluar la citotoxicidad fue de 10 a 80 µg/ml de *p,p'*-DDE debido a que ha sido demostrado que 80 µg/ml y 100 µg/ml de *p,p'*-DDE son suficientes para producir un efecto máximo de genotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis sobre células mononucleares de sangre periférica a 24 h de exposición *in vitro* (Pérez-Maldonado et al., 2004 y 2005; Yáñez et al., 2004). Se añadieron diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE a los cultivos de las CMN (10, 20, 30, 40, 60 y 80 µg/ml). Después de 24 h de tratamiento, la citotoxicidad fue evaluada con el ensayo de MTT (Figura 1). La dosis más alta evaluada (80 µg/ml) tuvo un efecto notable sobre las CMN reduciendo la viabilidad celular a más del 50%, mientras que la más baja (10 µg/ml) sólo redujo la viabilidad a menos del 20%. Sin embargo, esta diferencia fue significativa en relación al control ($p < 0.01$). Ambas concentraciones de *p,p'*-DDE fueron usadas para inducir mecanismos apoptóticos y expresión diferencial de genes después de tiempos cortos de exposición (1, 2, 3 y 4 h).

Efectos citotóxicos de *p,p'*-DDE sobre células Jurkat a las 24 h de exposición. Con el fin de comprobar la resistencia citotóxica de las CMN frente a las células Jurkat (Won et al., 2006), decidimos medir el efecto del *p,p'*-DDE sobre ambos tipos celulares. Las concentraciones probadas de *p,p'*-DDE fueron las mismas que para las CMN, evaluando también la viabilidad por

medio del ensayo MTT. La figura 1 muestra la viabilidad después de 24 h de incubación. A bajas dosis de *p,p'*-DDE no hubo un efecto sobre las CMN (10-20 µg/mL) comparado con las células Jurkat T, las cuales declinaron a las mismas concentraciones. Esto fue confirmado por inmunodetección de PARP escindida lo cual fue un evento que ocurrió 1 h antes de observarse en las CMN (Figura 2).

Sistemas de defensa antioxidante desencadenados por *p,p'*-DDE.

Debido a que tanto el DDT y sus metabolitos inducen estrés oxidativo (Pérez-Maldonado et al., 2005), en nuestro estudio determinamos una respuesta enzimática antioxidante a *p,p'*-DDE. La superóxido dismutasa (SOD1) es una enzima constitutiva la cual representa el noventa por ciento de la actividad total de SOD celular (Noor et al., 2002). La expresión diferencial del gene SOD1 fue observada sólo al primer y al tercer tiempo de incubación (1 y 3 h) con 80 µg/ml, observando el efecto máximo a la primera hora de exposición (Figura 3-A). Sin embargo, la proteína SOD1 no fue inducida significativamente con 80 µg/ml (datos no mostrados). Interesantemente, los niveles de proteína de SOD1 se incrementaron y se mantuvieron después de 2 h de exposición a 10 µg/ml de *p,p'*-DDE (Figura 3-B).

***p,p'*-DDE Induce la sobreexpresión de biomarcadores de inflamación en las CMN.** Considerando que el estrés oxidativo y la inflamación son eventos estrechamente relacionados (Eblin et al., 2007), se consideró medir COX-2 el cual ha sido relacionado con un estatus inflamatorio (Vane et al., 1998).

Tomando en cuenta que la proteína SOD1 se sobreexpresó con bajas concentraciones de *p,p'*-DDE (10 µg/ml), decidimos realizar un western blot a partir de un lisado de CMN tratados con 10 µg/ml de *p,p'*-DDE para evaluar la inducción de COX-2, el resultado fue un aumento en la expresión a 1 h de exposición con un máximo efecto a las 2 h (Figura 4-A). Los resultados obtenidos con 80 µg/ml de *p,p'*-DDE no fueron significativamente diferentes a los resultados obtenidos con 10 µg/ml de *p,p'*-DDE (datos no mostrados). Contradictoriamente, los genes de TNF-α y NFκB sólo fueron inducidos con 80 µg/ml de *p,p'*-DDE (Figura 4-B). Sin embargo, aunque el gene de NFκB no fue inducido a bajas dosis, la forma fosforilada de su inhibidor (fosfo-IκBα) fue detectada en lisados celulares por western blot con 10 µg/ml de *p,p'*-DDE indicando la activación de NFκB (Figura 4-C). Lo anterior sugiere un mecanismo diferente de activación de NFκB independiente de la expresión de TNFα (Deng et al., 2000; Yao et al., 2007).

Activación de poli-ubiquitinación por *p,p'*-DDE. Como es sabido, la ubiquitinación y la degradación por el proteosoma son procesos relacionados con la muerte celular, los lisados celulares fueron analizados vía western blot usando anticuerpos anti-ubiquitina a fin de determinar si las proteínas estaban sufriendo esta modificación postraduccional. Se observó poli-ubiquitinación inducida por *p,p'*-DDE de manera dependiente del tiempo y la concentración (Figura 5).

Activación de la cascada de caspasas y escisión de PARP1. Las células mononucleares fueron incubadas a 37°C por 0-4 h en la presencia de 10 y 80 µg/ml de *p,p'*-DDE. Posteriormente, los lisados celulares fueron obtenidos para análisis por western blot. La caspasa 8, Bid escindida, las caspasas 9 y 3 fueron reconocidos con sólo 80 µg/ml de *p,p'*-DDE después de 1 h de incubación (Figura 6). PARP escindida (un marcador temprano de apoptosis) fue también inmunodetectado bajo las mismas condiciones.

Inducción de genes apoptóticos por *p,p'*-DDE. Trabajos previos han demostrado que *p,p'*-DDE causa daño al ADN en diferentes líneas celulares incluyendo linfocitos humanos (Binelli et al., 2008; Ennaceur et al., 2008; Yáñez, et al., 2004). El estrés genotóxico induce apoptosis via p53 (Clifford et al., 2003). Por lo anterior, se decidió medir los niveles de expresión de ARNm de p53, Bax y Bcl-2 en CMN expuestas a 10 y 80 µg/ml de *p,p'*-DDE después de 1, 2, 3 y 4 h de incubación. Una expresión diferencial significativa de los genes de p53 y Bax fue detectada sólo después de 1 h de exposición con 80 µg/ml (Figura 7-A). Interesantemente, el gene de Bcl-2 fue inducido a lo largo del tiempo con 80 µg/ml de *p,p'*-DDE, a pesar de que Bcl-2 tiene efectos antiapoptóticos. Considerando los efectos antagónicos de ambos genes, se calculó la relación Bax/Bcl-2 la cual puede considerarse como un indicador de muerte celular (Adams et al., 1998) y se hizo sólo con 80 µg/ml de *p,p'*-DDE. Esta relación fue obtenida dividiendo la expresión relativa de ARNm de Bax entre la expresión relativa de ARNm de Bcl-2. 80 µg/ml de *p,p'*-DDE tuvieron un decremento progresivo en la relación Bax/Bcl-2 durante las tres primeras

horas de exposición (Figura 7-B). Las proteínas de Bcl-2 y Bax fueron también sobreexpresadas, esto fue confirmado cuando los lisados de las CMN expuestas a 80 µg/ml de *p,p'*-DDE fueron analizadas por western blot (Figura 7-C).

DISCUSIÓN

Aunque es bien sabido que el DDT y sus metabolitos causan apoptosis en diferentes líneas celulares (Greenlee et al., 1999; Pérez-Maldonado et al., 2005; Tebourbi et al., 1998), los mecanismos de apoptosis no son del todo claros.

En este estudio, se utilizaron dos concentraciones de *p,p'*-DDE para examinar la respuesta de las CMN a este compuesto químico. Efectos notables fueron observados en las primeras 4 h de exposición. Los resultados son diferentes dependiendo de los marcadores moleculares estudiados. A dosis bajas (10 µg/ml) se observó estrés oxidativo y una condición proinflamatoria: las proteínas SOD1 y COX-2 se sobreexpresaron después de 2 h de tratamiento, IκB-α fue fosforilado después de 1 h y ocurrió poli-ubiquitinación de manera dependiente del tiempo. Por otra parte, dosis altas (80 µg/ml) indujeron la sobreexpresión de los genes SOD1 y NFκB después de una hora de exposición. La inducción del gene TNF-α se mantuvo durante 4 h. Los eventos apoptóticos pudieron ser claramente distinguidos solo a altas concentraciones: los genes p53 y Bax se indujeron después de 1 h de tratamiento con 80 µg/ml de *p,p'*-DDE, Bcl-2 fue también inducido aunque estos efectos fueron mantenidos a lo largo del tiempo. Tanto las proteínas Bax y Bcl-2 se sobreexpresaron a lo largo del tiempo y se reconoció la activación de las caspasas.

Se ha reportado que *p,p'*-DDE induce la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres en CMN tratados *in vitro* (Pérez-Maldonado et al.,

2005). Por lo tanto, una respuesta antioxidante es esperada, la proteína y el gene de SOD1 fueron sobreexpresados con 10 y 80 $\mu\text{g/ml}$ de *p,p'*-DDE (Figura 3-A and 3-B). Para explicar esta discrepancia, se puede sugerir un mecanismo postraduccional de regulación para SOD1 el cual ha sido previamente descrito (Brown et al., 2003). Es importante mencionar que en este estudio la respuesta antioxidante (inducción de SOD1) fue reconocida a concentraciones más bajas y tiempos de exposición más cortos que otros reportes (Pérez-Maldonado et al., 2005), pero es de notar que las técnicas empleadas para medir estrés oxidativo en ambos estudios fueron diferentes, destacando una mayor sensibilidad en nuestras técnicas comparadas con las empleadas por Pérez-Maldonado et al., 2005. Por otro lado, la proteína SOD1 no fue inducida significativamente a 80 $\mu\text{g/ml}$ de *p,p'*-DDE, solo con 10 $\mu\text{g/ml}$ de *p,p'*-DDE, por razones que no conocemos, se requieren más estudios a fin de elucidar este resultado. Sin embargo, se ha discutido que el desacoplamiento entre transcripción y traducción podría ser comprendido en términos de estabilidad del ARNm y el resultado de la eficiencia traduccional en la brecha entre genómica y proteómica (Wilkie et al., 2003; Wray et al., 2003).

Diversos estudios han reportado un estado pro-inflamatorio causado por el DDT y sus metabolitos a través de la detección de citocinas proinflamatorias (Frigo et al., 2005; Kim et al., 2004). En este trabajo se demostró una inducción de biomarcadores de inflamación: los genes de $\text{TNF}\alpha$ y $\text{NF}\kappa\text{B}$ fueron sobreexpresados a dosis alta de 80 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4-B). Aunque $\text{NF}\kappa\text{B}$ no se sobreexpresó a dosis baja (10 $\mu\text{g/ml}$), la fosforilación de su inhibidor ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) fue

observada a 10 $\mu\text{g/ml}$. Fosfo-I $\kappa\text{B}\alpha$ es ubiquitinado y destruido por el proteosoma 26 S permitiendo la traslocación de NF- κB al núcleo para la activación de genes de respuesta inflamatoria (Sun et al., 1995). La activación de NF κB puede ocurrir por medio de mecanismos independientes a la expresión de TNF α (Deng et al., 2000; Yao et al., 2007). Como se mencionó, una inducción de COX-2 es posible a bajas concentraciones de *p,p'*-DDE aunque estas dosis no afectaron la expresión de los genes de NF κB y TNF α .

Se ha descrito que la poli-ubiquitinación y la degradación proteosomal son procesos regulatorios involucrados en la señalización de la apoptosis (Lee y Peter, 2003). Por lo tanto, se evaluó la ubiquitinización de proteínas por western blot. Se observó una inducción de este proceso con *p,p'*-DDE de una manera dependiente de la dosis y de la concentración (Figura 5). La apoptosis y la sobreexpresión del gene de TNF- α podrían ser eventos estrechamente relacionados ya que esta citocina es capaz de inducir apoptosis vía receptores de membrana por medio de caspasa 8 a través de la activación de Bid (Yamada et al., 1999). Considerando esta posibilidad, el ensayo de inmunoblot fue usado para identificar caspasa 8 activa así como Bid escindida. La activación fue también observada con sólo 80 $\mu\text{g/ml}$ de *p,p'*-DDE 1 h después del tratamiento. También se inmunodetectaron las caspasas 9 y 3 así como PARP escindida (Figura 6). Ya que las caspasas 8 y 9 inician la cascada de caspasas en la vía extrínseca e intrínseca respectivamente, debe considerarse la convergencia entre ambas vías (Gross et al., 1999; Li et al., 1998). A diferencia de los resultados presentados por Pérez-Maldonado et al., 2004, donde la

apoptosis fue detectada hasta las 24 h de exposición empleando el ensayo TUNEL, en este estudio se detectó apoptosis después de una hora de incubación a las mismas dosis de *p,p'*-DDE. Como ha sido demostrado en otros trabajos, las CMN son más resistentes a los efectos de sustancias citotóxicas cuando han sido probadas sobre éstas en comparación con líneas celulares como Jurkat T (Won *et al.*, 2006). Esto quedó demostrado en la curva dosis-respuesta y se corroboró al medir PARP1 escindida en ambos tipos celulares (Figura 1 y 2).

Considerando los efectos genotóxicos del *p,p'*-DDE (Yañez *et al.*, 2004), el gene p53 fue estudiado. Se observaron cambios en la expresión de p53 sólo a altas dosis durante las primeras cuatro horas de exposición (Figure 7-A). p53 puede promover apoptosis a través de la inducción de la proteína Bax (Haupt *et al.*, 2003). Estos resultados coinciden con otros estudios en donde se ha observado una inducción de p53, alteración del potencial de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c, activación de las caspasas 9 y 3 así como escisión PARP en células tratadas con arsénico (Chowdhury *et al.*, 2009).

El gene Bax se sobreexpresó después de 1 h de tratamiento. Bax es un efector de muerte celular el cual se trasloca del citosol a la mitocondria promoviendo la liberación de citocromo c y subsecuentemente la activación de la cascada de caspasas (Martinou, 1999; Marzo *et al.*, 1998; Narita *et al.*, 1998). Inesperadamente, Bcl-2 también fue sobreexpresado a lo largo del tiempo ($P < 0.01$). Un ensayo de western blot confirmó este resultado. La inducción de

Bcl-2 puede asociarse con las propiedades antiandrogénicas del p,p' -DDE (De Jager et al., 2006). Por ejemplo, 17β -estradiol inhibe apoptosis en queratinocitos por promoción de la expresión de Bcl-2 (Kanda and Watanabe, 2003). Cuando la relación Bax/Bcl-2 fue calculada con arsenito de sodio, esta relación se incrementó a lo largo del tiempo porque la expresión de Bcl-2 es reducida por arsenito (Bustamante et al., 2005). En contraste, p,p' -DDE tuvo un decremento en esta relación a lo largo del tiempo (Figura 7-B y 7-C), sugiriendo una disrupción de la vía intrínseca por p,p' -DDE. Sin embargo, como resultado de la amplificación de la señal de apoptosis, otras señales de transducción están involucradas como son la cascada de las caspasas de la vía extrínseca (Straser et al., 2009). Pero es importante notar que a 1 h de exposición la relación Bax/Bcl-2 es alta coincidiendo con la detección de marcadores de apoptosis con 80 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE después de 1 h de tratamiento.

Existen diferentes escenarios de exposición en el mundo para el DDT y sus metabolitos (Van Zwieten et al., 2003). Muchas comunidades en México están expuestas a mezclas complejas de contaminantes incluyendo metales pesados y compuestos orgánicos persistentes además de p,p' -DDE (Trejo-Acevedo et al., 2009). La concentraciones de contaminantes encontradas en estas poblaciones son diferentes a las concentraciones evaluadas en este estudio, las dosis usadas son cerca de mil veces más que las detectadas en poblaciones expuestas, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos "*in vitro*" con efectos en poblaciones expuestas. Por ejemplo, las poblaciones no sólo

están expuestas a DDE sino a una mezcla de compuestos químicos incluyendo el DDT y sus metabolitos, mientras que en este estudio "*in vitro*", las células fueron tratadas sólo con *p,p'*-DDE. Además, establecer los efectos en salud es un desafío en escenarios complejos porque hay diferentes efectos que afectan la selección de marcadores moleculares para ser usados en poblaciones crónicamente expuestas. Nuestros resultados son particularmente importantes a fin de comprender los posibles efectos sobre individuos expuestos. Se ha reportado una asociación entre apoptosis y exposición a DDT y sus metabolitos en algunas comunidades mexicanas (Pérez-Maldonado et al., 2006); sin embargo, un grupo indígena altamente expuesto a *p,p'*-DDE (Lacandones de Chiapas) no mostró evidencias de apoptosis en sus células sanguíneas (datos no publicados). Así, nuestra perspectiva es estudiar respuestas individuales a fin de identificar polimorfismos genéticos en moléculas involucradas en mecanismos de apoptosis inducidos por *p,p'*-DDE en poblaciones vulnerables.

En conclusión, *p,p'*-DDE genera una respuesta antioxidante y un estado pro-inflamatorio el cual es capaz de disparar apoptosis a través de la vía extrínseca e intrínseca conduciendo a la activación de la cascada de caspasas. Para hacer aseveraciones acerca del ordenamiento molecular de la activación de caspasas individuales es requerida una investigación posterior con manipulación genética e inhibidores de caspasas.

REFERENCIAS

Adams, J.M., Cory, S., 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*. 281, 1322-1326.

ATSDR, 2002. Toxicological profile for DDT/DDE/DDD, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Public Health Service, Atlanta, GA.

Binelli, A., Riva, C., Coqni, D., Provini, A., 2008. Genotoxic effects of p,p'-DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis-(chlorophenyl)ethane) and its metabolites in Zebra mussel (*D. polymorpha*) by SCGE assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*. 49, 406-15.

Brown, N. M., Torres, A.S., Doan, P.E., O'Halloran, T.V., 2004. Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 5518-5523.

Bustamante, J., Nutt, L., Orrenius, S., Gogvadze, V., 2005. Arsenic stimulates release of cytochrome c from isolated mitochondria via induction of mitochondrial permeability transition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 207, 110-116.

Chowdhury, R., Chowdhury, S., Roychoudhury, P., Mandal, C., Chaudhuri, K. 2009. Arsenic induced apoptosis in malignant melanoma cells is enhanced by menadione through ROS generation, p38 signaling and p53 activation. *Apoptosis*. 14, 108-123.

Clifford, B., Beljin, M., Stark, G.R., Taylor, W.R., 2003. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res*. 63, 4074-4081.

Colosio, C., Tiramani, M., Maroni, M., 2003. Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. *Neurotoxicology* 24, 577-591.

De Jager, C., Farias, P., Barraza-Villarreal, A., Avila, M.H., Ayotte, P., Dewailly, E., Dombrowski, C., Rousseau, F., Sanchez, V. D., Bailey J. L., 2006. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study. *J. Androl*. 27, 16-27.

De la Fuente, H., Portals-Pérez, D., Baranda, L., Díaz-Barriga, F., Saavedra-Alanís, V., Layseca, E., González-Amaro, R., 2002. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol*. 129, 69-77.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., Chen, Z.J., 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin conjugating enzyme complex and the a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 103, 351-361.

Eblin, K.E., Bredfeldt, T.G., Buffington, S., Gandolfi, A. J., 2007. Mitogenic signal transduction caused by monomethylarsonous acid in human bladder cells: Role in arsenic-induced carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 95, 321-330.

Ennaceur, S., Ridha, D., Marcos, R., 2008. Genotoxicity of the organochlorine pesticides 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in cultured human lymphocytes. *Chemosphere* 71, 1335-1339.

Friego, D.E., Vigh, K.A., Struckhoff, A.P., Elliott, S., Beckman, B.S., Burow, M.E., McLachlan, J.A., 2005. Xenobiotic-induced TNF- α expression and apoptosis through the p38 MAPK signaling pathway. *Toxicol. Lett.* 155, 227-238.

Greenlee, A.R., Quail, C.A., Berg, R.L., 1999. The antiestrogen ICI 182, 780 abolishes developmental injury for murine embryos exposed in vitro to o,p'-DDT. *Reprod. Toxicol.* 14, 225-234.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J., 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156-1163.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. 2003. Apoptosis—the p53 network. *J Cell Sci* 116(Pt 20):4077–4085.

Herrera-Portugal, C., Ochoa, H., Franco-Sánchez, G., Yáñez, L., Díaz-Barriga, F., 2005. Environmental pathways of exposure to DDT for children living in a malarious area of Chiapas, Mexico. *Environ Res.* 99, 158-163.

Kanda, N., Watanabe, S., 2003. 17 β -Estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1500-1509.

Kelner, M.J., McLenithan, J.C., Anders, M.W., 1986. Thiol stimulation of the cytochrome P-450-dependent reduction of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) to 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDD). *Biochem Pharmacol.* 35, 1805-1807.

Kim, J.Y., Choi, C.Y., Lee, K.J., Shin, D.W., Jung, K.S., Chung, Y.C., Lee, S.S., Shin, J.G., Jeong, H.G., 2004. Induction of inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression by o,p'-DDT in macrophages. *Toxicol. Lett.* 147, 261-269.

Kitamura, S., Shimizu, Y., Shiraga, Y., Yoshida, M., Sugihara, K., Ohta, S., 2002. Reductive metabolism of p,p'-DDT and o,p'-DDT by rat liver cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* 30, 113-118.

Lee, J.C., Peter, M.E., 2003. Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.* 193, 39–47.

Li, H., Zhu, h., Xu, C.J., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94, 491-501.

Li, J., Li, N., Ma, M., Giesy, J.P., Wang, Z., 2008. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicol. Lett.* 183, 65-71.

López-Carrillo, L., Torres-Arreola, L., Torres-Sánchez, L., Espinosa-Torres, F., Jiménez, C., Cebrián, M., Waliszewski, S., Saldate, O., 1996. Is DDT use a public health problema in Mexico? *Environ Health Perspect.* 104, 584-588.

Martinou, J.C., 1999. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature.* 399, 411–412.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., Kroemer, G., 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281, 2027–2031.

Morgan, D.P., Roan, C.C., 1971. Absortion, storage and metabolic conversion of ingested DDT and DDT metabolites in man. *Arch Environ Health.* 22, 301-308.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y., 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 14681–14686.

Noor, R., Mittal, S., Iqbal, J., 2002. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med Sci. Monit.* 8, RA210-215.

Pérez-Maldonado, I.N., Díaz-Barriga, F., De la Fuente, H., González-Amaro, R., Calderón, J., Yáñez, L., 2004. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ. Res.* 94, 38-46.

Pérez-Maldonado, I.N., Herrera, C., Batres, L.E., González-Amaro, R., Díaz-Barriga, F., Yáñez, L., 2005. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ. Res.* 98, 117-184.

Pérez-Maldonado, I.N., Athanasiadou, M., Yáñez, L., González-Amaro, R., Bergman, A., Díaz-Barriga, F., 2006. DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite. *Sci. Total Environ.* 370, 343-351.

Ribas-Fitó, N., Cardo, E., Sala, M., Eulàlia de Muga, M., Mazón, C., Verdú, A., Kogevinas, M., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2003. Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics.* 111, 580-585.

Stapleton, D.H., 1998. The dawn of DDT and its experimental use by the Rockefeller Foundation in Mexico, 1943-1952. *Parassitologia.* 40, 149-158.

Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S., 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 30, 180-192.

Sun, S.C., Maggirwar, S.B., Harhaj, E., 1995. Activation of NFκB by phosphatase inhibitors involves the phosphorylation of I kappa B alpha at phosphatase 2A-sensitive sites *J. Biol. Chem.* 270, 18347-18351.

Tebourbi, O., Rhouma, K.B., Sakly, M., 1998. DDT induces apoptosis in rat thymocytes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 216-223.

Trejo-Acevedo, A., Díaz-Barriga, F., Carrizales, L., Domínguez, G., Costilla, R., Ize-Lema, I., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García, Mejía-Saavedra, J., Pérez-Maldonado, I.N., 2009. Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere* 74, 974-980.

Turusov, V., Rakitsky, V., Tomatis, L., 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence and risks. *Environ Health Perspect.* 110, 125-128.

Van Zwieten, L., Ayres, M.R., Morris, S.G., 2003. Influence of arsenic co-contamination on DDT breakdown and microbial activity. *Environ.Pollut.* 124, 331-339.

Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38, 97-120.

Wilkie, G.S., Dickson, K.S., Gray, N.K., 2003. Regulation of mRNA translation by 5' - and 3' -UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci.* 28, 182-188.

Won, H.J., Han, C.H., Kim, Y.H., Kwon, H.J., Kim, B.W., Choi, J.S., Kim, K.H., 2006. Induction of apoptosis in human acute leukemia Jurkat T cells by Albizzia julibrissin extract is mediated via mitochondria-dependent caspase-3 activation. *J Ethnopharmacol.* 106, 383-389.

Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., Romano, L.A., 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 20, 1377-1419.

Yamada, H., Tada-Oikawa, S., Uchida, A., Kawanishi, S., 1999. TRAIL causes cleavage of Bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 130-133.

Yáñez, L., Borja-Aburto, V., Rojas, E., De la Fuente, H., González-Amaro, R., Gómez, H., Jongitud, A., Díaz- Barriga, F., 2004. DDT induces DNA damage in blood cells. Studies in vitro and in women chronically exposed to this insecticide. *Environ. Res.* 94, 18-24.

Yao J., Kim T.W., Qin J., Jiang Z., Qian Y., Xiao H., Lu Y., Qian W., Gulen M.F., Sizemore N., DiDonato J., Sato S., Akira S., Su B., Li X., 2007. Interleukin-1(IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification. *J. Biol. Chem.* 282, 6075-6089.

FIGURAS

Fig. 1. Efecto citotóxico de p,p' -DDE sobre CMN y células Jurkat. 1×10^4 células por pozo fueron incubadas con las concentraciones indicadas de p,p' -DDE en una placa de 96 pozos durante 24 h, y la viabilidad celular fue determinada por medio del ensayo MTT considerando a las células tratadas con el vehículo como el 100 % de viabilidad. Cada columna representa tres experimentos independientes expresados como el promedio \pm desviación estándar, $P < 0.01^{**}$ significativamente diferentes cuando se compararon contra las células control (sólo con acetona).

Fig. 2. Comparación de los efectos apoptóticos inducidos por p,p' -DDE sobre CMN y células Jurkat. Las células Jurkat muestran mayor sensibilidad al DDE al escindir PARP1 a un tiempo más corto y a menor concentración comparadas con las CMN tal como se observó en la curva dosis-respuesta.

Fig. 3. Expresión de SOD1 en CMN tratadas con p,p' -DDE. A) El nivel de expresión del ARNm de SOD1 fue evaluado por RT-PCR tiempo real. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ fueron significativamente diferentes comparados al resultado obtenido con 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE en cada tiempo medido. B) Inmunoblot mostrando el incremento en el nivel de proteína de SOD1 con 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE para los tiempos indicados. El blot representa uno de tres experimentos independientes con esencialmente el mismo resultado. GAPDH fue usado como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de la

intensidad de las señales. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ Significativamente diferentes cuando se comparó con el primer punto (0 hrs).

Fig. 4. Efectos de la exposición a p,p' -DDE sobre biomarcadores de inflamación. A) Inmunoblot mostrando el incremento en los niveles de COX-2 en CMN tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE para los tiempos indicados. El blot representa uno de tres experimentos independientes con esencialmente el mismo resultado. GAPDH fue usado como control de carga. Se realizó una densitometría para analizar cuantitativamente la intensidad de la señal. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ significativamente diferentes cuando se comparó contra el primer tiempo (0 hrs). B) Niveles de los transcritos de TNF α y NF κ B determinados en CMN por RT-PCR tiempo real. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ significativamente diferentes cuando se compararon contra el tratamiento de 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE para cada tiempo. C) Inmunoblot mostrando el incremento en los niveles de fosfo-I κ B α en CMN tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE para los tiempos indicados. GAPDH fue usado como control de carga. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes. Un análisis cuantitativo de la intensidad de la señal fue realizado por densitometría. $**P < 0.01$ Significativamente diferentes cuando se comparó contra el primer tiempo (0 hrs).

Fig. 5. Poli-ubiquitinación inducida por p,p' -DDE en CMN. A) Extractos de CMN tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de p,p' -DDE a los tiempos indicados fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones

desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12 %) e inmunodetectados con anti-ubiquitina. B) La poli-ubiquitinación también fue detectada en extractos de CMN tratados con diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE durante 1 h. Los blots representan uno de tres experimentos independientes con esencialmente los mismos resultados. GAPDH fue usado como control de carga.

Fig. 6. Activación de caspasas por *p,p'*-DDE. western blot de lisados de CMN expuestos a 80 µg/ml *p,p'*-DDE a lo largo del tiempo. Las membranas fueron tratadas con anticuerpos anti-caspasas 8, 9 y 3 activadas, anti-bid y anti-PARP escindidas. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes. GAPDH fue usado como control de carga.

Fig. 7. Genes de apoptosis inducidos por *p,p'*-DDE. A) niveles de expression de ARNm de p53, Bax y Bcl-2 en CMN tratadas con dos diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE a lo largo del tiempo. Los niveles de transcrito fueron determinados por RT-PCR tiempo real. $**P < 0.01$ significativamente diferentes cuando se compararon con el tratamiento de 10 µg/ml de *p,p'*-DDE en cada tiempo de tratamiento. B) La relación Bax/Bcl-2 fue obtenida por división de los niveles de ARNm de Bax entre los niveles de ARNm de Bcl-2 para cada tiempo. $***P < 0.001$ significativamente diferentes cuando se compararon todos los tiempos. C) Western Blot representativo de Bax y Bcl-2. GAPDH fue usado como control de carga.

