



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO CITOTÓXICO
DE BACTERIORRUBERINA DE LA ARQUEA *Haloterrigena* sp. SGH1 EN
MONOCITOS THP-1.**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

BERNARDO ANDRÉS PAREDES SEGURA

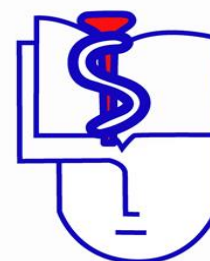
PROFESOR GUÍA:

Dr. Benito Gómez-Silva

Facultad de Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA

ANTOFAGASTA 2021



UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA

Facultad de Ciencias de la Salud

CARRERA BIOQUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO CITOTÓXICO
DE BACTERIORRUBERINA DE LA ARQUEA *Haloterrigena* sp. SGH1 EN
MONOCITOS THP-1.**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

BERNARDO ANDRÉS PAREDES SEGURA

PROFESOR GUÍA:

Dr. Benito Gómez-Silva

Facultad de Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA

ANTOFAGASTA 2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres y hermanos quienes siempre me apoyaron en cada proyecto, en especial a mi madre que, aunque ya no está con nosotros sigue siempre presente, este trabajo se lo dedico a Uds.

En todo este camino siempre ha estado a mi lado Cristina Contreras quien se ha convertido en mi compañera de vida, para ella no me alcanzan las palabras de para expresar mi gratitud. Con Cristina y ahora junto a nuestro hijo Matías nos esperan grandes y lindos desafíos.

No puedo dejar fuera a los amigos que he ganado gracias a la Universidad. Katherine, Igor, Patricia, Ángel y Eric. Gracias por todos esos lindos, divertidos e inolvidables momentos que pasamos.

Me gustaría agradecer a mis profesores del Liceo de Hombres Manuel Montt de la ciudad de Puerto Montt, quienes me ayudaron e incentivaron a desarrollar mi pensamiento crítico y mi amor por la ciencia.

Quiero agradecer enormemente al Dr. Benito Gómez por aceptarme como su alumno tesista y por ser un apoyo constante en todo este proceso. Quien diría que el profesor que admiraba desde hace mucho tiempo terminaría siendo el tutor de mi tesis, que orgullo.

También quiero agradecer a la Dra. Lidia Zúñiga quien habría sido mi “co-tutora” si es que hubiera existido esa figura, muchas gracias Dra. por guiarme y enseñarme durante todo este trabajo de Tesis.

Por último y no menos importante quiero agradecer a Francisca Fábrega, Nataly Flores, Camila Salazar, Mauricio Venegas y a todo el Laboratorio de Bioquímica, departamento biomédico de la Universidad de Antofagasta.

ABREVIATURAS

BR: Familia de isómeros geométricos y derivados anhidros en extracto metanólico de *Haloterrigena* sp. SGH1

BR F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅: Fracciones de BR obtenidas de la separación por cromatografía líquida de alta eficacia

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

DO: Densidad Óptica; Absorbancia

µm: micrómetro

m: metro

µL: microlitro

mL: mililitro

L: Litro

µg: microgramo

mg: miligramo

g: gramo

µM: micromolar

mM: milimolar

rpm: revoluciones por minuto

SG: Salar Grande

SGH1: *Haloterrigena* sp. SGH1

THP-1: Línea celular de monocitos humanos THP-1

in vitro: En este trabajo de tesis se referirá a análisis químicos de extractos metanólicos de SGH1 en ensayos FRAP y ABTS

in vivo: En este trabajo de tesis se referirá a análisis realizado en líneas celulares

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

IP: Ioduro de propidio

MTRed: MitoStatus Red

DHE: Dihidroetidio

TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-ácido carboxílico

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | 6 |
| RESUMEN..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| CAPÍTULO I | 15 |
| INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 1.1. Desierto de Atacama | 15 |
| 1.2. Salar Grande del Desierto de Atacama | 15 |
| 1.3. Halitas..... | 16 |
| 1.4. Arqueas | 17 |
| 1.5. <i>Haloterrigena</i> sp SGH1 | 18 |
| 1.6. Pigmentos carotenoides | 19 |
| 1.6.1. Algunas características generales de los carotenoides | 19 |
| 1.6.2 Funciones antioxidantes y protectoras de los carotenoides | 19 |
| 1.7. Bacteriorrubrina..... | 20 |
| 1.7.1. Propiedades físicas y químicas de BR..... | 21 |
| 1.7.2. Propiedades biológicas de BR | 22 |
| 1.7.3. Composición de BR de SGH1..... | 23 |
| 1.8. Modelo biológico | 24 |
| 1.8.1. Líneas celulares..... | 25 |
| 1.8.2. Monocitos humanos THP-1..... | 25 |
| 1.9. El trabajo de tesis | 27 |
| CAPÍTULO II | 28 |
| 2.1. Hipótesis | 28 |
| 2.2. Objetivos | 29 |
| 2.2.1. Objetivo General..... | 29 |
| 2.2.2. Objetivos Específicos..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO III | 30 |
| 3.1. Materiales | 30 |
| 3.1.1. Equipamiento | 30 |
| 3.1.2. Reactivos | 30 |
| 3.1.3. Sustratos | 31 |
| 3.1.4. Material Biológico | 31 |
| 3.2. Métodos | 32 |
| 3.2.1. Cultivo de SGH1 en medio líquido Z8-MOD | 32 |
| 3.2.2. Obtención del extracto metanólico de SGH1 | 34 |
| 3.2.3. Purificación de BR por HPLC | 35 |
| 3.2.4. Cultivo de línea celular THP-1 | 36 |
| 3.2.5. Preparación de células THP-1 para ensayos de citotoxicidad y actividad antioxidante | 36 |
| 3.2.6. Evaluación de citotoxicidad y actividad antioxidante de BR por Citometría de Flujo | 37 |
| 3.2.7. Evaluación del ingreso de BR a monocitos THP-1 mediante Microscopia Confocal | 41 |
| CAPÍTULO IV | 42 |
| 4.1. RESULTADOS | 42 |
| 4.1.1. Cultivo de <i>Haloterrigena</i> sp. SGH1 | 42 |
| 4.1.2. Extracción de BR y espectrograma de absorción | 43 |
| 4.1.3. Purificación de los componentes del extracto metanólico de <i>Haloterrigena</i> sp. SGH1 | 44 |
| 4.2. Permeabilidad de la membrana celular de monocitos THP-1 frente a BR. | 46 |
| 4.2.1. Fluorescencia de los carotenoides de <i>Haloterrigena</i> sp SGH1 | 46 |
| 4.2.2. ¿Es la membrana celular de los monocitos THP-1 permeable a los carotenoides de la arque SGH1? | 47 |
| 4.3. Ensayos de efecto citotóxico de carotenoides de SGH1 en la línea celular THP-1. | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.1. Ensayo de citotoxicidad de carotenoides SGH1 sobre la permeabilidad de las membranas de los monocitos THP-1. | 50 |
| 4.3.2. Ensayos de viabilidad de monocitos THP-1 en base a actividad mitocondrial..... | 58 |
| 4.4. Ensayos de capacidad antioxidante de fracciones HPLC en la línea celular THP-1..... | 67 |
| 4.4.1. Curso temporal de los ensayos con Antimicina A para la producción de ROS. | 68 |
| 4.4.2. Estandarización de actividad antioxidante de Trolox en células THP-1 incubadas con Antimicina A..... | 72 |
| 4.4.3. Efecto antioxidante de los carotenoides de la arquea <i>Haloterrigena</i> sp. SGH1 en monocitos THP-1. | 76 |
| CAPÍTULO V..... | 80 |
| 5.1. DISCUSIÓN..... | 80 |
| 5.1.1 Separación cromatográfica de carotenoides de la arquea SGH1..... | 80 |
| 5.1.2. ¿Es BR un soluto permeable en membranas de monocitos THP-1? | 81 |
| 5.1.3. Estudios de citotoxicidad..... | 83 |
| 5.1.4. Estudios de actividad antioxidante. | 92 |
| CAPÍTULO VI..... | 96 |
| CONCLUSIONES..... | 96 |
| CAPÍTULO VII..... | 98 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 98 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura N° 1. Bosquejo de las principales unidades geológicas en un transecto de Este a Oeste desde la costa del Pacífico hasta el Altiplano (4)..... | 16 |
| Figura N° 2. Colonización de halitas del Salar de Llamara en el norte de Chile. | 17 |
| Figura N° 3. Observación de <i>Haloterrigena sp.</i> SGH1 por microscopía. A: tinción Gram con un aumento de 100x y B: microscopía electrónica de transmisión (10)..... | 18 |
| Figura N° 4. Estructura química de Bacteriorrubrina (15)..... | 20 |
| Figura N° 5. Biorreactor BER1, de fabricación personal..... | 33 |
| Figura N° 6. Curva de crecimiento de <i>Haloterrigena sp.</i> SGH1. | 42 |
| Figura N° 7. Espectrograma de absorción de un extracto metanólico de <i>Haloterrigena sp.</i> SGH1..... | 44 |
| Figura N° 8 Cromatograma HPLC de un extracto metanólico de <i>Haloterrigena sp.</i> SGH1..... | 45 |
| Figura N° 9. Ingreso de moléculas fluorescentes a los monocitos THP-1..... | 49 |
| Figura N° 10 Ensayos de permeabilidad de membrana de monocitos THP-1 incubados con diferentes fracciones de BR y Ioduro de Propidio. | 55 |
| Figura N° 11. Distribución de los monocitos THP-1 en subpoblaciones de células basales, IP+ y muertas por efecto de los carotenoides de la arquea SGH1..... | 57 |
| Figura N° 12. Efecto de los carotenoides de <i>Haloterrigena sp.</i> SGH1 en el potencial de membrana mitocondrial de monocitos THP-1..... | 61 |
| Figura N° 13. Efecto de los carotenoides de SGH1 en la distribución de las subpoblaciones de monocitos de acuerdo con el potencial de membrana mitocondrial..... | 63 |
| Figura N° 14. Comparación de tres experimentos..... | 66 |
| Figura N° 15 Curso temporal de la producción de células THP-1 ROS+ en presencia de Antimicina A. | 70 |
| Figura N° 16 Efecto de la concentración de Antimicina A en la generación de células THP-1 ROS+, en presencia o ausencia del antioxidante Trolox..... | 74 |
| Figura N° 17. Evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides de <i>Haloterrigena sp.</i> SGH1 en monocitos THP-1 incubados en presencia de Antimicina A..... | 79 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Identificación de los carotenoides que componen BR en SGH1 por HPLC y posterior UHPLC/MS. (5,14) | 24 |
| Tabla 2. Comparación del crecimiento de Haloterrigena sp. SGH1 en tres volúmenes de medio Z8-MOD. | 43 |
| Tabla 3. Viabilidad de monocitos THP-1 en base a ensayos de permeabilidad de membrana. | 56 |
| Tabla 4. Viabilidad de monocitos THP-1 en base a ensayos de medición del potencial de membrana mitocondrial. | 62 |
| Tabla 5. Curso temporal de la producción de radicales libres (ROS) en células THP-1 incubadas con Antimicina A. | 71 |
| Tabla 6. Efecto de la concentración de Antimicina A en la producción de células THP-1 ROS+. | 75 |
| Tabla 7. Comparación del efecto antioxidante intracelular de Trolox y los carotenoides de Haloterrigena sp. SGH1 frente a radicales libres generados por Antimicina A en células THP-1. | 77 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| ANEXO 1: Medio de cultivo para Haloterrigena sp. SGH1. | 108 |
| ANEXO 2: Cultivo de monocitos THP-1 (ATCC® TIB-202™) | 111 |
| ANEXO 3: Imágenes sobre el cultivo y obtención de carotenoides de Haloterrigena sp. SGH1. | 113 |
| ANEXO 4: Descripción de la metodología de citometría de flujo. | 116 |

RESUMEN

El Desierto de Atacama ha sido descrito como uno de los más áridos del planeta y presenta condiciones físicas y químicas limitantes para la vida, tales como altas tasas de radiación solar, escasas precipitaciones, desecación, suelos con alta salinidad y extremos de temperaturas. La existencia de una microflora extremófila y extremo-tolerante ha sido demostrada bajo estas condiciones ambientales, particularmente en el Salar Grande, Región de Tarapacá. Este salar fósil costero, bajo altos niveles de radiación solar, alta salinidad y desecación, es rico en rocas de sal llamadas halitas ($\geq 95\%$ NaCl) que están colonizadas por consorcios microbianos compuestos de miembros de los tres dominios de la vida y dominados por una cianobacteria del género *Halothece*.

La arquea halófila extrema, *Haloterrigena* sp. SGH1, ha sido recientemente aislada y cultivada desde comunidades microbianas endolíticas que colonizan halitas en el Salar Grande. SGH1 crece óptimamente en 25% p/v NaCl y acumula Bacteriorrubrina (BR), un carotenoide de 50 átomos de carbono, con un sistema de trece doble enlaces conjugados. Mediante la aplicación de los ensayos de actividad antioxidante (por ejemplo, FRAP y ABTS), los extractos metanólicos de SGH1 han mostrado una alta actividad antioxidante, superior a antioxidantes estándares como Trolox y β -caroteno. Además, los estudios sobre la composición de carotenoides en SGH1 han indicado que están constituidos por una familia de isómeros geométricos *cis* y *trans* de BR, siendo *all-trans*-BR el isómero más abundante. Estos carotenoides han sido purificados por HPLC y poseen una alta capacidad antioxidante *in vitro*.

En este contexto, preguntas acerca del efecto citotóxico, así como la actividad antioxidante de BR en células intactas fueron investigadas en este proyecto de tesis. Para ello, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: *Los isómeros geométricos y derivados anhidros de Bacteriorrubrina purificados de la arquea halófila extrema Haloterrigena sp. SGH1, poseen actividad antioxidante sin efectos*

citotóxicos sobre líneas celulares de monocitos humanos THP-1 en cultivo. Los isómeros geométricos y derivados anhidros más abundantes de BR fueron evaluados tanto sobre su actividad antioxidante como sus efectos citotóxicos sobre la línea celular de monocitos THP-1 por citometría de flujo. La línea celular THP-1 fue seleccionada ya que es ampliamente utilizada como modelo celular humano para el estudio de diversos procesos biológicos, puede ser cultivada en suspensión, y permite evaluar *in vivo* el efecto de moléculas con actividad antioxidante y la cuantificación de la actividad citotóxica por citometría de flujo.

Los resultados del presente trabajo de tesis indican que (1) la familia de isómeros de BR son moléculas fluorescentes, permeables a la membrana citoplasmática, que ingresa al interior de los monocitos THP-1; (2) los carotenoides de SGH1, purificados por HPLC, no son citotóxicos a monocitos THP1, al no afectar la viabilidad celular con el consecuente alto porcentaje de células intactas detectables en la población THP1 en estudio y, (3) los carotenoides de la arquea SGH1 son moléculas con capacidad antioxidante a nivel intracelular en los monocitos THP1, disminuyendo sustantivamente la acumulación de moléculas ROS.

En consecuencia, la hipótesis propuesta inicialmente para este estudio ha sido confirmada experimentalmente, los resultados han sido recientemente publicados en la revista *Frontiers in Microbiology* y permiten abrir potenciales aplicaciones biotecnológicas para este microorganismo nativo del Desierto de Atacama.

ABSTRACT

The Atacama Desert has been described as one of the most arid drylands in our planet with extreme physical and chemical conditions limiting life (high solar radiation, desiccation, salinity, among others). An extremophile and extreme-tolerant microbiomes have been shown to be present under these conditions, particularly at Salar Grande, Tarapacá Region. This coastal fossil salar is under high solar insolation, salinity, and desiccation, it is rich in halites, evaporitic rocks ($\geq 95\%$ NaCl) colonized by microbial consortia made of members of the three domains of life, dominated by cyanobacteria from the *Halotheca* genus.

The extremely halophilic archaeon, *Haloterrigena* sp. SGH1, has been recently isolated from endolithic microbial communities in halites at Salar Grande. SGH1 grows optimally at 25% NaCl), accumulating bacterioruberin (BR), a C50 carotenoid with a conjugated 13-double-bond system. Antioxidant assays (FRAP, ABTS) have shown that methanolic extracts from SGH1 have antioxidant activities higher than Trolox or beta-carotene. Studies also have shown that BR is a family of cis and trans optical isomers, with all-trans BR as the most abundant. These carotenoids, isolated by HPLC, also have high *in vitro* antioxidant activity.

In this context, questions on cytotoxicity and intracellular antioxidant capabilities were investigated in this undergraduate thesis project, and the following hypothesis was raised: “*Geometric and anhydro derivatives of bacterioruberin purified from the extreme halophilic archaeon Haloterrigena sp. SGH1 have antioxidant activity without cytotoxic effects on the THP-1 cell line of human monocytes in culture*”. Antioxidant activity and cytotoxic effects of the most abundant geometric isomers and anhydrous derivatives of BR were evaluated by flow cytometry on human monocytes THP-1 cell line. This cell line is amply used as a human cell model to study different cellular processes, can be grown as cell suspensions, and can be used to test cytotoxicity and antioxidant capabilities of molecules.

The results obtained indicate that (1) the family of isomers of BR are fluorescent molecules that can cross the cytoplasmic membrane of monocytes THP-1, (2) SGH1 carotenoids are not cytotoxic to THP-1 cells, without effects on cell viability, based on the high percentage of basal intact cells detected on the monocyte population under scrutiny, and (3) BR from SGH1 are antioxidant carotenoids that substantially decrease intracellular damages by ROS molecules in THP-1 monocytes.

The hypothesis proposed for this study has been experimentally confirmed, the results are part of a recent publication in *Frontiers in Microbiology* and open the possibility of biotechnological applications for this native microorganism from the Atacama Desert.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Desierto de Atacama

El Desierto de Atacama es considerado como uno de los más áridos del planeta, comprende una superficie de aproximadamente 105.000 km² y se encuentra ubicado en el norte de Chile, abarcando las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta y el norte de la región de Atacama. Este Desierto se caracteriza por ser un ambiente extremo, presenta condiciones físicas y químicas limitantes para la vida; tales como altas tasas de radiación solar, escasas precipitaciones, desecación, suelos con alta salinidad y extremos de temperaturas. Sin embargo, existen microorganismos extremófilos y extremo-tolerantes, con representantes de los tres dominios de la vida, con la capacidad genética y bioquímica para colonizar los diversos nichos que existen (1, 2). Entre estos, es importante remarcar que el estudio realizado en esta tesis es sobre comunidades microbiológicas que habitan rocas de sal (halitas) en el Salar Grande, en el norte de Chile.

1.2. Salar Grande del Desierto de Atacama

El Salar Grande (SG) del Desierto de Atacama es una cuenca evaporítica fósil, ubicada al Este de la Cordillera de la Costa, de 45 km de largo y 4,5 km de ancho aproximadamente, este se encuentra en una depresión tectónica de la Cordillera de la Costa del norte de Chile a una altitud de 640 m a 750 m sobre el nivel del mar. En la región norte de Chile hay alrededor de 100 salares de diferente edad geológica, composición y génesis. Este Salar Grande es único y tiene una evolución compleja que comienza a mediados del Mioceno, cuando la elevación de los Andes bloqueó hacia el Este la formación de lluvia lo cual, junto con la evaporación por

altas temperaturas, creó un ambiente desértico altamente árido (3), lo cual se puede apreciar en la Fig. 1, donde vemos representadas las principales unidades geológicas en un transecto de Oeste a Este. La longitud total es de unos 100 km. Esta cuenca evaporítica está constituida de rocas de NaCl (halitas) en las que habita una comunidad microbiana rica en arqueas desde donde se ha aislado el primer microorganismo *Haloterrigena* sp SGH1 rica en carotenoides (5).

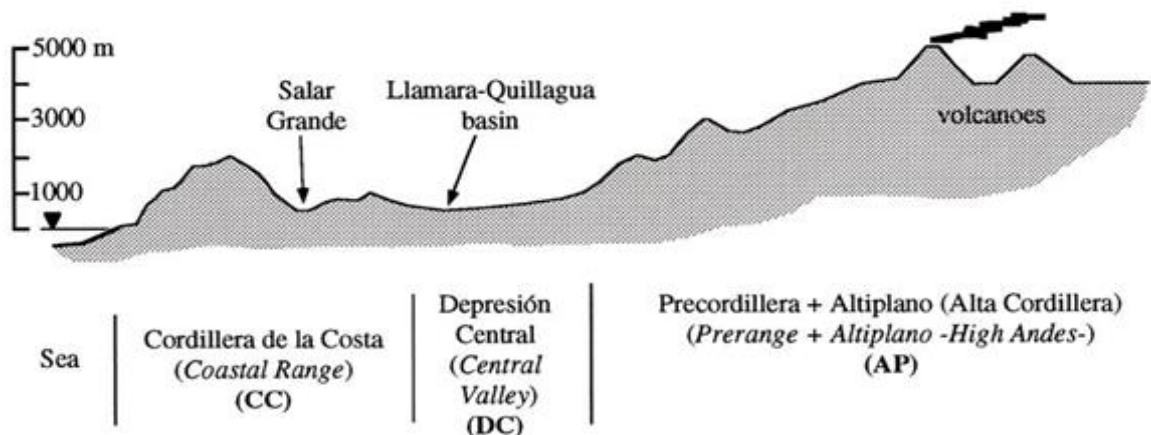


Figura N° 1. Bosquejo de las principales unidades geológicas en un transecto de Este a Oeste desde la costa del Pacífico hasta el Altiplano (4).

1.3. Halitas

Las halitas son estructuras rocosas que están constituidas por cristales de sal que alcanzan hasta cerca de un 95% de NaCl (Fig. 2), estas halitas conforman vastas extensiones de suelo en el SG y que datan del periodo mesozoico-paleolítico (4). El cloruro de sodio que conforma estas halitas posee la capacidad de transformar vapor de agua en agua líquida mediante un proceso llamado deliquesencia, esto es un factor clave para la vida microbiana en los suelos hipersalinos del Desierto de Atacama (6).

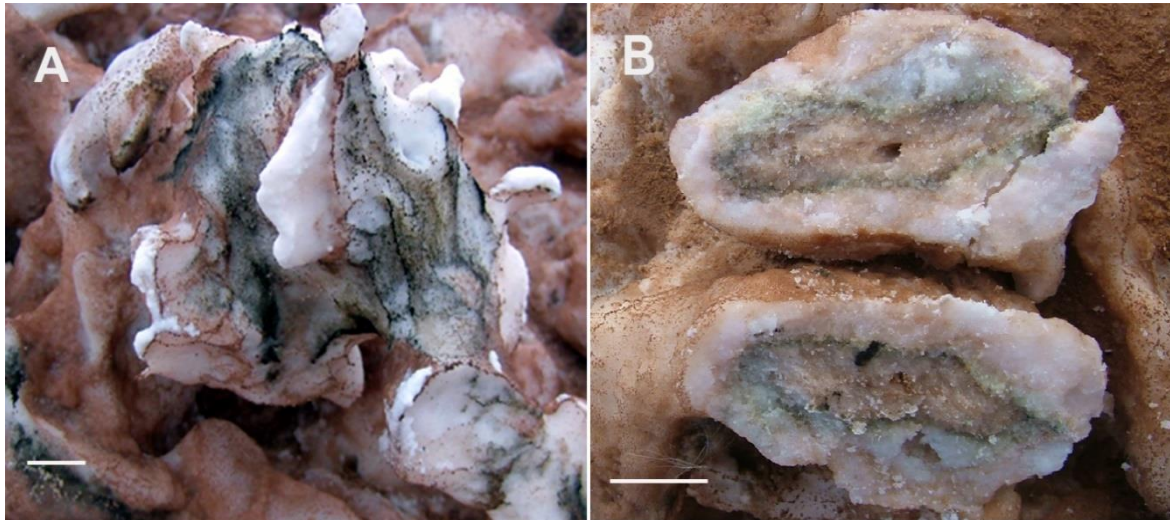


Figura Nº 2. Colonización de halitas del Salar de Llamara en el norte de Chile. (a) Abundante biopelícula epilítica cianobacteriana que cubre parte de la halita en la superficie expuesta al aire (barra de escala: 2 cm). (b) Halitas rotas que muestran colonización endolítica cianobacteriana (barra de escala: 5 cm) (7).

1.4. Arqueas

Las arqueas son microorganismos ancestrales que datan de hace millones de años y habitan ambientes inhóspitos tales como profundidades oceánicas, ambientes salinos, manantiales de aguas calientes, aguas a bajas temperaturas o lagunas de aguas ácidas (8). Sin embargo, también se encuentran en ambientes menos extremos como suelos, lagos, hasta en el estómago de ganado. Por su apariencia externa no son fáciles de distinguir de las bacterias. A nivel molecular se parecen más a los eucariotas en su maquinaria de manipulación del material genético, pero se parecen más a las bacterias en sus procesos metabólicos y de conversión energética (9). Dentro del dominio Arquea podemos encontrar a las arqueas halófilas de la familia *Halobacteriaceae*, en su mayoría son de color rojo, debido al alto contenido de carotenoides C-50 como Bacteriorrubrina (BR) y derivados en su membrana (8).

Uno de los grupos de microorganismos que habitan halitas en SG son las arqueas y *Haloterrigena sp* SGH1 es la primera arquea aislada de estas comunidades (5).

1.5. *Haloterrigena* sp SGH1

La cepa *Haloterrigena* sp. SGH1 fue aislada por miembros del Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Antofagasta, desde comunidades endolíticas que colonizan rocas de halitas del Salar Grande, Región de Tarapacá, en el Desierto de Atacama. SGH1 es una arquea halófila extrema que pertenece al género *Haloterrigena*, este microorganismo es unicelular, Gram negativo, presenta morfología cocoide, posee un diámetro promedio de 1,2 μm (Fig. 3), crece óptimamente en presencia de 25% de NaCl y está taxonómicamente relacionada con la especie *Haloterrigena turkmenica*. Esta nueva estirpe, nativa de nuestro desierto y denominada *Haloterrigena* sp. SGH1, acumula el carotenoide BR (5,10).

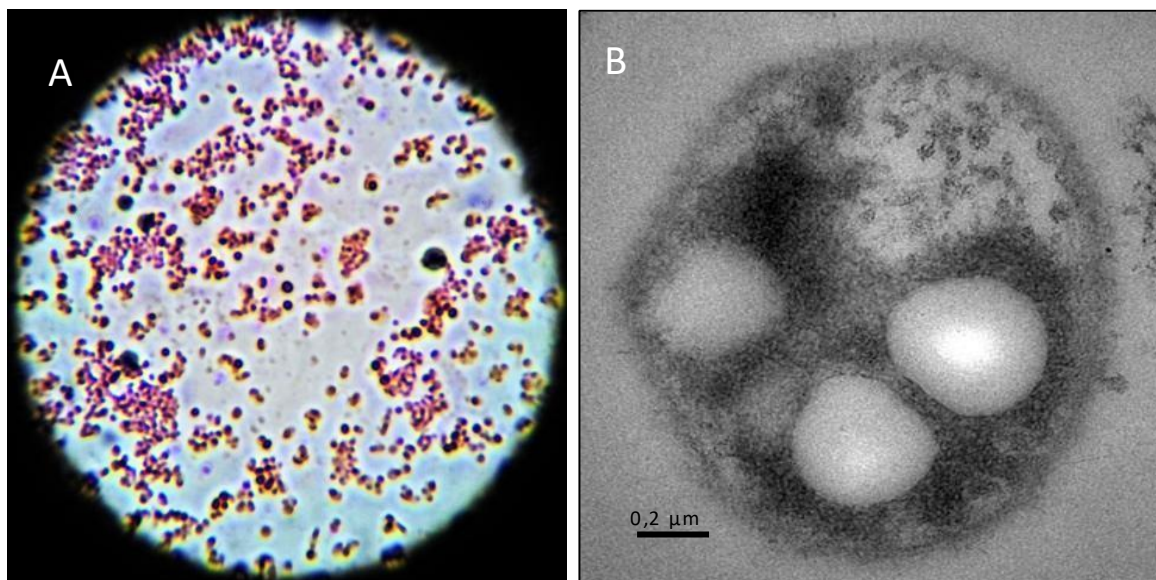


Figura N° 3. Observación de *Haloterrigena* sp. SGH1 por microscopía. A: tinción Gram con un aumento de 100x y B: microscopía electrónica de transmisión (10).

1.6. Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son moléculas compuestas de 40 o 50 átomos de carbono. Una de sus características es que son moléculas con un extenso sistema de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos, los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, hidrocarburos que contienen átomos de oxígeno (11). A continuación, se describen algunas características y propiedades de los carotenoides.

1.6.1. Algunas características generales de los carotenoides

Como grupo, los carotenoides son moléculas extremadamente lipofílicas con poca o nula solubilidad en agua; por ello, se encuentran localizadas en áreas hidrofóbicas de las células (por ejemplo, membranas); además, los carotenoides se pueden encontrar formando complejos con proteínas en ambientes acuosos (12).

Los carotenoides son moléculas coloreadas debido a su capacidad de absorber parte de la radiación solar y participan en procesos metabólicos de transferencia de energía (por ejemplo, fotosíntesis) y protección a la luz ultravioleta (12,13).

Otra función bien establecida para estas moléculas es la de actuar como antioxidantes en organismos fotosintéticos y en muchos no fotosintéticos aerobios, participando en la desactivación de radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de la célula (13).

1.6.2 Funciones antioxidantes y protectoras de los carotenoides

La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva al disponer de abundantes electrones π ; consecuentemente, fácilmente forman radicales libres de vida corta en presencia de agentes oxidantes. Los radicales libres; por ejemplo, oxígeno singulete (1O_2) e hidroxilo ($OH\cdot$), son especies altamente reactivas capaces

de iniciar la peroxidación de lípidos, de inactivar proteínas, o de causar daño en moléculas de ADN o ARN (13). Así, los carotenoides pueden evitar o disminuir el daño oxidativo de las células actuando como agentes antioxidantes ante la presencia de radicales libres.

Este trabajo de tesis estudió algunos efectos biológicos del carotenoide bacteriorrubrina (BR) en un modelo celular humano y, de acuerdo con los resultados, considerar su proyección biotecnológica.

1.7. Bacteriorrubrina

BR es un pigmento carotenoide de color rojizo que pertenece a la familia de las xantofilas, se encuentra presente en gran cantidad de bacterias y arqueas extremófilas, fue aislado por primera vez desde la bacteria halófila *Halobacterium volcanii* en 1932. Dentro de sus roles podemos encontrar (i) aumenta la rigidez e hidrofobicidad de la membrana celular, (ii) contribuye a la estabilización térmica en microorganismos que habitan en ambientes de baja temperatura y alta salinidad, (iii) tiene efecto antioxidante y fotoprotector, y (iv) actúa como componente de la molécula arqueorodopsina (15).

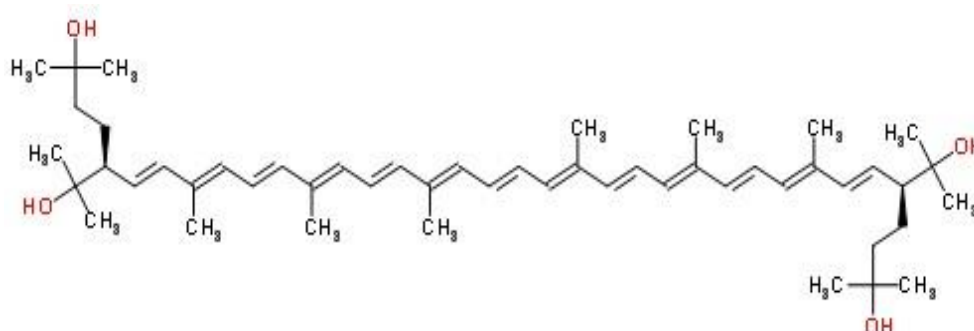


Figura N° 4. Estructura química de Bacteriorrubrina (15).

1.7.1. Propiedades físicas y químicas de BR

BR es una molécula que está formada por un esqueleto de 50 átomos de carbono, 13 dobles enlaces conjugados y cuatro grupos hidroxilo terminales, como se puede apreciar en la Figura N° 4. Esta molécula debido a sus características físicas y químicas posee la capacidad de producir fluorescencia (16-18), y también la de cumplir como agente antioxidante protector del daño celular foto-oxidativo en bacterias y arqueas (14).

1.7.1.1. Fluorescencia de BR

La fluorescencia de Bacteriorrubrina fue reportada en 1996 cuando se analizó el principal pigmento carotenoide de la bacteria psicrófila *Micrococcus Roseus*, que correspondía a Bacteriorrubrina. Este carotenoide disuelto en metanol presenta fluorescencia al exponerse a una longitud de onda de excitación de 465 nm y 490 nm generando emisión de longitudes de onda 570 nm y 590 nm respectivamente (16-18).

1.7.1.2. Actividad antioxidante in vitro de BR

La actividad antioxidante de extractos metanólicos de SGH1 en ensayos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) muestran que son altamente eficientes para eliminar radicales libres. Los resultados de ABTS, expresados como TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox), indicaron que la actividad antioxidante de los carotenoides SGH1 fue casi 8, 9 y 26 veces mayor que Trolox, betacaroteno o astaxantina, respectivamente (5,19). Por su parte al medir actividad antioxidante por el ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay; Poder antioxidante reductor de hierro) expresados como TEAC, los carotenoides SGH1

tenían una capacidad antioxidante casi 10, 18 y 20 veces mayor que Trolox, betacaroteno o astaxantina, respectivamente (5,19).

El denominado método ABTS se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $ABTS^+$, debido a su reducción a ABTS por la acción de antioxidantes. El radical catiónico $ABTS^+$ es un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio. De esta manera, el grado de decoloración del radical $ABTS^+$, expresado como porcentaje de inhibición, depende de la concentración del antioxidante (20,22).

El método FRAP se fundamenta en la reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) presente en el reactivo de FRAP hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) por presencia de antioxidantes. Se genera una coloración azul, de intensidad proporcional a la capacidad reductora del antioxidante presente en la muestra en estudio, que puede cuantificarse por colorimetría (593 nm) en base a un patrón de sulfato ferroso (20,21).

1.7.2. Propiedades biológicas de BR

BR presente en la membrana celular de arqueas y algunas bacterias contribuye en la osmorregulación de los organismos en ambientes hipersalino, estabilizando y dando rigidez a las membranas; también, BR permite proteger y contrarrestar el daño producido por la liberación de radicales libres intracelulares (14,23).

1.7.2.1. Rol de BR en membranas biológicas

El rol de BR como parte de las membranas de microorganismos y en vesículas lipídicas artificiales ha sido demostrado previamente (23). Esta capacidad de incorporarse en forma transmembranal ha sido explicada al considerar el largo de las moléculas de BR (50 átomos de carbono), que se ajusta adecuadamente a las dimensiones moleculares de las membranas, donde las cabezas polares de BR

pueden acomodarse en la fase acuosa interna y externa de estas. Así, BR permite reducir la permeabilidad al agua y aumenta la rigidez de las bicapas lipídicas y, por lo tanto, desempeñar el papel de reforzadores estructurales de la membrana, al menos en un sistema relacionado con las membranas arqueobacterianas naturales (23).

1.7.3. Composición de BR de SGH1.

BR de la cepa SGH1 comprende una familia de isómeros geométricos y derivados anhidros; estas moléculas fueron separadas inicialmente por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), separando 5 fracciones. Posteriormente, mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia acoplado a Espectrómetro de Masa (UHPLC/MS) estableció la distribución y el porcentaje de cada una de las moléculas de la familia de BR que conforman cada fracción (5,14). La Tabla N°1 resume esta información.

En este trabajo de tesis se utilizó una fracción adicional a las ya descritas, separada por HPLC, denominada fracción F₀, cuya composición no se ha establecido aún. Las seis fracciones fueron evaluadas mediante citometría de flujo, en sus capacidades antioxidantes y efecto citotóxico, utilizando como modelo biológico la línea celular THP-1.

Tabla 1. Identificación de los carotenoides que componen BR en SGH1 por HPLC y posterior UHPLC/MS. (5,14)

| Fracción | Sub-fracciones | Carotenoides Identificados | Abundancia Relativa (%) |
|----------|----------------|---|-------------------------|
| I | F-I.1 | all-trans-bacteriorrubberina | 43.3 |
| | F-I.2 | all-trans-Tetra-anhidrobacteriorrubberina | 3.4 |
| | F-I.3 | cis-Tetra-anhidrobacteriorrubberina | 8.3 |
| II | F-II.1 | all-trans-bacteriorrubberina | 15 |
| III | F-III.1 | all-trans-bacteriorrubberina | 2.6 |
| | F-III.2 | 9-cis-bacteriorrubberina | 10.4 |
| IV | F-IV.1 | all-trans-bacteriorrubberina | 3.7 |
| | F-IV.2 | 13-cis-bacteriorrubberina | 4.3 |
| V | F-V.1 | all-trans-Mono-anhidrobacteriorrubberina | 9.0 |

1.8. Modelo biológico

Un modelo biológico es un organismo ya sea animal o celular, que se utiliza para obtener información de otro organismo de manera análoga por similitudes con su biología por medio de la experimentación, esto se realiza ya que algunas especies son más difíciles de estudiar directamente. Un organismo para ser utilizado como modelo biológico, debe reunir ciertos requisitos; tener similitudes biológicas con el organismo que se quiere estudiar, por lo general son altamente estudiados, son fáciles de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio y tienen ventajas experimentales en relación con el organismo que se desea estudiar (24).

1.8.1. Líneas celulares

Las líneas celulares constituyen una de las principales herramientas en la investigación médica y biológica. Proviene de un cultivo primario que ha sido sometido a procesos que le confieren la capacidad de multiplicación ilimitada o tienen un origen tumoral, están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. La utilización de cultivo de líneas celulares, comparadas con los modelos animales multicelulares, supone un sistema más sencillo para estudiar procesos bioquímicos o moleculares, lo que ha permitido mejorar el conocimiento de numerosas enfermedades, analizar la respuesta a fármacos o determinar el efecto de mutaciones concretas en el genoma (25,26).

1.8.2. Monocitos humanos THP-1

La línea celular THP-1 fue la seleccionada para el desarrollo experimental de esta tesis. Esta línea celular proveniente de un paciente japonés con leucemia (subtipo M5), descrita en 1980 y hoy en día es ampliamente utilizada como modelo celular humano para el estudio de diversos procesos biológicos (27).

El modelo celular THP-1 es una línea celular humana que puede ser cultivada en suspensión, y permite fácilmente evaluar *in vivo* el efecto de moléculas (28). Por ello, se seleccionó para evaluar la actividad antioxidante y citotóxica de los carotenoides de la arquea SGH1, mediante la citometría de flujo.

1.8.2.1. Estrés oxidativo en humanos

Considerando que los efectos de BR en células eucariontes no se conoce, es importante recordar que en estas células el oxígeno molecular es un agente oxidativo de suma importancia.

El metabolismo celular normal produce la liberación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) las cuales, en concentraciones bajas a moderadas, participan en procesos fisiológicos celulares. Sin embargo, a altas concentraciones pueden producir daño en componentes celulares (lípidos, proteínas y ADN). El cambio en el equilibrio entre oxidante/antioxidante a favor de los oxidantes se denomina “estrés oxidativo”. El estrés oxidativo contribuye o causa muchas patologías como; trastornos neurológicos, hipertensión, diabetes, isquemia y enfermedades pulmonares entre otras (29).

1.8.2.2. Mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo en humanos.

Los mecanismos de defensa contra moléculas oxidantes se han clasificado en dos sistemas: el enzimático (endógeno) y el no-enzimático (exógeno). El primero se basa en mecanismos intrínsecos que posee la célula para defenderse frente al ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en Inglés). Entre ellos podemos encontrar a las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa y glutatión reductasa. Superóxido dismutasa permite la disminución del ión superóxido catalizando la formación de peróxido de hidrógeno, cuya acumulación se evita por el sistema de catalasa/glutatión peroxidasa, transformándolo en oxígeno no molecular (por ejemplo, agua) y glutatión oxidado (30,31).

Cuando el sistema endógeno de la célula se satura, se presenta una sobreproducción de iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dando lugar al radical oxhidrilo ($OH\cdot$) que es una molécula altamente reactiva alterando la estructura de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (31).

El mecanismo exógeno es paralelo al proceso endógeno y muy útil cuando éste último se satura. El proceso endógeno está formado por compuestos llamados depuradores de radicales libres y, entre los más conocidos se encuentran ácido

ascórbico, tocoferoles, flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos y carotenoides (31).

1.9. El trabajo de tesis

En base a lo anterior, en esta tesis se propone demostrar si BR es un agente antioxidante en la línea celular THP-1 sin efecto citotóxico. Los resultados de este trabajo permitirán proponer a la cepa SGH1 como una fuente de producción del pigmento BR para uso biotecnológico; por ejemplo, como preservante de origen natural para alimentos como contraparte a los de origen sintético, también para su uso como antioxidante para la preservación de espermatozoides en bancos de esperma para la industria veterinaria o para su uso como componente de cremas protectoras al daño producido por la radiación solar (32-34).

CAPÍTULO II

2.1. Hipótesis

Los isómeros geométricos y derivados anhidros de Bacteriorruberina purificados de la arquea halófila extrema *Haloterrigena* sp. SGH1, poseen actividad antioxidante sin efectos citotóxicos sobre líneas celulares THP-1 de monocitos humanos en cultivo.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante y efecto citotóxico de los isómeros geométricos y derivados anhidros de Bacteriorrubrina de la arquea *Haloterrigena* sp. SGH1, sobre líneas celulares de monocitos THP-1.

2.2.2. Objetivos Específicos

- 1.- Purificar los componentes que constituyen la familia del carotenoide Bacteriorrubrina de *Haloterrigena* sp. SGH1.

- 2.- Evaluar la capacidad antioxidante de los isómeros ópticos y derivados anhidros de Bacteriorrubrina purificados de SGH1, en células THP-1.

- 3.- Evaluar el efecto citotóxico de los isómeros ópticos y derivados anhidros de Bacteriorrubrina purificados, sobre líneas celulares THP-1

CAPÍTULO III

3.1. Materiales

3.1.1. Equipamiento

- a) Agitador Orbital e Incubadora Zichen ZHWY-100B
- b) Centrifuga Sorvall RC 5B PLUS
- c) ULTRA FREEZER Haier DW-86L728J
- d) Liofilizador BIOBASE FREEZE DRYER BK-FD10PT
- e) Cromatógrafo HPLC Shimadzu Hitachi CL-20A
- f) Estufa de CO₂ NUAIRE UN-5800E
- g) Citómetro de flujo BD FACSJazz
- h) Microscopio Confocal Leica SP8

3.1.2. Reactivos

- a) Sales: NaCl, KCl
- b) Solventes orgánicos: Etanol, Metanol, DMSO
- c) Inductor de estrés oxidativo: Antimicina A (SIGMA Cat. A8674)
- d) Molécula antioxidante para control positivo: Trolox
- e) Inductor de daño celular: Antimicina A (SIGMA Cat. A8674)
- f) Indicadores fluorescentes de actividad biológica: Ioduro de Propidio (IP; Cat. P1304MP), MitoStatus Red (MTRed; BD Pharmingen™ Cat. 564697), Dihidroetidio (DHE; CAS Number:104821-25-2)

3.1.3. Sustratos

- a) Medio de cultivo Z8 MOD
- b) Medio de cultivo RPMI 1640
- c) Suero fetal bovino
- d) DMEM FluoroBrite (Gibco Cat. A18967-01)

3.1.4. Material Biológico

- a) Arquea halófila *Haloterrigena* sp. SGH1

La arquea SGH1 fue obtenida de halitas presentes en el Salar Grande de Atacama, y fue caracterizada genómicamente dando como resultado cercanía filogenética con la especie *Haloterrigena turkmenica* (5,10).

- b) Línea celular de monocitos THP-1 (ATCC® TIB-202™)

La línea celular THP-1 es proveniente de un paciente japonés con leucemia, esta fue descrita y hoy en día es ampliamente utilizada como modelo celular humano para el estudio de diversos procesos biológicos (27,28).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo de SGH1 en medio líquido Z8-MOD

Haloterrigena sp. SGH1 para ser cultivada requiere el aporte de iones y micronutrientes proporcionados por el medio líquido Z8, este es modificado para contener 50 mM KCl, 0,5% de casaminoácidos y una concentración del 25% m/v de NaCl. El cultivo requiere presencia de oxígeno y ser incubado bajo luz blanca continua a una temperatura de 35°C (5,10). Revisar ANEXO 1 para obtener mayores detalles del medio de cultivo Z8-MOD.

3.2.1.1. Cultivo inicial de SGH1

Al iniciar el cultivo, SGH1 es inoculada en un matraz estéril de 25 ml con medio Z8 MOD e incubada bajo luz blanca continúa proporcionada por 4 tubos fluorescentes que proporcionan $34\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (1150 lúmenes cada uno), con agitación rotatoria horizontal constante de 120 rpm y 35°C proporcionado por una incubadora con agitador orbital (Zichen ZHWY-100B). El cultivo se va trasladando a matraces de volúmenes más altos (50 ml, 500 ml y 1 L), en los que siempre el volumen de cultivo puede llegar como máximo la mitad de la capacidad del matraz, para así mantener una sección del matraz con oxígeno.

El crecimiento del cultivo se va midiendo diariamente por turbidez registrando su absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic 20D+), a una longitud de onda de 660 nm. Rutinariamente, el cultivo alcanza fase estacionaria a una absorbancia cercana a 0,9.

3.2.1.2. Escalamiento de cultivo de SGH1



Figura N° 5. Biorreactor BER1, de fabricación personal.

En el cultivo escalado se utilizó un biorreactor de diseño original (Figura N° 5), éste está constituido por un frasco de vidrio de 18 L y un soporte para la iluminación hecho de plástico PVC que cuenta con un sistema eléctrico con aislación, que provee energía a 3 ampolletas incandescentes de luz blanca (luz cálida) que proporcionan 1100 lúmenes cada una. Para proporcionar aire y realizar la agitación del medio, se utilizaron dos piedras difusoras de 7cm de largo por 2 de ancho conectadas a dos sistemas de aireación (bomba de aire E-268. Pet planet) que entrega 2.700 cc/min. Para controlar la temperatura del cultivo a 35°C se utilizó un calefactor sumergible (EHEIM Thermo control 3612 Aquarium Heater). Además, el biorreactor se cubrió con cartón forrado con papel aluminio para ayudar a mantener la temperatura, reflejar y concentrar la luz sobre el cultivo.

La producción de biomasa de la arquea en estudio se realizó en etapas. Primero, se cultivó 5 L que al aproximarse a fase estacionaria de crecimiento fue diluido con

medio de cultivo fresco para completar un volumen final de 11 L. Segundo, se cosecharon 10 L de cultivo, dejando 1 L como inóculo para el siguiente cultivo.

3.2.1.3. Cosecha del cultivo

El crecimiento del cultivo se midió en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic 20D+), a una longitud de onda de 660 nm, y se cosechó al alcanzar una absorbancia cercana 0,9 (fase estacionaria). El cultivo fue centrifugado en frascos de 250 ml en una centrifuga preparativa Sorvall RC 5B PLUS con el rotor SLA1500 a 4000 rpm 4°C, por 15 minutos, una vez concluida la centrifugación se descarta el sobrenadante y se recupera el pellet, suspendiendo con 1,5 mL de medio de cultivo Z8 MOD al 10% (sin casaminoácidos), para bajar la cantidad de sal del medio. El pellet recuperado se depositó en placas Petri, para posteriormente almacenar en un congelador de laboratorio a -80°C (ULTRA FREEZER Haier DW-86L728J) en donde se conserva para su posterior liofilización.

3.2.2. Obtención del extracto metanólico de SGH1

La biomasa congelada a -80°C fue liofilizada durante 5 horas en un liofilizador Biobase Freezer Dryer BK-FD10PT. La biomasa liofilizada fue recuperada y homogenizada, y una cantidad conocida de ella fue transferida a un tubo Falcon de 15 mL. La biomasa fue suspendida en 100% metanol, grado HPLC, enfriado a -20°C, en un volumen suficiente como para cubrir la biomasa liofilizada (4-5 mL). Luego de mezclar exhaustivamente la suspensión, esta se llevó a -20°C por 4 h y posteriormente fue centrifugada a 4.000 rpm en una Centrifuga IEC Centra CL2. Estas operaciones se repitieron hasta alcanzar un pellet final decolorado y los sobrenadantes fueron colectados. Dado que el extracto metanólico contiene NaCl, el extracto metanólico fue transferido a placas Petri, el solvente fue evaporando a temperatura ambiente, en la oscuridad. Los cristales de sal que se forman fueron

extraídos con metanol, repitiendo este procedimiento hasta que obtener cristales incoloros, de modo que se obtiene un extracto final que no contenía cristales de sal. Finalmente, el extracto metanólico seco fue pesado y refrigerado a 4°C hasta su uso.

3.2.3. Purificación de BR por HPLC

Los carotenoides totales fueron extraídos en metanol (100%, grado HPLC) a partir de una cantidad conocida de la biomasa liofilizada de SGH1. El extracto filtrado (50 µL) fue inyectado en un cromatógrafo HPLC Shimadzu Hitachi CL-20A, que incluye una columna analítica de fase reversa C18 (Merck 1.50477.0001, LiChrospher 100 RP-18, 5 µm) como fase estacionaria, y eluida con una mezcla acetonitrilo: metanol: agua (85:10:5 v/v), con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min, durante 7 min. Cada fracción separada por el sistema HPLC fue colectada en tubos individuales.

El sistema HPLC, cuenta con un detector de diodos, que permite obtener los tiempos de retención, las absorbancias de cada fracción y las áreas de cada fracción, mediante el uso de programa Xcalibur 2.3 (Thermo Fisher Scientific).

Este procedimiento permitió obtener y colectar las siguientes fracciones de BR purificadas por HPLC: F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ y F₅.

3.2.3.1. Preparación de las fracciones de BR

Las fracciones colectadas en el equipo HPLC fueron transferidas a tubos Eppendorf y los solventes fueron evaporados en un equipo Speedback (Concentrator Plus, Eppendorf AG). El peso de los pigmentos de cada fracción se obtuvo por diferencia de pesaje de los tubos antes y después de la evaporación del solvente.

3.2.4. Cultivo de línea celular THP-1

Un vial con aproximadamente 1 ml con cerca de 1 millón de células THP-1 fue recuperado del sistema de congelación con nitrógeno líquido a -196°C . Este medio de congelación contiene 70% RPMI 1640, 20% suero fetal bovino (FBS) y 10 % Dimetil Sulfoxido (DMSO).

Una vez descongelada, la suspensión celular fue lavado con 10 ml de medio RPMI 1640 + 10% FBS, mezclado por inmersión y centrifugado a 2.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Luego de eliminar el sobrenadante, el pellet fue suspendido en 1 ml de medio fresco a 37°C . Posteriormente, la suspensión fue sembrada en una placa Petri de 60 milímetros conteniendo 5 ml del medio y las células fueron cultivadas en una incubadora con CO_2 a 37°C (Nuair UN-5800E). Usualmente se siembran 100.000 células por ml y no se deja alcanzar más allá de un millón de células por ml. La morfología de las células se visualizó diariamente y cambios de medio fresco se realizaron cada dos días.

3.2.5. Preparación de células THP-1 para ensayos de citotoxicidad y actividad antioxidante

Las evaluaciones de citotoxicidad o de actividad antioxidante se realizaron en medio DMEM FluoroBrite (sin FBS). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, se siembra 100.000 células en 100 μL en cada pocillo (concentración de 1 millón de células por ml) y se mantienen por al menos 8 horas en incubación.

Los tratamientos se realizan con la adición de las moléculas diluidas en 100 μL o 50 μL de medio DMEM FluoroBrite, por lo que la concentración final de las células durante el tratamiento es de 500.000 células por ml.

Las moléculas fluorescentes para la determinación del porcentaje de células vivas y muertas son Ioduro de Propidio (IP) y MitoStatus Red (MTRed). Para la determinación del porcentaje de células que producen radicales libres se utiliza

Dihidroxietidio (DHE). Todas las moléculas se adicionan diluidas en 2 μ L de medio DMEM FluoroBrite.

3.2.6. Evaluación de citotoxicidad y actividad antioxidante de BR por Citometría de Flujo

El citómetro de flujo BD FACSJazz se utilizó para evaluar los ensayos de citotoxicidad y actividad antioxidante en el modelo celular THP-1. Este equipo permite realizar el análisis del comportamiento de poblaciones celulares por medio de detectores que captan la emisión de fluorescencia producida por fluoróforos específicos. Mayores antecedentes sobre este procedimiento experimental están disponibles en el Anexo 4 de esta tesis de pregrado.

3.2.6.1. Evaluación de la actividad citotóxica de los carotenoides de SGH1

La detección de la potencial actividad citotóxica de los carotenoides de la arquea SGH1 sobre monocitos THP-1 se realizó mediante dos tipos de ensayos complementarios. Primero, se usó el fluorocromo ioduro de Propidio (IP) para evaluar la integridad de la membrana citoplasmática de los monocitos y, segundo, se usó el fluorocromo MitoStatus Red para evaluar alteraciones del potencial de membrana de las mitocondrias de los monocitos THP-1. En ambos ensayos se incluyó al antibiótico Antimicina A como una molécula desacoplante que afecta la actividad mitocondrial, lo que consecuentemente activará el proceso de muerte celular.

a) Ensayo de permeabilidad de membrana

La citotoxicidad se evaluó por un ensayo de exclusión de colorante utilizando un compuesto impermeable a la membrana, Ioduro de Propidio (IP) (35). Cuando la membrana celular está dañada, el IP ingresa a las células y se une al DNA y provee fluorescencia (36). Por lo tanto, las células muertas presentan marca para IP, lo que

puede ser cuantificado por citometría de flujo. Se evaluó la actividad citotóxica del extracto metanólico de *Haloterrigena* sp. SGH1 y las fracciones de BR purificadas por HPLC: F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ y F₅. Como control positivo se utilizó 30 μ M Antimicina A, como un inhibidor del complejo III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, de modo que su presencia aumenta el porcentaje de monocitos con membranas citoplasmáticas dañadas y por tanto permeables a IP.

Para el tratamiento, las células se mantuvieron en medio DMEM FluoroBrite por 12 horas. Luego las células fueron incubadas con 0,5% (v/v) metanol (MeOH; control), extracto metanólico (500 μ g/mL), fracciones purificadas F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ o F₅ (500 μ g/mL), 0.3% (v/v) etanol (EtOH; control de Antimicina A) o Antimicina A (30 μ M). Dieciocho horas después del tratamiento, las células se incubaron con 2,4 μ M de IP durante 15 minutos. Las células IP positivas se cuantificaron por citometría de flujo utilizando un haz de láser de 488 nm y un detector de 585 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de células viables. Los ensayos se realizaron en tres experimentos independientes.

b) Ensayo de actividad mitocondrial

La viabilidad celular también se evaluó mediante la cuantificación de células con alto, medio y bajo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$ m). Este parámetro es un indicador de actividad mitocondrial que puede disminuir o perderse en las células que sufren apoptosis o necrosis (37). MitoStatus Red (MTRed) es un colorante catiónico, lipofílico y fluorescente que es fácilmente secuestrado por mitocondrias activas de células sanas, pero no se retiene dentro de las mitocondrias que han perdido su $\Delta\psi$ m (38, 39). Se evaluó la actividad mitocondrial del extracto metanólico de *Haloterrigena* sp. SGH1 y las fracciones de BR purificadas por HPLC: F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ y F₅.

Para el tratamiento, las células se mantuvieron en medio DMEM FluoroBrite por 12 horas. Luego las células fueron incubadas con 0,5% (v/v) metanol (MeOH; control), extracto metanólico (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fracciones purificadas F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ o F₅ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 0.3% (v/v) etanol (EtOH; control de Antimicina A) o Antimicina A (30 μM). Doce horas después del tratamiento, las células se incubaron con 0,8 μM de MTRed durante 15 minutos. Las células MTRed positivas se cuantificaron por citometría de flujo utilizando un haz de láser de 640 nm y un detector de 660 nm.

En función de las intensidades de MTRed, las células se distribuyeron en tres poblaciones diferentes designadas como células THP-1 con $\Delta\psi\text{m}$ bajo, medio o alto. Los resultados se expresaron como porcentaje de células en cada nivel de $\Delta\psi\text{m}$. Los ensayos se realizaron en tres experimentos independientes.

3.2.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante de BR y Fracciones BR

La producción de radicales libres se detectó utilizando la molécula DHE, sensible a la oxidación. Esta molécula se excita a 488 nm y emite fluorescencia a 585 nm (40,41).

La actividad antioxidante se evaluó utilizando Trolox como agente antioxidante y Antimicina A como inductor de la producción de radicales libres por inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones.

Se determinó el curso temporal de la producción de radicales libres generados por Antimicina A. Posteriormente, se determinó la dosis de mínima necesaria de Antimicina A cuyo efecto puede ser revertido por Trolox.

a) Curso temporal de los ensayos de capacidad antioxidante

Para obtener el tiempo de incubación adecuado con Antimicina A, se realizó un curso temporal del ensayo, de modo de obtener la condición óptima de inducción de la producción de ROS en los monocitos THP-1. Las células se mantuvieron en

medio FluoroBrite DMEM por 18 h; cabe resaltar que este medio no contiene Glutación, un antioxidante presente en el medio RPMI 1640. Las células fueron incubadas con 0,75% Etanol (EtOH; control), Antimicina A (75 μ M) por 15 min, 30 min, 1 hora, 1 hora 30 min y 2 horas. Al inicio del tratamiento se adicionó 2 μ L de DHE (0,2 μ M). Las células DHE positivas se cuantificaron por citometría de flujo utilizando un haz de láser de 488 nm y un detector de 585 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de células ROS positivas (ROS+).

b) Estandarización de actividad antioxidante

Las células se mantuvieron en medio FluoroBrite DMEM por 18 horas. Luego, las células fueron preincubadas con Trolox a una concentración de 3 mM por 30 minutos, el reactivo se adicionó en 50 μ L de medio. Posteriormente, se adicionaron 0,5% Metanol (MeOH; control) o Antimicina A a diferentes concentraciones: 75; 37,5; 18,75; 9,38 y 4,69 μ M a todas las células preincubadas con Trolox, los reactivos se adicionaron en 50 μ L de medio. Al inicio del tratamiento con Antimicina A se adiciona 2 μ L de DHE (0,2 μ M) y una hora después se realiza el análisis por citometría. Las células DHE positivas se cuantificaron por citometría de flujo utilizando un haz de láser de 488 nm y un detector de 585 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de células ROS positivas (ROS+).

c). Evaluación de la actividad antioxidante

Para este ensayo se utilizó una concentración de 18,75 μ M de Antimicina A. Las células se mantuvieron en medio Fluobrite DMEM por 18 horas. Luego, las células fueron preincubadas, con 0,5% (v/v) metanol (MeOH; control negativo), Trolox 3 mM (control positivo) extracto metanólico (500 μ g/mL), fracciones purificadas F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ o F₅ (500 μ g/mL), por 30 minutos. Posteriormente, se adiciona Antimicina A 18,75 μ M a todos los pocillos. Al inicio del tratamiento con Antimicina A se adiciona 2 μ L de DHE (0,2 μ M) y una hora después se realiza el análisis por

citometría. Las células DHE positivas se cuantificaron por citometría de flujo utilizando un haz de láser de 488 nm y un detector de 585 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de células ROS positivas (ROS+).

3.2.7. Evaluación del ingreso de BR a monocitos THP-1 mediante Microscopia Confocal

La microscopia confocal es una técnica que se utiliza para obtener imágenes de alta resolución usando fluoróforos específicos que permiten obtener imágenes resaltando organelos, membranas o moléculas (proteínas, receptores de membrana, moléculas de rutas metabólicas, etc.) de manera selectiva según el estudio a realizar. En este trabajo de tesis de pregrado se utilizó el microscopio confocal Leica SP8, para obtener imágenes de fluorescencia mediante el procesamiento DIC (Digital Image Correlation), con el objetivo de evaluar el ingreso de BR del extracto de SGH1 al interior de los monocitos de la línea THP-1. En esta tesis, se utilizó la microscopía confocal ya que evidencias preliminares mostraron que BR era una molécula fluorescente. Además, contrastamos los resultados con imágenes de células incubadas sólo con DHE o con MTRed; ambas moléculas son fluorescentes y permeables a las membranas celulares.

El microscopio confocal Leica SP8 cuenta con cuatro láseres de excitación (Diodo 405, Diodo 638, OP SL 488, OP SL 552), dos detectores de emisión espectrales para fluorescencia (PMT 1 canal 1 570-620 nm; PMT 2 canal 2 650-700 nm) que permiten seleccionar un rango de longitudes de onda para cada detector y además un tercer detector para imágenes DIC (PMT Trans canal de transmisión PMT).

La observación de las células se realizó posterior al ensayo de citometría, con las células vivas. Para determinar si el pigmento ingresa en la célula se obtuvo imágenes en diferentes planos a lo largo de la célula (Z-Stack) de células incubadas solo con el extracto metanólico o fracciones de BR.

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Cultivo de *Haloterrigena* sp. SGH1.

Con el objetivo de disponer de mayor biomasa para los estudios de la arquea SGH1, esta se cultivó en volúmenes mayores de medio y como un primer paso en la futura producción masiva del microorganismo.

La Fig. 6 muestra que SGH1 alcanza la fase estacionaria rápidamente y el cultivo se mantiene estable por varios días. La corta fase lag de los cultivos es consecuencia de que las células estaban pre-adaptadas a las condiciones y al medio de cultivo.

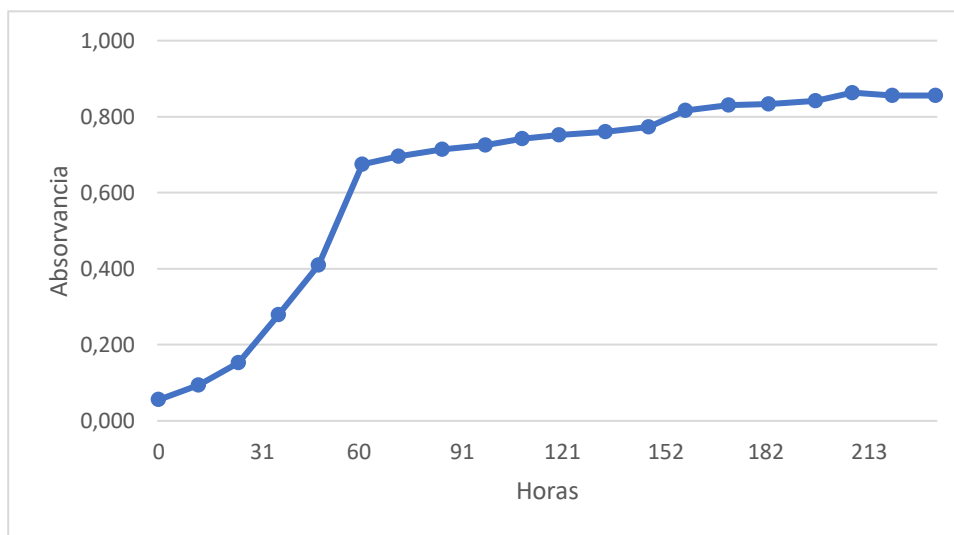


Figura Nº 6. Curva de crecimiento de *Haloterrigena* sp. SGH1. La arquea SGH1 fue cultivada en un biorreactor BER1 con 5 L de medio Z8-MOD y el crecimiento fue monitoreado por absorbancia a 660 nm.

Con el propósito de avanzar en el estudio del escalamiento del cultivo de SGH1, la arquea fue cultivada en diferentes volúmenes de medio de cultivo y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación del crecimiento de Haloterrigena sp. SGH1 en tres volúmenes de medio Z8-MOD. La arquea SGH1 fue cultivada en 400 mL de medio Z8-MOD, en un agitador rotatorio o en 5 y en 10 litros de medio Z8-MOD un biorreactor BER1. El crecimiento fue medido durante la fase de crecimiento exponencial por absorbancia a 660 nm, por un total de 48 h.

| Tiempo (h) | Absorbancia (660 nm) | | |
|------------|----------------------|------|------|
| | 400 mL | 5 L | 10 L |
| 0 | 0.57 | 0.41 | 0.59 |
| 24 | 0.81 | 0.70 | 0.90 |
| 48 | 0.85 | 0.73 | 0.94 |

En los tres volúmenes de cultivo evaluados, la producción de biomasa, expresada como A^{660} , fue similar, de modo que se optó por cultivar la arquea en volúmenes de 10 L para obtener una mayor cantidad de biomasa y su uso en la extracción posterior de carotenoides.

4.1.2. Extracción de BR y espectrograma de absorción

La biomasa de SGH1 fue cosechada, lavada, congelada a -80°C y liofilizada. Los carotenoides totales de SGH1 fueron extraídos con metanol 100%. La Fig. 7 muestra el espectrograma de absorción de un extracto metanólico de SGH1. Las longitudes de onda de máxima absorbancia fueron 524, 490, 462, 388 and 318 nm. El espectro obtenido es el esperado para carotenoides, pero con una tríada de máximos (524, 490 y 462 nm) que caracteriza al carotenoide bacteriorrubrina (5, 14).

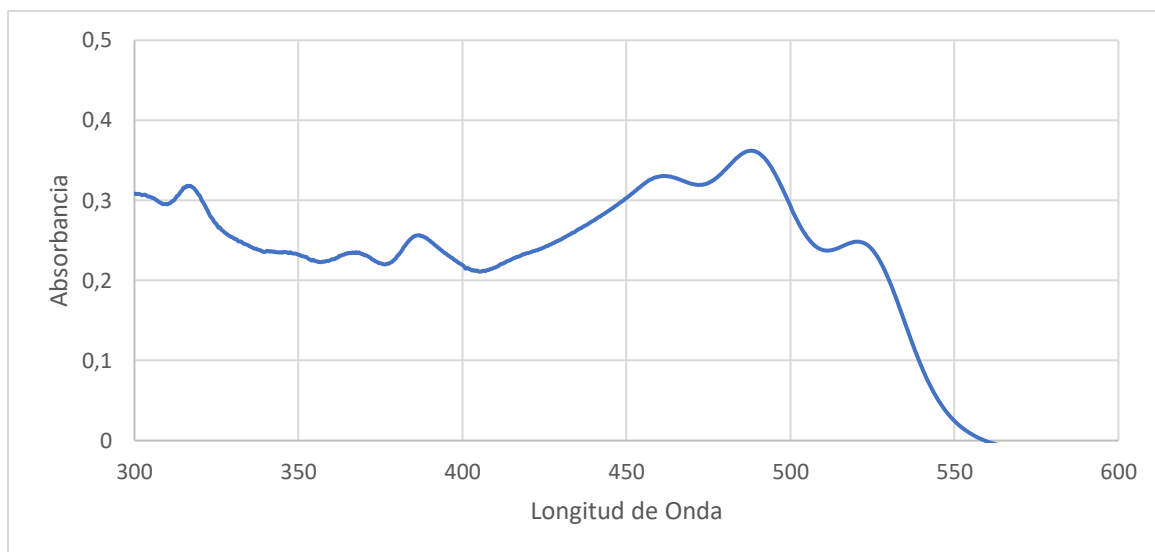


Figura Nº 7. Espectrograma de absorción de un extracto metanólico de *Haloterrigena sp. SGH1*. La biomasa de SGH1 fue extraído con metanol al 100% y el correspondiente espectrograma UV-Vis fue obtenido en un espectrofotómetro Jasco V-730.

4.1.3. Purificación de los componentes del extracto metanólico de *Haloterrigena sp. SGH1*.

Con el propósito de purificar los isómeros ópticos y derivados de BR, alícuotas de extractos metanólicos fueron inyectados en un sistema HPLC Shimadzu Hitachi CL-20A. La Fig. 8 muestra la separación cromatográfica obtenida en la que se observaron seis señales principales de máximos de absorción denominados F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ y F₅, con tiempos de retención aproximados de 2,2; 2,9; 3,3; 3,7; 4,2 y 4,8 min. El máximo inicial en el cromatograma HPLC correspondió al frente del solvente de corrida. Cada una de las fracciones principales fueron colectadas, el solvente fue eliminado por evaporación en un Speedback (Concentrator Plus, Eppendorf AG), resuspendidas en metanol al 100%, a una concentración final de 500 µg/mL y usadas en ensayos de citotoxicidad y actividad antioxidante.

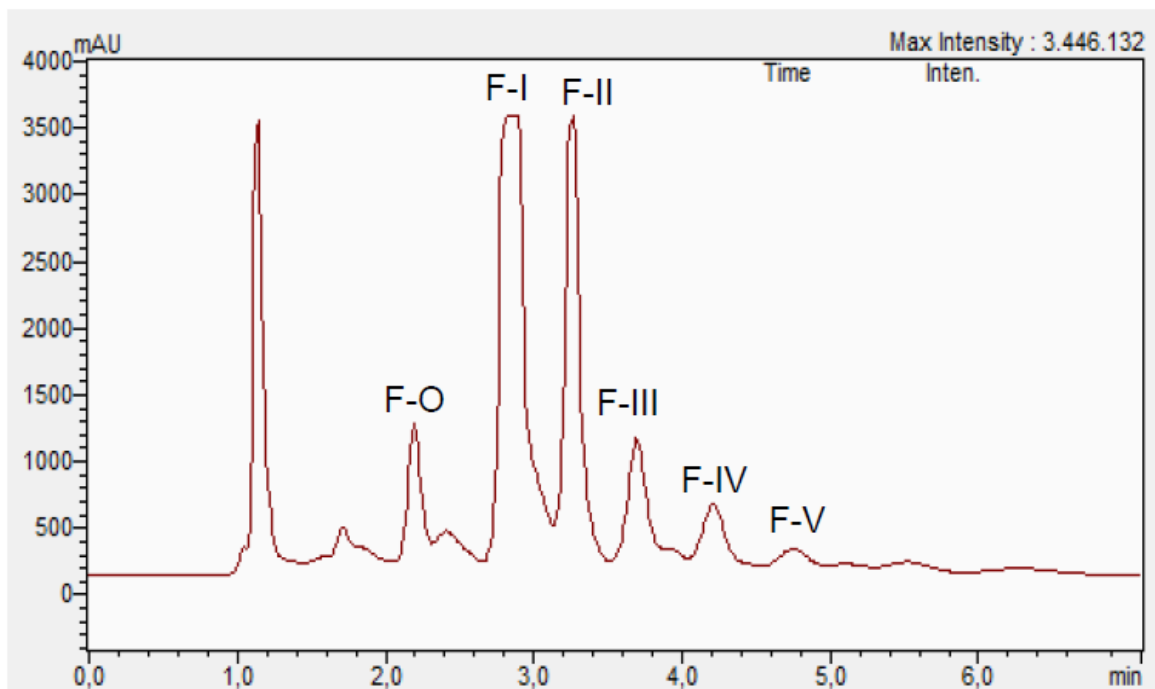


Figura Nº 8 Cromatograma HPLC de un extracto metanólico de *Haloterrigena* sp. SGH1. Una alícuota (50 μ L) del extracto metanólico fue inyectada en un sistema cromatográfico Shimadzu Hitachi CL-20A que incluye una columna analítica de fase reversa C18 (Merck 1.50477.0001, LiChrospher 100 RP-18, 5 μ m). La cromatografía se realizó usando metanol/acetonitrilo/agua (85/10/5 v/v) como solvente de elución.

4.2. Permeabilidad de la membrana celular de monocitos THP-1 frente a BR.

Considerando que previamente se demostró que los carotenoides de SGH1 son moléculas con actividad antioxidante frente a radicales libres en ensayos FRAP y ABTS *in vitro* (5,14,19), este efecto antioxidante al interior celular no ha sido evaluado hasta ahora. Por tanto, en este trabajo se estudió la actividad antioxidante intracelular y la citotoxicidad de los carotenoides de SGH1 en los monocitos THP-1.

Para ello fue necesario responder primero si la membrana citoplasmática de las células THP1 es permeable a los carotenoides de SGH1 y, por tanto, ingresar a los monocitos.

4.2.1. Fluorescencia de los carotenoides de *Haloterrigena* sp SGH1.

Considerando que a fines del siglo pasado se demostró que BR purificada de la bacteria *Micrococcus roseus* era una molécula fluorescente en diferentes solventes orgánicos (16-18), en esta tesis se consideró necesario demostrar que las moléculas de BR extraídas de la arquea son fluorescentes. Para ello, se utilizó la citometría de flujo; esta técnica requiere que la biomolécula en estudio, los carotenoides, esté asociada a partículas que el citómetro pueda reconocer, como es el caso de los monocitos THP-1. La Fig. 9 muestra, en una escala logarítmica, la emisión de fluorescencia de los monocitos THP-1 en ausencia o presencia del extracto metanólico de la arquea SGH1. La Fig. 9a muestra un gráfico dot-plot con la selección de la población de monocitos estudiada. Luego, la Fig. 9b es un histograma que señala que el mayor número de monocitos emiten 10 unidades de fluorescencia (585 nm). Sin embargo, la emisión de fluorescencia de la mayoría de los monocitos incubados con los carotenoides de SGH1, se desplaza a valores cercanos a 100 unidades de fluorescencia. En consecuencia, la citometría de flujo permitió demostrar que los carotenoides de SGH1 son moléculas fluorescentes. Sin embargo, la asociación de los carotenoides puede ser externa a la célula o estar en

su interior. Los siguientes estudios, permitieron definir cuál es el tipo de asociación entre carotenoides y monocitos.

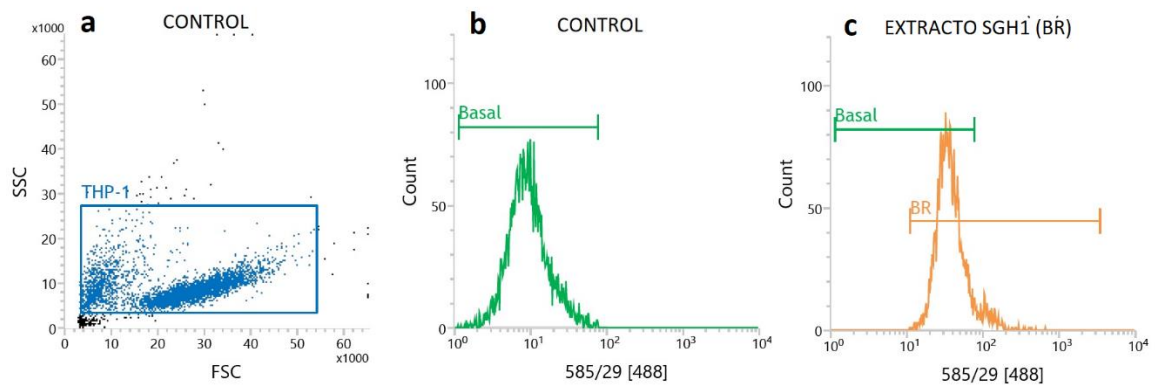


Figura 9. Evidencia sobre la fluorescencia de BR asociada a monocitos THP-1. Los monocitos THP-1 fueron incubados en ausencia o presencia del extracto metanólico de SGH1 (500 $\mu\text{g/mL}$), durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo (luz de excitación: 488 nm; luz de emisión: 585 nm). **a:** gráfico dot-plot señalando la población de monocitos en estudio. **b:** histograma de fluorescencia de los monocitos sin adiciones. **c:** Histograma de fluorescencia de los monocitos THP-1 en presencia de los carotenoides SGH1.

4.2.2. ¿Es la membrana celular de los monocitos THP-1 permeable a los carotenoides de la arqueas SGH1?

Ya que BR es un carotenoide fluorescente (16-18; ver Resultados: Sección 4.2.1), se comparó el ingreso de los carotenoides SGH1 al interior de los monocitos THP-1 con dos moléculas fluorescentes, DHE y MTRed, las que se ha demostrado que ingresan a monocitos (38-41).

La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos. Luego de ser incubadas con el extracto de SGH1 o con los fluorocromos, las células THP-1 fueron observadas bajo un microscopio confocal que permite obtener imágenes en diferentes planos y profundidad del interior celular. La señal fluorescente es una indicación que la

molécula ingresó a la célula. Así, los carotenoides de la arquea SGH1 son moléculas fluorescentes que ingresan al interior de los monocitos THP-1 (Fig. 10 BR), al igual que los fluorocromos DHE y MTRed (Fig. 10 DHE y 10 MTRed).

En base a esta evidencia, se realizaron experimentos para evaluar la actividad citotóxica y antioxidante *in vivo* de los carotenoides de la arquea *Haloterrigena* sp. SGH1 en monocitos THP-1.

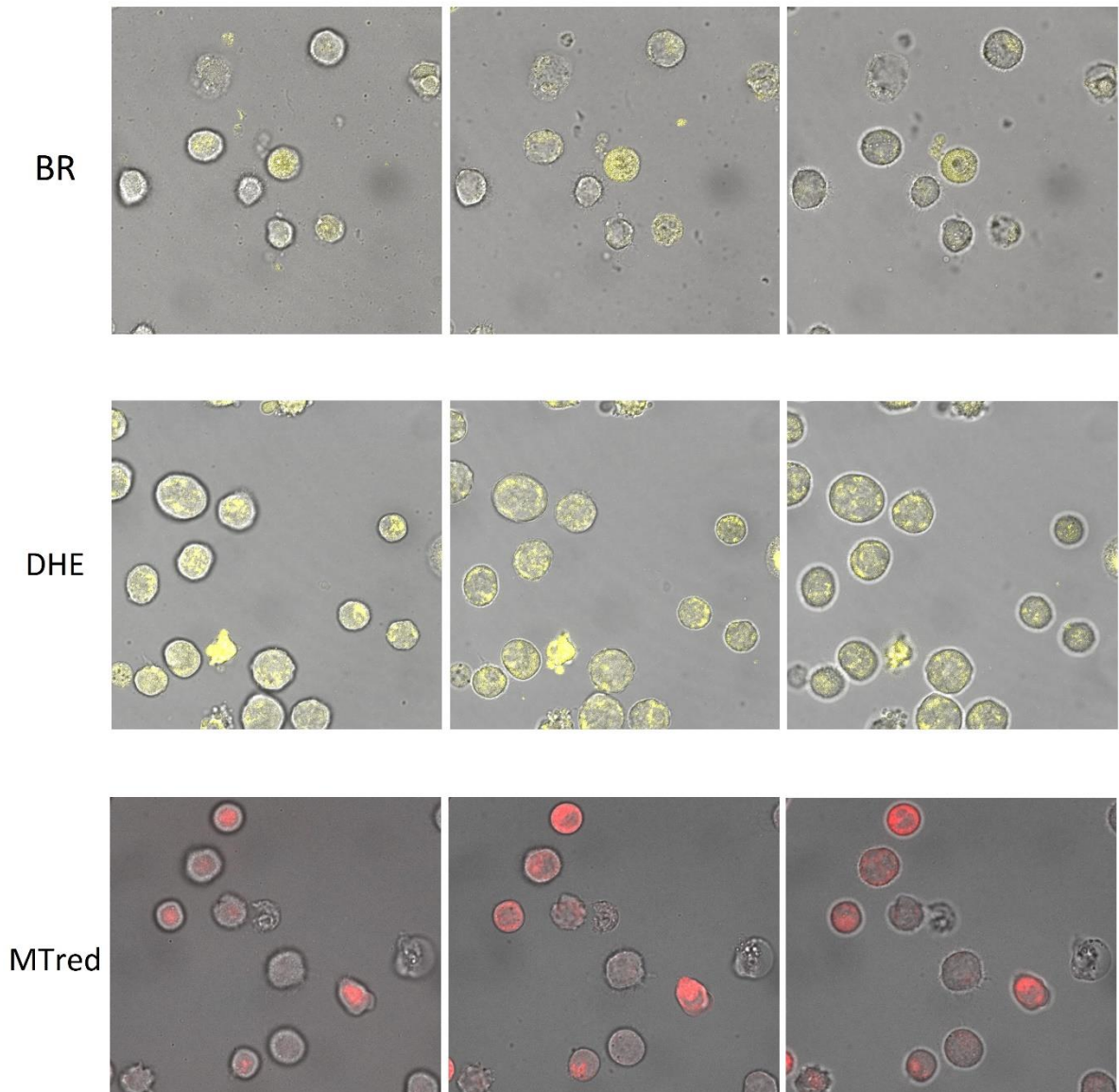


Figura Nº 10. Ingreso de moléculas fluorescentes a los monocitos THP-1. Células THP-1 fueron suspendidas en medio de cultivo Fluorobrite e incubadas con el extracto metanólico de la arquea SGH1 (BR), con dihidroetidio (DHE) o MitoStatus Red (MTRed) durante 30 min, a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal Leica SP8 para obtener de imágenes digitales en diferentes planos (“Z-stack”). Las células fueron excitadas con luz laser de 488 nm y la fluorescencia fue detectada a 582 nm, en las células incubadas con BR o DHE; la fluorescencia de células tratadas con MTRed fue detectada a 680 nm luego de la excitación con luz de 620 nm. En cada serie de fotografías, se muestran tres imágenes obtenidas secuencialmente durante el análisis DIC/Z-Stack, con células THP-1 a tres diferentes profundidades, donde se observa el ingreso a las células de las moléculas fluorescentes.

4.3. Ensayos de efecto citotóxico de carotenoides de SGH1 en la línea celular THP-1.

Con el objetivo de determinar si el extracto metanólico de SGH1 y las fracciones colectadas por HPLC son tóxicas a las células humanas THP-1, se realizaron dos tipos de ensayos: primero, ensayos de efecto sobre la permeabilidad de la membrana citoplasmática y segundo, ensayos sobre la actividad mitocondrial.

Estos dos tipos de ensayos se cuantificaron por citometría de flujo y los resultados se representan como gráficos dot-plot e histogramas. Primero, el eje Y (“side scatter” o SSC) en los gráficos dot-plot indica valores que informan sobre el grado de similitud en complejidad celular (forma y estructura de núcleos y organelos en las poblaciones celulares) y el eje X (“forward scatter” o FSC) que indica volumen celular, permitiendo al observador discriminar subpoblaciones. Segundo, los gráficos de histogramas incluyen un eje Y que informa sobre “counts” o número de células, y el eje X es una escala logarítmica de la señal fluorescente emitida por el fluorocromo usado, luego de ser excitado por luz laser. Las longitudes de onda de la luz de excitación y de emisión se muestran en cada uno de los histogramas.

4.3.1. Ensayo de citotoxicidad de carotenoides SGH1 sobre la permeabilidad de las membranas de los monocitos THP-1.

Con el propósito de evaluar la actividad citotóxica de los extractos metanólicos de *Haloterrigena* sp. SGH1 y las fracciones de BR purificadas por HPLC (F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ y F₅), se realizaron ensayos de exclusión de Ioduro de Propidio (IP), en presencia o ausencia de los carotenoides de SGH1. IP es un fluoróforo que sólo ingresa a las células cuando sus membranas están dañadas, genera una señal fluorescente que se activa al unirse a moléculas con grupos aminos; por ejemplo, ácidos nucleicos y, por tanto, permite discriminar entre células intactas y dañadas en la población celular en estudio (35, 36). El nivel de la señal fluorescente es una medida de la

presencia de células intactas o viables en la población de monocitos. Las células muertas presentan una señal de fluorescencia intensificada para IP, lo que puede ser cuantificado por citometría de flujo a 585 nm.

Anteriormente, se indicó que los carotenoides de la arquea SGH1 ingresan al interior de los monocitos THP-1 (ver Fig. 10), y emiten una señal de fluorescencia registrada por citometría de flujo (ver Fig. 9). En las condiciones usadas en estos experimentos, se observó que la adición de los carotenoides de SGH1 y marcadores fluorescentes IP o DHE, aumenta el número de monocitos con alta fluorescencia a la longitud de onda emisión de 585 nm. Adicionalmente, es importante mencionar que la intensidad de la señal fluorescente de los carotenoides de SGH1 es menor a la generada por el marcador fluorescente IP, de origen comercial. Esto se puede confirmar al comparar las señales fluorescentes en la Fig. 9c y Fig. 11c.

La evaluación de la viabilidad de los monocitos THP-1 en presencia de los carotenoides de SGH1, medida por exclusión del cromóforo IP, se realizó en triplicado.

La Fig. 11 es un ejemplo de los resultados obtenidos en los ensayos realizados en un experimento. Para el análisis de las subpoblaciones de monocitos por citometría de flujo, se utilizó un código de colores para identificar la subpoblación de células intactas (azul), dañadas IP+ (amarillo) y muertas IP++ (rojo). Debido al daño estructural, las denominadas células muertas presentan un mayor ingreso del marcador IP y, por tanto, mayor intensidad de la señal fluorescente.

Además, es interesante comparar los perfiles de intensidades de fluorescencia basal de los monocitos controles (Fig. 11b), los incubados con el marcador IP (Fig. 11c) o con los carotenoides de SGH1 (Fig. 11g). Sólo en presencia de los carotenoides se observó una migración del perfil de fluorescencia basal hacia

valores más altos, como se puede corroborar al analizar las unidades de fluorescencia en el rango 1-100, en las abscisas de los histogramas.

La Fig. 11a (“Dot-plot”) corresponde al control experimental que entrega una visión de la población de células THP-1, tanto en complejidad celular (eje y: SSC) como en volumen (eje X: FSC), incubadas sin 2,4 μ M IP, en medio Fluobrite DMEM.

La Fig. 11b representa, en la forma de un histograma, a la población de células THP-1 mostradas en la Fig. 11a. Comparativamente, la Fig. 11c muestra la distribución de las poblaciones de THP-1 en presencia del fluoróforo IP, indicando que las células intactas (azul) son mayoritarias con respecto a células IP+ o dañadas (amarillo) y muertas (rojo).

En este estudio, se usó 30 μ M Antimicina A como agente citotóxico para comparar su efecto en viabilidad celular de monocitos THP-1 con el de los carotenoides de SGH1. Antimicina A es un antibiótico soluble en etanol, actúa como inhibidor de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, aumenta la producción de radicales libres y es usado para causar daño oxidativo y posterior muerte celular. Los histogramas de las Fig. 11d y 11e permitieron comparar el efecto de la incubación de monocitos con etanol más IP (Fig. 11d) y Antimicina A más etanol más IP (Fig. 11e en viabilidad de células THP-1). Etanol no afectó la viabilidad celular al presentar un histograma prácticamente idéntico al de la Fig. 11c, de modo que las poblaciones de células intactas y dañadas son esencialmente idénticas en presencia o ausencia de etanol. En cambio, el efecto de Antimicina A (Fig. 11e) se observó como una evidente disminución en la población de células intactas o basales (azul) y un incremento paralelo en células dañadas (amarillo) y muertas (rojo), como se esperaba para el efecto del antibiótico.

Ya que las fracciones HPLC de BR están disueltas metanol, fue necesario estudiar el efecto de metanol en la viabilidad celular de THP-1. La Fig. 11f muestra el

correspondiente histograma de la población de células THP-1 incubadas con IP más metanol, que es idéntico a lo observado en los controles con IP (Fig. 11c) y con IP más etanol (Fig. 11d). De este modo, los solventes metanol y etanol no afectan la viabilidad celular de los monocitos THP-1, bajo las condiciones experimentales usadas.

En presencia del extracto metanólico de SGH1, más el marcador IP, el perfil de fluorescencia basal (azul) de los monocitos fue modificado. Se observó que la población de monocitos se desplazó hacia valores de fluorescencia mayores (ver marcación en amarillo en Fig. 11g). De acuerdo con la información obtenida anteriormente (Fig. 9), este incremento en el número de células con mayor fluorescencia es consecuencia del ingreso de los carotenoides del extracto metanólico de SGH1 al interior celular y no es causado por el marcador IP. Esto se analizará en detalle en la sección Discusión de esta tesis. Además, el efecto detectado con el extracto metanólico de SGH1 no se observó al incubar los monocitos con las fracciones de los carotenoides purificados por HPLC (Fig. 11h-m). La incubación de los monocitos con IP más los carotenoides SGH1 no afectó sustantivamente la población de células muertas (rojo).

El análisis cuantitativo de los resultados de las tres replicas se resume en la Tabla 3, que incluye los promedios \pm desviación estándar para las tres subpoblaciones celulares (células basales, células IP+ y células muertas).

Cuantitativamente, el efecto citotóxico de Antimicina A sobre monocitos THP-1 se reflejó en una disminución de un 40% de la población de células basales y un incremento en las poblaciones de células IP+ y muertas de 2,8 veces y 2,7 veces, respectivamente, en relación con el Control EtOH (Tabla 3).

El efecto del extracto metanólico SGH1 sobre la población de células THP-1, con relación al Control MeOH, fue una disminución del 25% y 43% de las células

basales y muertas, respectivamente. Además, se observó un incremento de 5,5 veces en la población de células IP+ (Tabla 3).

Finalmente, al comparar los porcentajes de monocitos del Control MeOH con los obtenidos luego de incubar las células THP-1 con las fracciones F₀ a F₅, se observaron cambios menores en la población de células basales (desde 80% a 76-85%); sin embargo, el mayor efecto se registró en las poblaciones de células IP+ (desde 6% hasta 11-17%). Las fracciones F₀-F₅ produjeron una disminución en la subpoblación de células muertas desde un 14% a 4-8%.

Alternativamente, el efecto de los carotenoides de SGH1 en la viabilidad celular de los monocitos se muestran en la forma de un gráfico de barras (Fig. 12) que incluyen las correspondientes desviaciones standard.

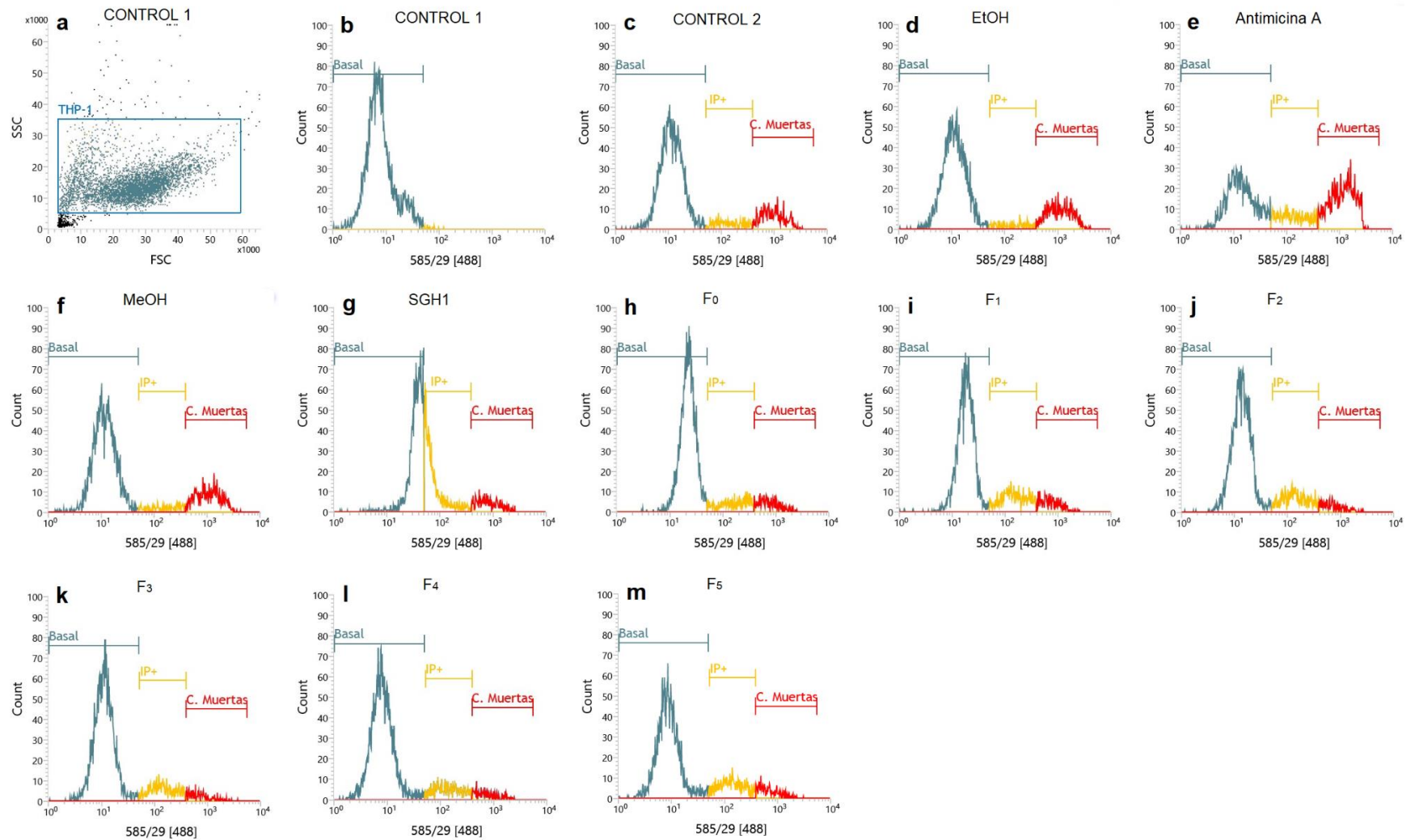


Figura N° 11 Ensayos de permeabilidad de membrana de monocitos THP-1 incubados con diferentes fracciones de BR y Ioduro de Propidio. Los resultados se expresan como histogramas obtenidos por citometría de flujo (BD FACSJazz), donde el eje Y (*counts*) y el eje X representan el número de células y la intensidad de la señal fluorescente, respectivamente. Control 1: dot-plot de THP-1 sin Ioduro de Propidio y su correspondiente histograma; Control 2: THP-1 más Ioduro de Propidio.

Tabla 3. Viabilidad de monocitos THP-1 en base a ensayos de permeabilidad de membrana. Las células THP-1 fueron incubadas, en tres experimentos independientes, con carotenoides de la arquea SGH1 (SGH1: extracto metanólico; F₀ a F₅: fracciones del extracto separadas por HPLC), con 30 μ M Antimicina A o los solventes orgánicos usados. Todos los ensayos se realizaron en presencia del fluorocromo ioduro de Propidio, durante 30 min. Los resultados de viabilidad celular de monocitos THP-1 se muestran como los promedios más la desviación estándar.

| Población (%) | Control | EtOH | MeOH | Antimicina A | SGH1 | F ₀ | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₄ | F ₅ |
|-----------------|------------|------------|------------|--------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Basal | 81 \pm 2 | 81 \pm 4 | 80 \pm 3 | 47 \pm 4 | 60 \pm 5 | 78 \pm 6 | 76 \pm 3 | 81 \pm 4 | 84 \pm 3 | 85 \pm 3 | 82 \pm 5 |
| IP+ | 6 \pm 1 | 5 \pm 1 | 6 \pm 1 | 14 \pm 3 | 33 \pm 3 | 13 \pm 4 | 17 \pm 2 | 15 \pm 3 | 13 \pm 2 | 11 \pm 2 | 13 \pm 4 |
| Celulas Muertas | 13 \pm 3 | 15 \pm 4 | 14 \pm 4 | 40 \pm 4 | 8 \pm 2 | 8 \pm 2 | 7 \pm 1 | 5 \pm 1 | 4 \pm 1 | 4 \pm 1 | 5 \pm 1 |

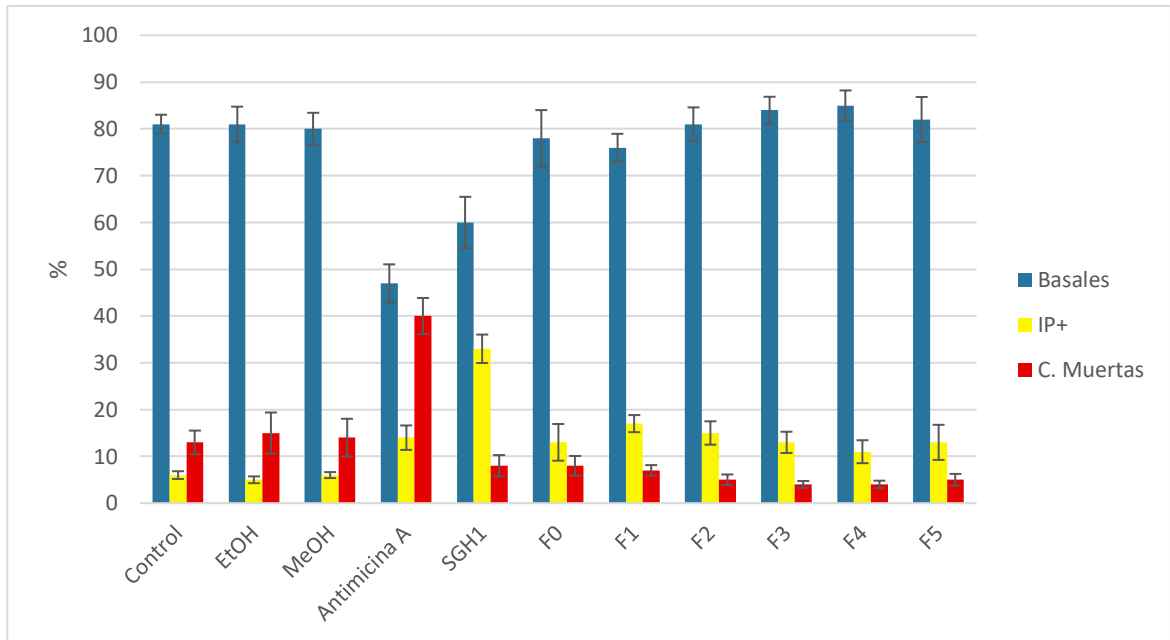


Figura Nº 12. Distribución de los monocitos THP-1 en subpoblaciones de células basales, IP+ y muertas por efecto de los carotenoides de la arquea SGH1. Las células THP-1 fueron incubadas, en tres experimentos independientes, con carotenoides de la arquea SGH1 (SGH1: extracto metanólico; F₀ a F₅: fracciones del extracto separadas por HPLC), con 30 µM Antimicina A o los solventes orgánicos usados. Todos los ensayos se realizaron durante 30 min, en presencia del fluorocromo yoduro de Propidio. Los resultados de viabilidad celular de monocitos THP-1 se muestran como los promedios más la desviación estándar.

4.3.2. Ensayos de viabilidad de monocitos THP-1 en base a actividad mitocondrial.

Como alternativa experimental para la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólico de la arquea SGH1 y las correspondientes fracciones de BR purificadas por HPLC, se realizaron ensayos para evaluar el efecto del extracto y las fracciones sobre el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en presencia de MitoStatus Red (MTRed), un colorante catiónico, lipofílico y fluorescente, que sólo es capturado por las mitocondrias activas de células funcionales (38,39,59). En este tipo de ensayos, la señal fluorescente de MTRed permite discriminar entre tres tipos de poblaciones de monocitos THP-1: células con alto, medio y bajo $\Delta\psi_m$, indicando así la diferencia en la capacidad metabólica (bioenergética) de las mitocondrias de cada población.

Esta aproximación experimental se realizó en tres experimentos independientes. La Fig. 13 resume los ensayos de uno de ellos donde se evaluó el efecto citotóxico de los carotenoides de la arquea SGH1 en monocitos THP-1. Para optimizar la interpretación de los resultados, se utilizó un código de colores para identificar las subpoblaciones de monocitos THP-1 con alto (amarillo), medio (verde) y bajo (rojo) $\Delta\psi_m$.

La Fig. 13a (gráfico “dot-plot”; control), y su correspondiente histograma (Fig. 13b), corresponde a un ensayo control que proporciona una visión de la población de monocitos en el medio de cultivo luego de 15 min de incubación en presencia del cromóforo MTRed, sin otra adición. El recuadro mostrado en Fig. 13a se utiliza para identificar a la población celular THP-1 y separarla de la zona con residuos celular. El histograma del Control (Fig. 13b) indicó que la gran mayoría de los monocitos poseen alto $\Delta\psi_m$. En oposición, el efecto del antibiótico Antimicina A (Fig. 13d) aumentó la subpoblación de monocitos de medio y bajo $\Delta\psi_m$, a expensas de la

disminución de la población de células con alto $\Delta\psi_m$, en comparación al efecto inocuo del solvente etanol (Fig. 13c). El efecto de la adición del extracto SGH1 a monocitos fue parcialmente similar al efecto del antibiótico (Fig. 13f); esto es, la población de alto potencial prácticamente desaparece y el mayor aumento se observó en la población de células con medio y bajo potencial. Finalmente, el efecto de las fracciones de carotenoides F_0 a F_5 (Fig. 13g-m) se puede resumir como un enriquecimiento de la población con potencial medio, a expensas de la población de alto potencial, en comparación con el control metanol (Fig. 13e).

Tal como se mencionó anteriormente, La Fig. 13 muestra los resultados de uno de tres experimentos. En consecuencia, la Tabla 4 resume los resultados de los tres experimentos independientes, expresados como porcentajes promedios \pm sus correspondientes desviaciones standard, para las poblaciones de monocitos con alto, medio y bajo potencial de membrana mitocondrial.

En promedio, el porcentaje de la población de células de alto potencial de membrana disminuye en aproximadamente un 75% en presencia de Antimicina A (desde $77\% \pm 1$ hasta $18\% \pm 12$). Un efecto similar se observó con la incubación de los monocitos con el extracto SGH1 (desde $80\% \pm 2$ hasta $22\% \pm 21$). También, el antibiótico aumentó en cerca de tres veces los porcentajes de las poblaciones de monocitos de potencial medio (desde $4\% \pm 1$ hasta $19\% \pm 2$) y monocitos de bajo potencial ($20\% \pm 2$ hasta $62\% \pm 11$). Tanto el extracto metanólico de SGH1 como las fracciones F_0 a F_5 , afectaron la distribución de las poblaciones de monocitos aumentando la subpoblación con potencial medio en cerca de 15-21 veces, mientras que la subpoblación de bajo potencial aumento sólo 1-2 veces (al considerar las fracciones de menor y mayor efecto) (Tabla 4). La Fig. 14 muestra una presentación alternativa de los resultados mostrados en Tabla 4, en la forma de un gráfico de barras.

Los estudios de citotoxicidad de los carotenoides de la arquea SGH1 sobre monocitos THP-1, medida como cambios en el potencial de membrana de las mitocondrias, sugiere que el efecto más importante de los pigmentos carotenoides fue el enriquecer la población de células THP-1 en células con un $\Delta\psi_m$ medio. La importancia de estos resultados es abordada en el Capítulo 5. Discusión, de esta tesis.

Finalmente, los resultados obtenidos en estos estudios en triplicado mostraron promedios con altas desviaciones standard. Esta variabilidad en el resultado de los efectos de los carotenoides de SGH1 sobre el potencial de membrana de las mitocondrias de los monocitos THP-1 se puede comprobar al observar los gráficos dot-plot (Fig. 15) obtenidos por citometría de flujo en los ensayos diseñados para evaluar el efecto de Antimicina A, etanol, metanol, extracto metanólico SGH1 y las fracciones F₀ a F₅, en la viabilidad de monocitos. La Fig. 15 presenta los gráficos dot-plot obtenidos por citometría de flujo donde se observa la variabilidad en la distribución de tres poblaciones de monocitos THP-1 en base a los cambios en potencial de membrana (alto, medio o bajo) medidos por fluorescencia. Así, el origen de las desviaciones estándares obtenidas (ver Tabla 4 y Fig. 14), es consecuencia del error experimental implicado en la medición de potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo en la línea celular de monocitos THP-1 y, además, en el número de replicas experimentales usadas en este estudio.

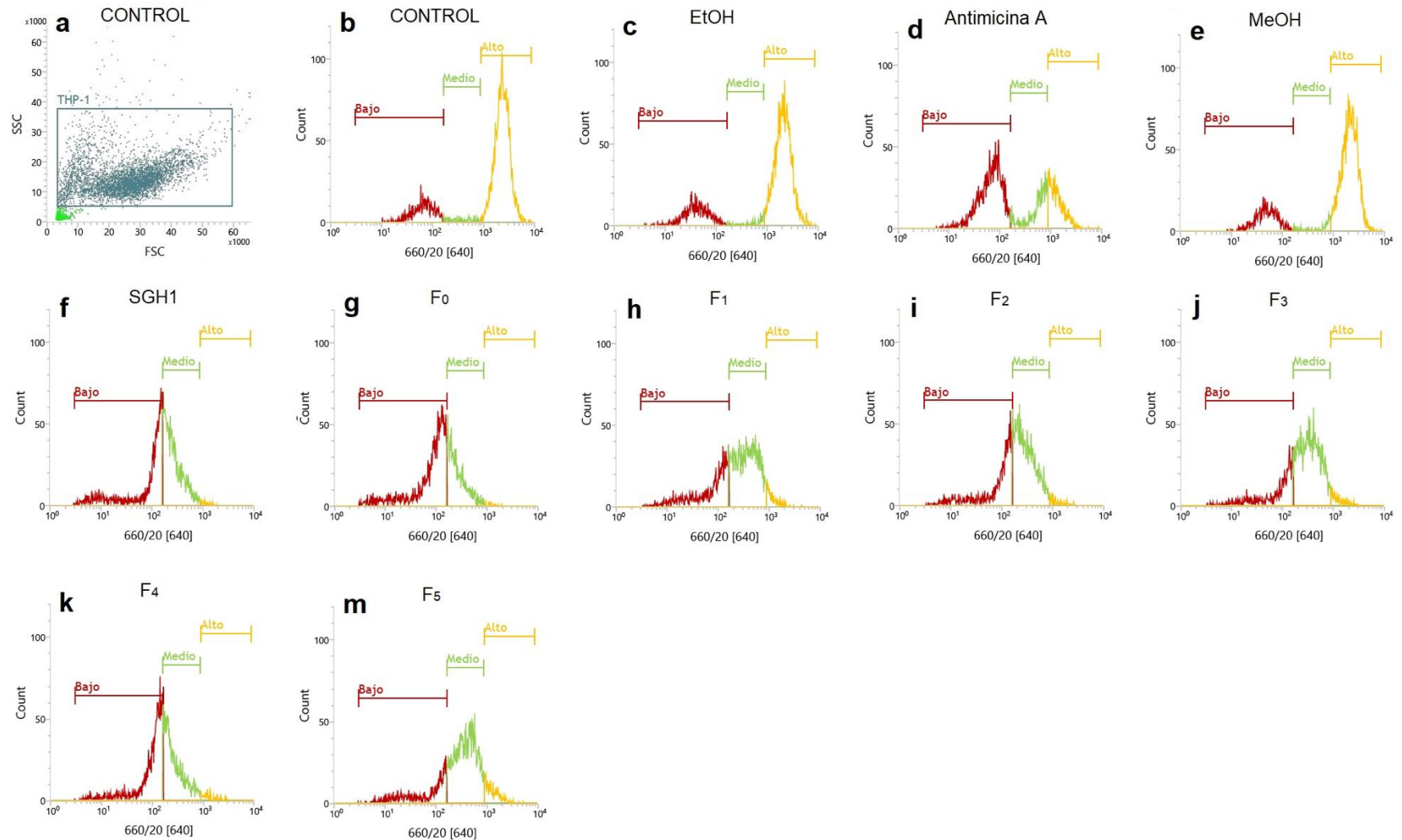


Figura N° 13. Efecto de los carotenoides de *Haloterrigena* sp. SGH1 en el potencial de membrana mitocondrial de monocitos THP-1. Todos los ensayos se realizaron en presencia de células THP-1 y 0,8 μ M del fluoróforo MTRed, durante 15 min, en presencia o ausencia de carotenoides de la arquea SGH1. Los resultados muestran la distribución de los monocitos THP-1 en tres subpoblaciones de alto (amarillo), medio (verde) y bajo (rojo) potencial de membrana mitocondrial. Control: THP-1; EtOH: etanol; Antimicina A: 30 μ M; MeOH: metanol; SGH1: extracto metanólico; F₀-F₅: fracciones HPLC.

Tabla 4. Viabilidad de monocitos THP-1 en base a ensayos de medición del potencial de membrana mitocondrial.

El efecto del extracto metanólico de la arquea SGH1, de las fracciones del extracto separadas por HPLC, de 30 μ M Antimicina A y los solventes orgánicos, sobre el potencial de membrana mitocondrial (como medida de la viabilidad de los monocitos THP-1), se presenta como promedio del porcentaje y desviación estándar para las tres subpoblaciones de monocitos, realizado en triplicado. Todos los ensayos de incubación se realizaron en presencia de células THP-1 y 0,8 μ M del fluoróforo MTRed, durante 15 min, en presencia o ausencia de carotenoides de la arquea SGH1. El fluorocromo MTRed es una molécula cuya fluorescencia a 660 nm es dependiente del potencial de la membrana mitocondrial de los monocitos. La citometría de flujo permite discriminar porcentualmente a las poblaciones de células THP-1 con alto, medio o bajo $\Delta\psi_m$. Control: THP-1; EtOH: etanol; Antimicina A: 30 μ M; MeOH: metanol; SGH1: extracto metanólico; F0-F5: fracciones HPLC.

| Actividad Mitocondrial (%) | Control | EtOH | MeOH | Antimicina A | SGH1 | F ₀ | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₄ | F ₅ |
|----------------------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Alto $\Delta\psi_m$ | 80 \pm 1 | 77 \pm 1 | 80 \pm 2 | 18 \pm 12 | 22 \pm 21 | 16 \pm 12 | 15 \pm 11 | 7 \pm 7 | 5 \pm 5 | 21 \pm 15 | 20 \pm 13 |
| Medio $\Delta\psi_m$ | 3 \pm 0 | 4 \pm 1 | 3 \pm 1 | 19 \pm 2 | 50 \pm 10 | 51 \pm 12 | 62 \pm 12 | 63 \pm 8 | 54 \pm 28 | 46 \pm 5 | 53 \pm 13 |
| Bajo $\Delta\psi_m$ | 17 \pm 1 | 20 \pm 2 | 17 \pm 2 | 62 \pm 11 | 29 \pm 14 | 34 \pm 21 | 24 \pm 9 | 31 \pm 15 | 41 \pm 32 | 34 \pm 18 | 27 \pm 17 |

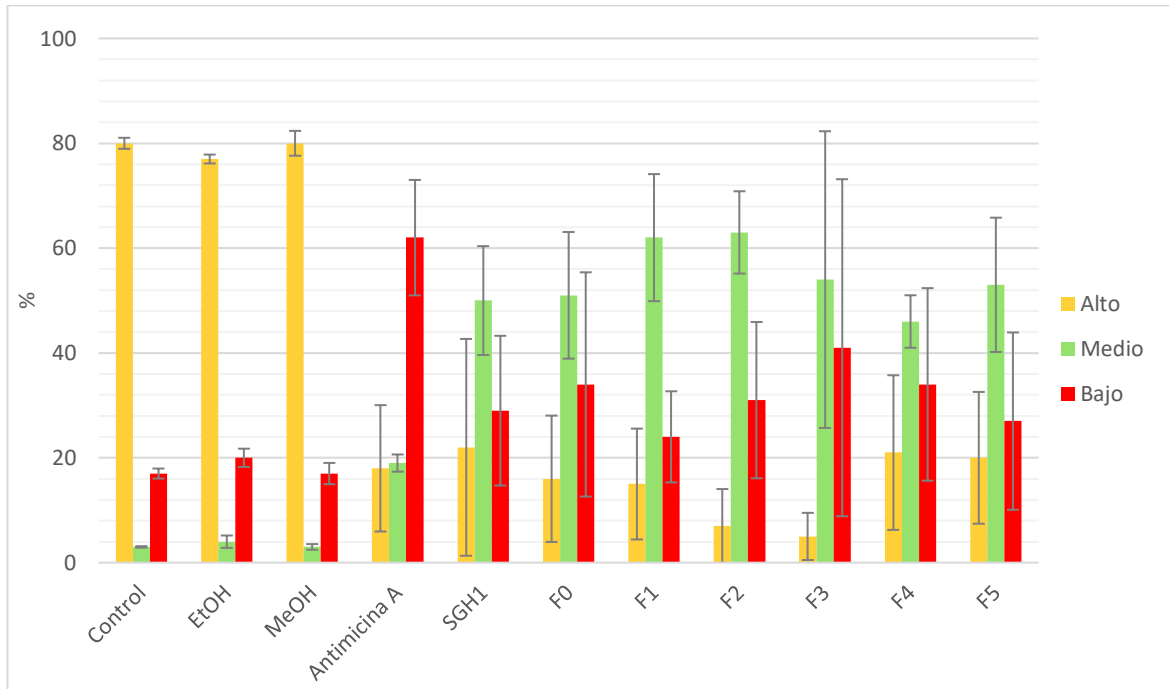
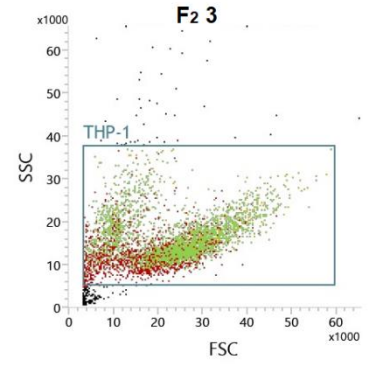
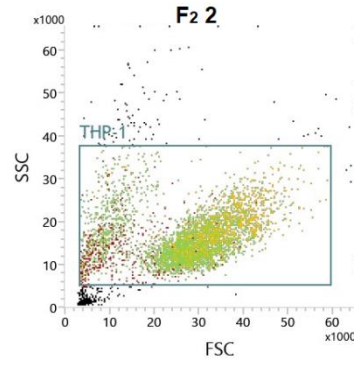
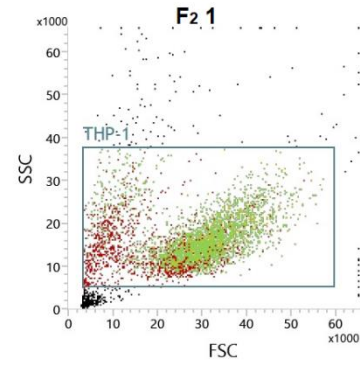
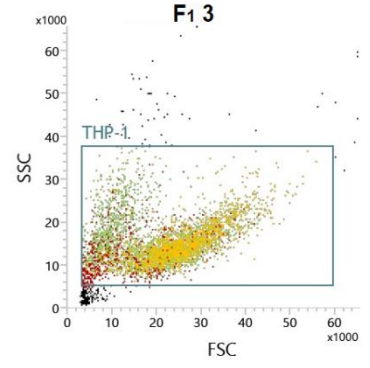
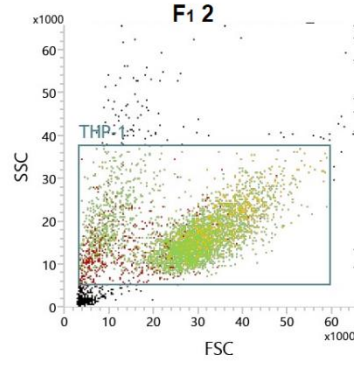
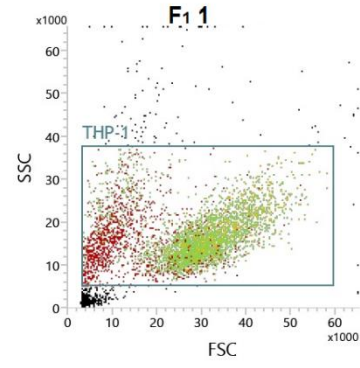
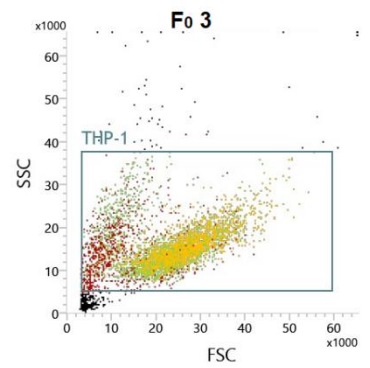
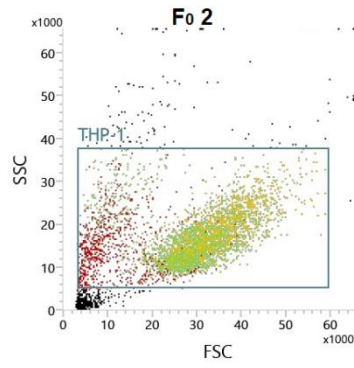
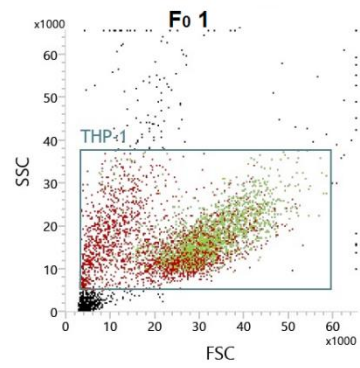
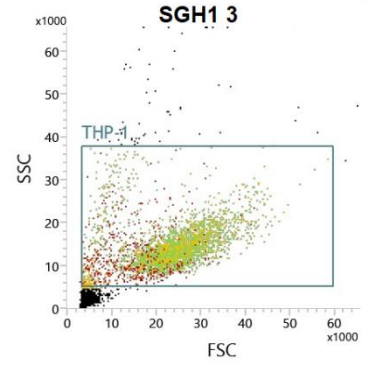
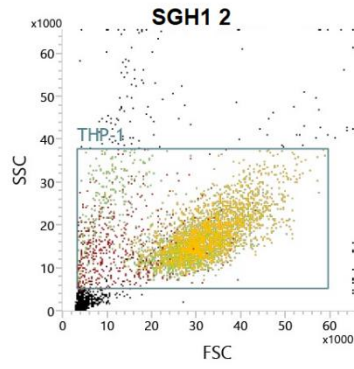
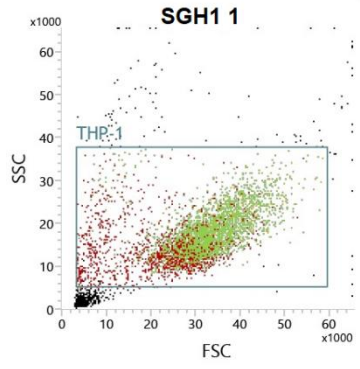


Figura Nº 14. Efecto de los carotenoides de SGH1 en la distribución de las subpoblaciones de monocitos de acuerdo con el potencial de membrana mitocondrial. Los monocitos fueron incubados durante 15 min con 0,8 μ M de MTRed, en ausencia o presencia de carotenoides de la arquea SGH1, 30 μ M de Antimicina A o solventes orgánicos. Las subpoblaciones de monocitos con alto, medio o bajo potencial de membrana fueron seleccionadas en base a la fluorescencia medida por citometría de flujo. Los resultados de tres experimentos se muestran como promedio del porcentaje y desviación estándar. Control: THP-1; EtOH: etanol; Antimicina A: 30 μ M; MeOH: metanol; SGH1: extracto metanólico; F₀–F₅: fracciones HPLC.

Experimento 1

Experimento 2

Experimento 3



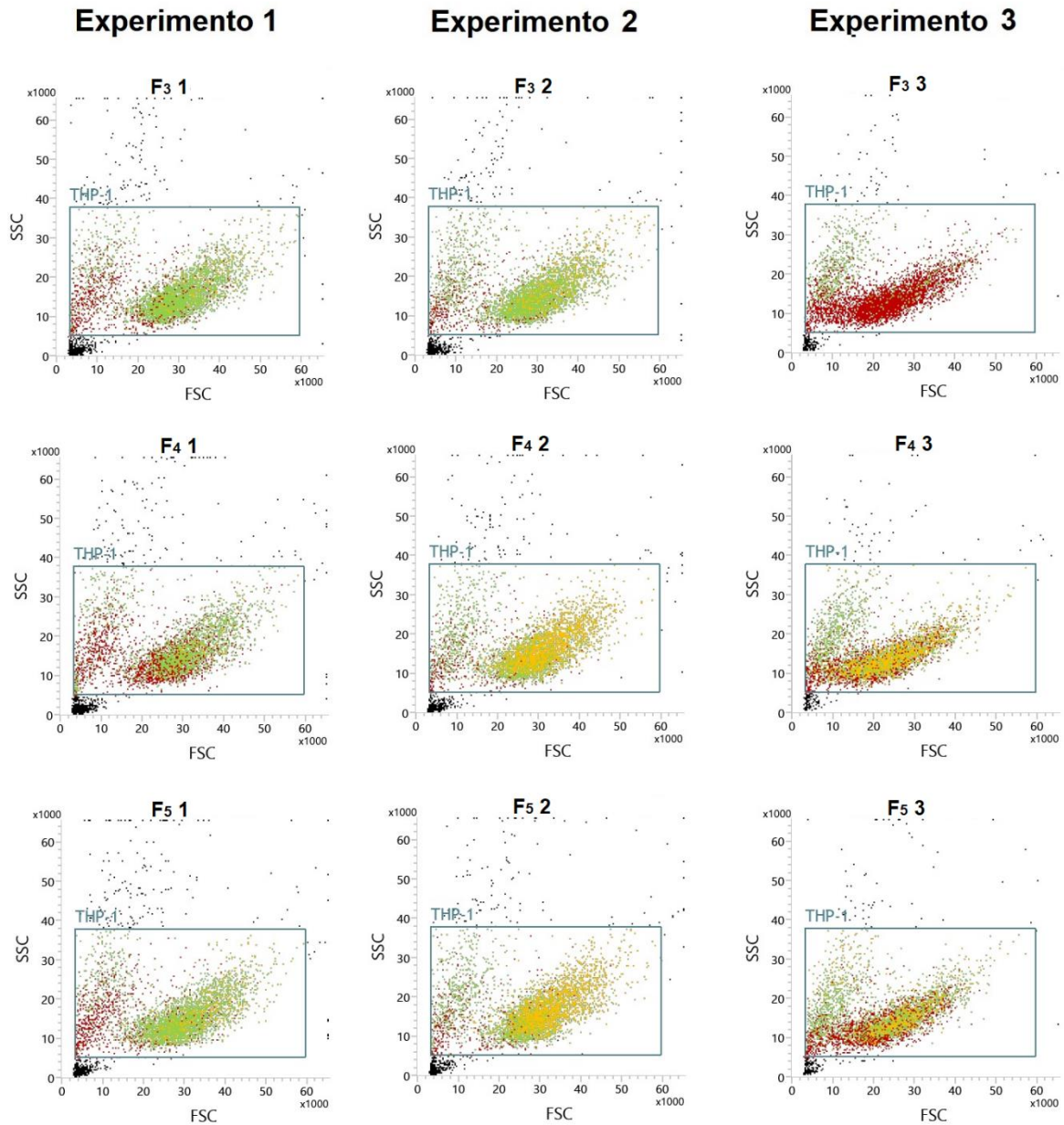


Figura Nº 15. Comparación de tres experimentos independientes sobre el efecto de los carotenoides de *Haloterrigena* sp. SGH1 en la distribución de las subpoblaciones de monocitos THP-1. Los gráficos dot-plot fueron obtenidos de luego de incubar durante 15 min a monocitos THP-1 con 0,8 μ M de MTRed, 30 μ M Antimicina A, solventes etanol o metanol, extracto metanólico SGH1 o las fracciones F₀-F₅. Los resultados muestran la distribución de los monocitos THP-1 en tres subpoblaciones de alto (amarillo), medio (verde) y bajo (rojo) potencial de membrana mitocondrial. Los recuadros dejan fuera los residuos celulares (negro). Control: THP-1 con MTRed; EtOH: etanol; Antimicina A: 30 μ M; MeOH: metanol; SGH1: extracto metanólico; F₀-F₅: fracciones HPLC.

4.4. Ensayos de capacidad antioxidante de fracciones HPLC en la línea celular THP-1.

Considerando que en la hipótesis de este trabajo de tesis se propone que las fracciones de la arquea SGH1, purificadas por HPLC, son moléculas antioxidantes que protegen intracelularmente a los monocitos THP-1, se realizaron experimentos para probar si esto era correcto.

Según lo indicado anteriormente (Resultados, Sección 4.2 y 4.3.1), la emisión de fluorescencia de DHE se midió a 585 nm en los ensayos de citometría de flujo. Los carotenoides también emiten fluorescencia esta longitud de onda; sin embargo, su intensidad es menor a la emitida por el fluoróforo DHE. Así, la fluorescencia de los carotenoides no interfiere con las mediciones usadas para la evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides en los monocitos THP-1.

Para estos ensayos se consideraron los siguientes antecedentes: primero, Antimicina A es una molécula inductora en la producción de ROS en mitocondrias al inhibir el Complejo III de la cadena transportadora de electrones (42, 43) y, segundo, DHE (dihidroetidio) es una molécula sensible a la oxidación por ROS y emite fluorescencia a 585 nm (40,41). Así, es posible evaluar el efecto antioxidante de moléculas protectoras por citometría de flujo, tales como Trolox y las fracciones HPLC de BR.

Para este trabajo, una célula ROS+ es aquel monocito THP-1 que activamente está produciendo radicales libres en presencia de Antimicina A, y son detectadas por una alta intensidad en la fluorescencia intracelular producida por DHE oxidado. Por otra parte, los denominados monocitos basales son aquellas células cuya intensidad de fluorescencia es baja en presencia de DHE y es consecuencia de la producción de ROS durante sus procesos metabólicos. Tanto la población de células basales como de las células DHE positivas (ROS+) se cuantificaron por

citometría de flujo utilizando un haz de luz láser de 488 nm y un detector de 585 nm. Los resultados se expresaron como porcentajes de células basales y ROS+ en base a las diferencias en la intensidad de las señales fluorescentes.

4.4.1. Curso temporal de los ensayos con Antimicina A para la producción de ROS.

El tiempo mínimo para la mayor producción de ROS mitocondrial en presencia del inductor Antimicina A, con una mínima influencia del solvente etanol, fue determinado al evaluar el curso temporal de la producción de ROS en los monocitos. Las células THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640, que contiene el antioxidante Glutación, y luego fueron transferidas al medio FluoroBrite DMEM por 18 h, en ausencia de esta molécula antioxidante. Las células fueron incubadas en medio FluoroBrite DMEM con 0,75% Etanol (EtOH; control) o 75 μ M Antimicina A durante 15 a 120 min. Al inicio del tratamiento se adicionó DHE a una concentración final de 0,2 μ M.

La Fig. 16 muestra los resultados obtenidos en este tipo de ensayos que permitieron determinar que el periodo de incubación adecuado para la producción de ROS en presencia de Antimicina A y etanol fue de 30 min (Fig. 16 2b). La Fig. 16 1a-1e muestra los histogramas obtenidos en las incubaciones con etanol (control). Bajo esta condición, la generación de células THP-1 ROS+ aumentó desde un 4% a los 15-30 min, alcanzando un máximo de 19% a los 90 min. Cuando las células THP-1 fueron incubadas con Antimicina A, la población de células ROS+ se incrementó notablemente, alcanzando los mayores niveles (91% de la población total) a los 90 min de incubación (Fig. 16 2d); en ese periodo de incubación, etanol generó un 19% de células ROS+ (Fig. 16 1d). Estas evidencias permitieron seleccionar un tiempo de incubación de 30 min en presencia de Antimicina A para los siguientes experimentos de protección al daño oxidativo, ya que, a los 30 min, etanol solo

contribuye con un bajo porcentaje de células ROS+ (4%, Fig. 16 1b); en cambio, incubación con Antimicina A por 30 min se generó un 81% de células ROS+. La Tabla 5 resume estos resultados donde se puede observar los porcentajes de células THP-1 basales que se transforman en productoras de radicales libres (ROS+), tanto en presencia del solvente como de Antimicina A.

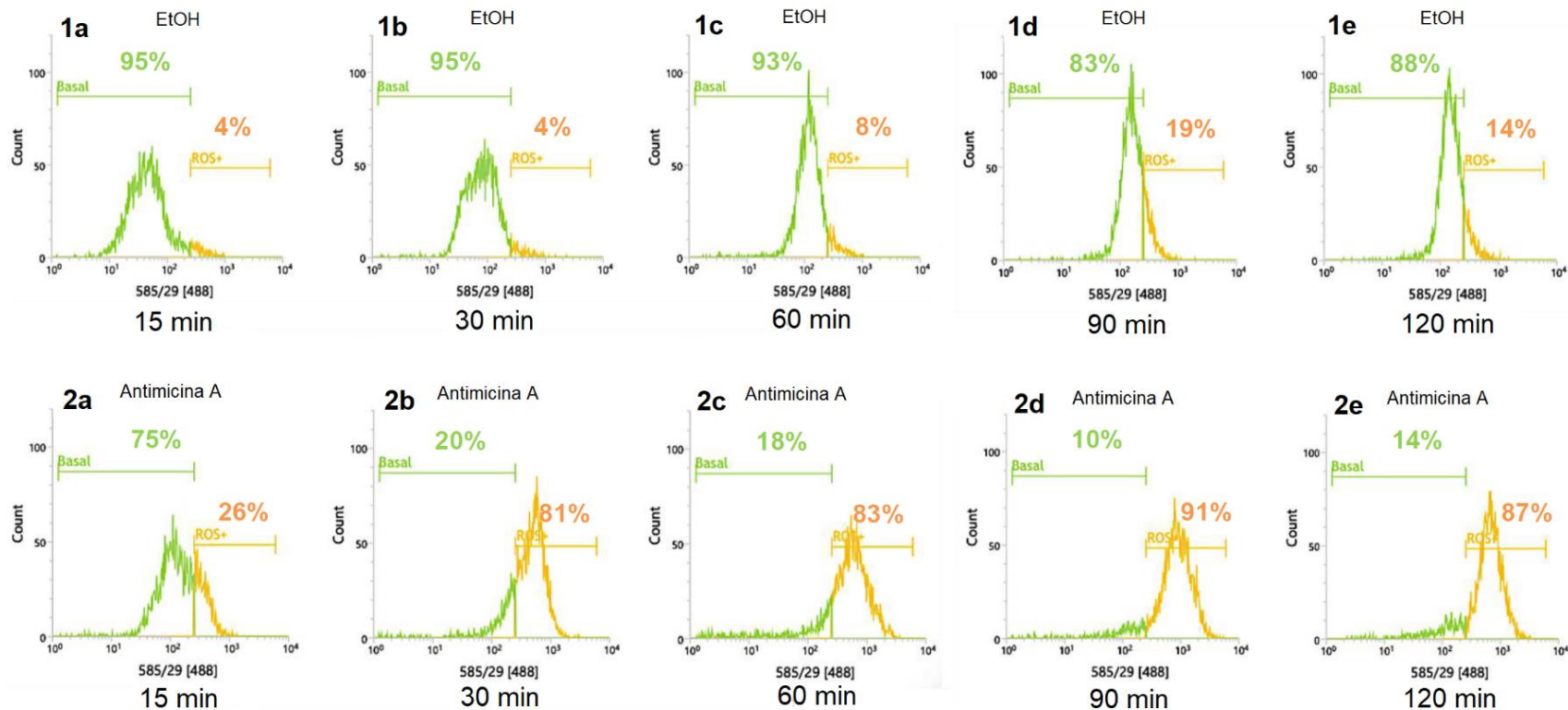


Figura Nº 16 Curso temporal de la producción de células THP-1 ROS+ en presencia de Antimicina A. Células THP-1 fueron incubadas con etanol (control) o 75 μ M Antimicina A, disuelta en etanol, entre 15 a 120 min. La fluorescencia a 585 nm producida por DHE oxidado por ROS, fue evaluada por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células basales (color verde) y células THP-1 ROS+ (color naranja).

Tabla 5. Curso temporal de la producción de radicales libres (ROS) en células THP-1 incubadas con Antimicina A. Los resultados presentados en esta tabla, basados en los histogramas de la Fig. 15, corresponden a los porcentajes de monocitos THP-1 ROS+ que producen radicales libres al ser incubados entre 15 a 120 min con Antimicina A (75 μ M) o etanol (control como solvente del antibiótico). Los ensayos de incubación se realizaron en presencia del fluorocromo dihidroetidio (0,2 μ M), molécula que al ser oxidada por ROS emite fluorescencia a 585 nm y, el porcentaje de células basales y células ROS+ se evaluó por citometría de flujo.

| Tiempo (min) | EtOH | | Antimicina A | |
|--------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | THP-1 Basal (%) | THP-1 ROS+ (%) | THP-1 Basal (%) | THP-1 ROS+ (%) |
| 15 | 95 | 4 | 75 | 26 |
| 30 | 95 | 4 | 20 | 81 |
| 60 | 93 | 8 | 18 | 83 |
| 90 | 83 | 19 | 10 | 91 |
| 120 | 88 | 14 | 14 | 87 |

4.4.2. Estandarización de actividad antioxidante de Trolox en células THP-1 incubadas con Antimicina A.

Trolox es un agente antioxidante que previamente ha sido usado como protector al efecto de ROS en células THP-1 y otras líneas celulares (44-46). Por ello, y para comparar el efecto protector antioxidante de los carotenoides de la arquea SGH1, fue necesario obtener la concentración mínima efectiva de Antimicina A en la que el efecto protector de Trolox pueda ser observado y comparado con los efectos de BR de SGH1.

La Fig. 17 muestra los resultados obtenidos durante la incubación de monocitos THP-1 con diferentes dosis del antibiótico, en presencia o ausencia de 3 mM Trolox, durante 30 min. La serie de figuras 17 1a-1d muestran el efecto de los solventes etanol y metanol en la población de células incubada con o sin Trolox, en presencia de DHE.

Es necesario indicar que Trolox y Antimicina A fueron disueltos en metanol o etanol, respectivamente; además, los ensayos con Antimicina A incluyeron ambos solventes.

El gráfico de puntos (dot-plot) de la Fig. 17-1a identifica la población celular seleccionada (recuadro) para el estudio, dejando fuera a lo que corresponde a residuos celulares. En la Fig. 17 1b, las células THP-1 fueron incubadas en presencia de etanol y metanol, y se puede discriminar las subpoblaciones de células THP-1 basales intactas (verde) y la subpoblación de células ROS+ (naranja). El histograma (Fig. 17 1c), correspondiente a la Fig. 17 1b, indica que las células ROS+ son el 13% de la población total y, al compararle con el efecto de Trolox (Fig. 17 1d), la población de células ROS+ disminuye a 9% de la población. Todo esto indica que los solventes etanol + metanol producen ROS y Trolox actúa como un protector antioxidante.

Las siguientes series de histogramas (Fig. 17 2a-2e y 3a-3e) permiten comparar el efecto protector de Trolox frente a la producción de ROS, generados por diferentes concentraciones de Antimicina A. En ausencia de Trolox, la generación de células ROS+ disminuye desde 97%, en presencia de 75 μ M Antimicina A, hasta 21%, en presencia de 4,69 μ M Antimicina A (ver Fig. 17 2a y 16 2e). Al realizar los experimentos en presencia de Trolox, resultó evidente que el antioxidante disminuye el porcentaje de células ROS+ (naranja) con un aumento paralelo en la población de células basales (intactas, verde). La Tabla 6 resume los resultados obtenidos en estos ensayos y facilita la selección de la concentración mínima efectiva del antibiótico en la que el efecto protector del antioxidante Trolox fue más evidente. En presencia de 18,75 μ M Antimicina A, Trolox entregó la mayor protección a las células THP-1 frente a moléculas ROS generadas por la presencia del antibiótico.

Así, el estudio del efecto antioxidante intracelular de los carotenoides de SGH1 en monocitos THP-1, se realizaron en células THP-1 incubadas durante 30 min en presencia o ausencia de 18,75 μ M Antimicina A y compararlo con la acción del antioxidante Trolox (ver Sección 4.4.3).

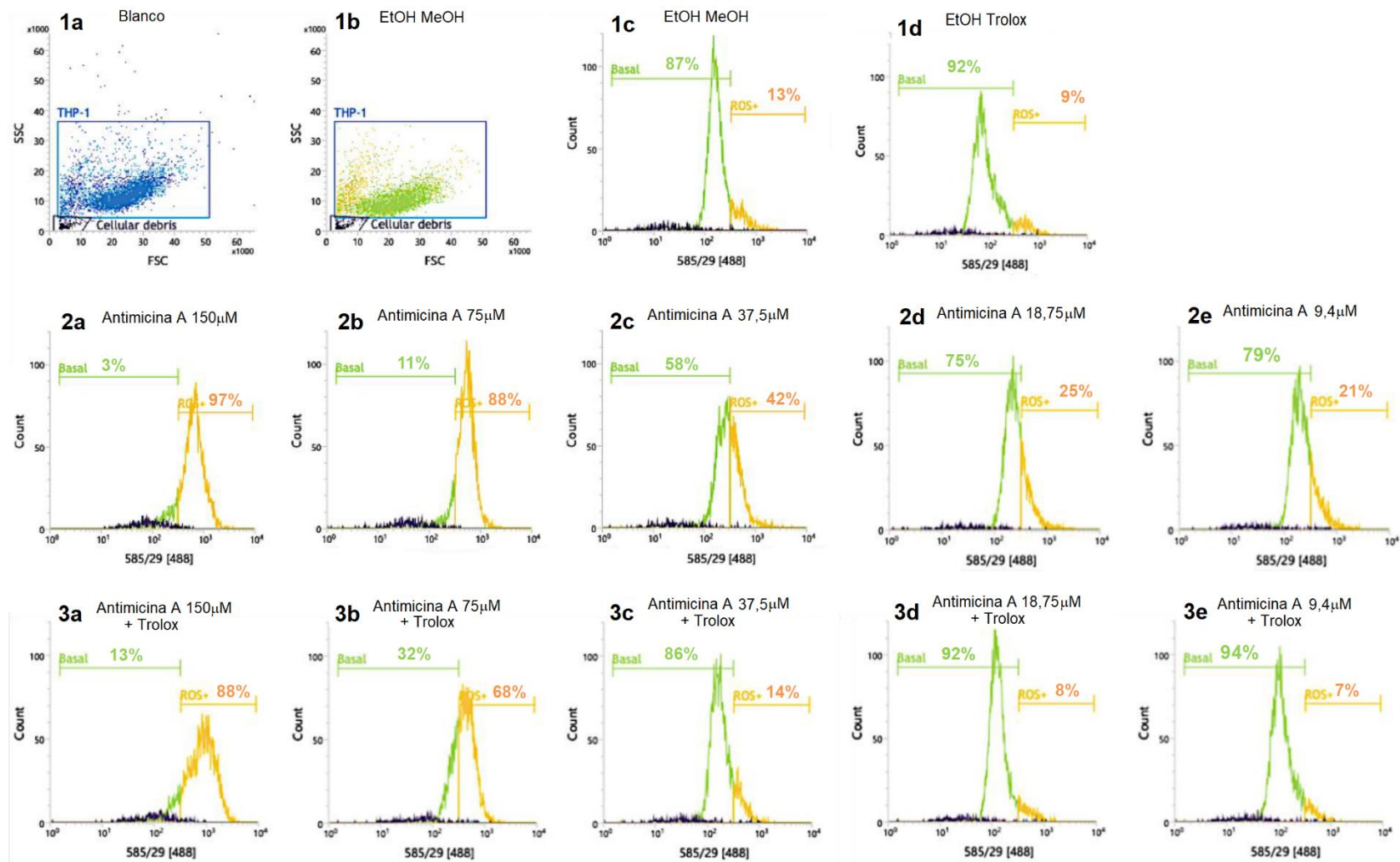


Figura N° 17 Efecto de la concentración de Antimicina A en la generación de células THP-1 ROS+, en presencia o ausencia del antioxidante Trolox. Células THP-1 fueron incubadas con diferentes concentraciones de Antimicina A (incluyendo los solventes etanol y metanol) durante 30 min, en presencia o ausencia de 3 mM Trolox. La fluorescencia a 585 nm producida por DHE oxidado por ROS, fue evaluada por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células THP-1 basales (verde) y ROS+ (naranja).

Tabla 6. Efecto de la concentración de Antimicina A en la producción de células THP-1 ROS+. Los resultados presentados en esta tabla están basados en los histogramas de la Fig. 16. Monocitos THP-1 fueron incubados con diferentes concentraciones del antibiótico disuelto en etanol, en presencia o ausencia del antioxidante Trolox, disuelto en metanol, durante 30 min. Los ensayos de incubación se realizaron en presencia del fluorocromo dihidroetidio (0,2 μ M DHE), molécula que al ser oxidada por ROS emite fluorescencia a 585 nm. Las poblaciones de células THP-1 basales y ROS+ fueron evaluadas por citometría de flujo y expresadas como porcentajes en presencia o ausencia de 3 mM Trolox.

| Antimicina A (μ M) | Células THP-1 ROS+ (%) | Células THP-1 ROS+ incubadas con 3 mM Trolox (%) | Diferencia (%) |
|----------------------------|---------------------------|--|-------------------|
| 0,0 | 13* | 9** | 4 |
| 4,69 | 21 | 7 | 14 |
| 9,38 | 25 | 8 | 17 |
| 18,75*** | 42 | 14 | 28 |
| 37,5 | 88 | 68 | 20 |
| 75 | 97 | 88 | 9 |

*: este porcentaje corresponde al control en que la incubación de monocitos se realizó en presencia de los solventes metanol y etanol, pero en ausencia del antibiótico y Trolox.

** : incubación de monocitos en presencia de Trolox, metanol y etanol, pero en ausencia del antibiótico.

***: concentración mínima efectiva del antibiótico.

4.4.3. Efecto antioxidante de los carotenoides de la arquea *Haloterrigena* sp. SGH1 en monocitos THP-1.

En los ensayos anteriores (Secciones 4.4.1 y 4.4.2), la incubación de células THP-1 con 18,75 μ M Antimicina A más 3 mM Trolox, durante 30 min, demostró ser la mejor condición para comparar el efecto protector intracelular de Trolox con el de los carotenoides de SGH1.

En ensayos de dosis-efecto, en presencia de 18,75 μ M Antimicina (Tabla 7), el efecto antioxidante de 3 mM Trolox fue el más alto, generando una subpoblación de monocitos basales de 94% (y 6% de células ROS+); paralelamente, la incubación control de los monocitos, exclusivamente con 18,75 μ M Antimicina, proporcionó un porcentaje de 26 \pm 6 y 76 \pm 5 de células basales y ROS+, respectivamente.

Alternativamente, las incubaciones de los monocitos THP-1 con el antibiótico y las fracciones F₀ a F₄, a las tres concentraciones usadas, mostraron un efecto antioxidante similar al observado con 3 mM Trolox; la población de monocitos basales fue de 85-98%, exceptuando el menor efecto de la fracción F₄ a baja concentración (Tabla 7). Comparativamente, el efecto antioxidante observado para la fracción F₅ y extracto SGH1 que fue inferior al obtenido con las fracciones purificadas por HPLC.

En la Sección Discusión se analizan estos resultados, considerando que ellos son aproximaciones experimentales preliminares, en base a ensayos obtenidos mediante un único experimento y, por tanto, una primera visión del efecto antioxidante intracelular que ejercen los carotenoides de BR en monocitos humanos.

Tabla 7. Comparación del efecto antioxidante intracelular de Trolox y los carotenoides de Haloterrigena sp. SGH1 frente a radicales libres generados por Antimicina A en células THP-1. Monocitos THP-1 fueron incubados con 18,75 μ M Antimicina A, en presencia de concentraciones crecientes del antioxidante Trolox, o carotenoides (SGH1 y F₀ a F₅), durante 30 min. El porcentaje de células THP-1 basales y células THP-1 ROS+ fueron evaluadas por citometría de flujo, en base a la fluorescencia generada por el fluoróforo DHE, al ser oxidado por radicales libres. Los resultados relativos al efecto de los solventes se muestran como nota al pie de la tabla (*).

| Trolox (mM) | Población | % | Carotenoides (μ g/mL) ** | Población | % | | | | | | | |
|-------------|-----------|----|-------------------------------|-----------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|
| | | | | | SGH1 | F ₀ | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₄ | F ₅ | |
| 0,75 | Basal | 47 | 125 | Basal | 75 | 85 | 94 | 80 | 96 | 53 | -*** | |
| | ROS+ | 54 | | ROS+ | 28 | 16 | 7 | 22 | 5 | 50 | -*** | |
| 1,5 | Basal | 53 | 250 | Basal | 88 | 88 | 95 | 79 | 92 | 85 | 62 | |
| | ROS+ | 49 | | ROS+ | 13 | 13 | 5 | 23 | 9 | 17 | 40 | |
| 3,0 | Basal | 94 | 500 | Basal | 67 | 98 | 91 | 91 | 85 | 89 | 67 | |
| | ROS+ | 6 | | ROS+ | 36 | 2 | 10 | 10 | 17 | 12 | 35 | |

*Ensayos controles sobre el efecto de los solventes (metanol y etanol) o Antimicina A, sobre la población de monocitos basales fue 93 \pm 1 y 26 \pm 6, respectivamente, y sobre la población de monocitos ROS+ fue 8 \pm 1 y 76 \pm 5, respectivamente.

Ensayos en ausencia de Trolox. *Ensayos no realizados.

La Fig. 18 resume las observaciones obtenidas en la evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides de SGH1. Los resultados se muestran como histogramas correspondientes a los ensayos usando la mayor concentración de carotenoides de la arquea SGH1 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Con propósitos comparativos, el gráfico “dot-plot” en la Fig. 18a y el correspondiente histograma de la Fig. 18b, muestran que la población de monocitos THP-1 está constituida esencialmente de células intactas (basales). La presencia de solventes no generó una producción masiva de células ROS+ (Fig. 18c) y los datos de la Tabla 7 indican un porcentaje de células ROS+ de $8\% \pm 1$.

La adición de Antimicina A aumentó sustantivamente la población de células ROS+ (Fig. 18d; $76\% \pm 5$ en Tabla 7). La capacidad antioxidante de 3 mM Trolox fue evidente al disminuir el porcentaje de células THP-1 ROS+ (Fig. 18e; 6% en Tabla 7), revirtiendo el efecto de los radicales libres y aumentando la población de células THP-1 basales (Tabla 7: 94% de células intactas). El efecto antioxidante del extracto metanólico y las fracciones HPLC de SGH1 se describen en las Fig. 18f–18l. La protección ante el efecto oxidante de los radicales libres producidos por la acción de 18,75 μM Antimicina A se observó en todos los ensayos con carotenoides de SGH1. La mayor efectividad fue obtenida con la fracción HPLC F₀ (Fig. 18g), con un porcentaje de células basales levemente superior al efecto de 3 mM Trolox (Tabla 7: 98% y 94%, respectivamente). La menor protección fue generada tanto por el extracto metanólico SGH1 como la fracción F₅ de SGH1 (67% de monocitos basales), aun cuando fue superior al ensayo control en presencia de Antimicina A ($26\% \pm 6$ de monocitos basales).

En conjunto, estos resultados sobre la capacidad antioxidante *in vivo* de los carotenoides de SGH1 son preliminares ya que provienen de un único experimento. Estos resultados entregan la primera visión del efecto antioxidante intracelular de los carotenoides de BR en monocitos humanos. Futuros experimentos deben considerar un aumento en el número de réplicas para obtener una visión estadística sobre la significancia de estos efectos.

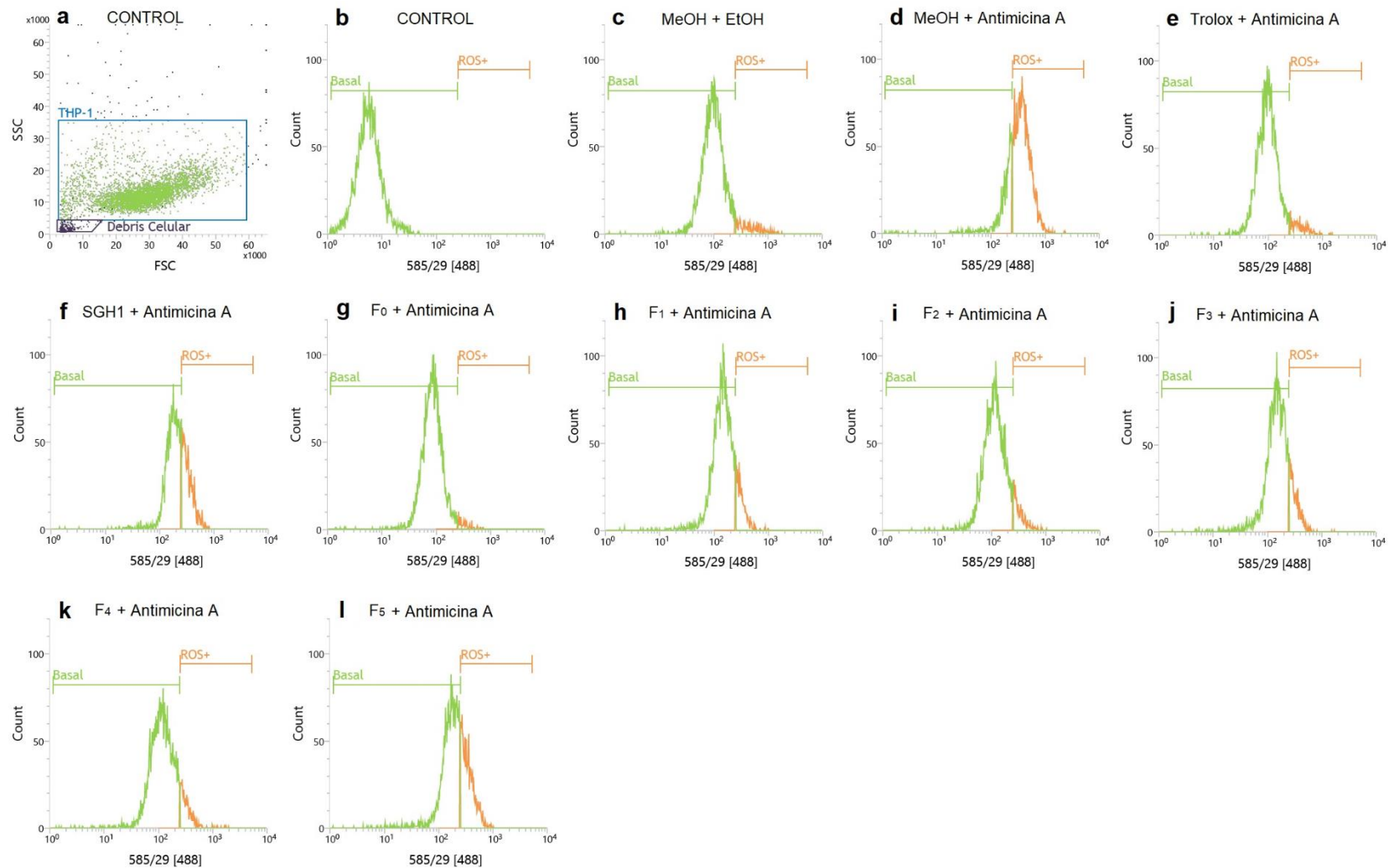


Figura N° 18. Evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides de *Haloterrigena* sp. SGH1 en monocitos THP-1 incubados en presencia de Antimicina A. Células THP-1 fueron incubadas durante 30 min con 18,75 μM Antimicina A (y controles sin Antimicina A), en presencia de extracto metanólico de SGH1 o cada una de sus fracciones purificadas por HPLC, a una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$. DHE (0,2 μM) fue incorporado en las incubaciones para obtener la señal fluorescente que permite cuantificar las células ROS+ por citometría de flujo, expresando los resultados como porcentajes. Los ensayos incluyeron como controles a los monocitos incubados con DHE (histogramas a y b) o DHE más los solventes MeOH y EtOH (histograma c).

CAPÍTULO V

5.1. DISCUSIÓN

Haloterrigena sp. SGH1 es una arquea halófila extrema aislada y purificada desde comunidades endolíticas que colonizan halitas del Salar Grande en el Desierto de Atacama (5, 10, 14, 19). SGH1 acumula carotenoides de la familia Bacteriorrubrina que poseen una actividad antioxidante *in vitro* mayor a β -caroteno y otros antioxidantes (5,14,19).

El modelo experimental de esta tesis fue la línea celular de monocitos humanos THP-1 en la que se evaluó *in vivo* el efecto citotóxico y la actividad antioxidante de los carotenoides de *Haloterrigena* sp. SGH1.

La hipótesis de esta tesis propuso que los carotenoides de la arquea halófila *Haloterrigena* sp. SGH1 son moléculas no tóxicas y antioxidantes en monocitos THP-1. Los resultados obtenidos indican que esta hipótesis fue confirmada.

5.1.1 Separación cromatográfica de carotenoides de la arquea SGH1.

Con el objeto de obtener mayores cantidades de los diferentes carotenoides de la familia Bacteriorrubrina, en esta tesis se escaló el cultivo usando volúmenes de 5-10 litros de cultivo. Tanto el crecimiento como el contenido de carotenoides fue similar a los previamente realizados en volúmenes de 500 ml o menores (14). De este modo, el estudio dispuso de mayor cantidad de biomasa de la arquea SGH1 y, por tanto, mayor obtención de carotenoides totales.

Los carotenoides de SGH1 fueron extraídos con metanol y los extractos metanólicos fueron cromatografiados en un sistema HPLC desde el que se colectaron las seis fracciones más abundantes, para evaluar sus efectos citotóxicos

y antioxidantes en monocitos THP-1. Estudios previos mostraron que los extractos metanólicos de SGH1 permitían coleccionar sólo cinco fracciones abundantes de carotenoides por el sistema HPLC usado (5). En esta tesis, se obtuvo una fracción adicional (F_0 , Fig. 8) que fue resultado de usar extractos de carotenoides más concentrados, dada la mayor disponibilidad de biomasa. La fracción F_0 presentó el menor tiempo de retención en el sistema HPLC (2,2 min) y la identificación de sus componentes no ha sido realizada hasta ahora; sin embargo, es altamente probable que sea una fracción enriquecida en el isómero *all-trans* bacteriorrubrina.

La composición de la familia de carotenoides de BR ha sido reportada en otras arqueas halófilas (47-49, 52). Por ejemplo, la composición en *Haloarcula japonica* fue 68,1% (en moles%) bacteriorrubrina, 22,5% monoanhidrobacteriorrubrina, 9,3% bisanhidrobacteriorrubrina y <0.1% isopentenildehidrorodopina, con trazas de licopeno y fitoeno; además, estos autores indican que bacteriorrubrina mostró una capacidad antioxidante mayor que β -caroteno (47).

Estos estudios demuestran que, en general, los componentes de la familia de BR son similares entre las arqueas halófilas, pero varían en las proporciones en que cada uno de ellos se presenta; así, en la arquea halófila SGH1, estudiada en esta tesis, Flores et al. (5, 14) demostraron que cerca del 80% de los carotenoides totales se acumulan como isómeros geométricos de BR: *all-trans*-BR (50%), 5-*cis*-BR (15%), 9-*cis*-BR (10%), 13-*cis*-BR (4%) y otros como derivados deshidratados de BR.

5.1.2. ¿Es BR un soluto permeable en membranas de monocitos THP-1?

Para estudiar el efecto de los carotenoides de SGH1 al interior de los monocitos THP-1 fue necesario demostrar que estos ingresan al interior de estas células, tal como se ha demostrado con otras moléculas fluorescentes (DHE, MTRed) que cruzan la membrana citoplasmática de diversas células humanas en cultivo, y que

se han usado para evaluar la estabilidad del potencial de membrana de las mitocondrias (35, 36) y el estrés oxidativo (37, 38).

La membrana citoplasmática de los monocitos THP-1 es permeable a los carotenoides de la arquea SGH1, lo que fue demostrado en este trabajo mediante el uso de la microscopía confocal y la fluorescencia de los carotenoides de SGH1. Durante la década de los noventa, Jagannadham et al. (16) reportaron un extracto metanólico de la bacteria psicrotrofica *Micrococcus roseus* que al ser excitada con luz de 465-490 nm emitía fluorescencia a 570-590 nm; la molécula fluorescente del extracto metanólico luego fue identificada como bacteriorrubrina (16-18). La capacidad fluorescente de bacteriorrubrina producida por la arquea halófila SGH1 ha sido confirmada durante este estudio de tesis y, al parecer, no existen otros trabajos en este tema. Durante los estudios de citometría de flujo se observó que el extracto metanólico de SGH1 emitía fluorescencia a 585 nm al ser excitado con luz 488 nm (Fig. 9). Además, la microscopía confocal permitió confirmar este hecho ya que los extractos metanólicos de SGH1 excitados con luz de 488 nm generan una emisión de luz a 582 nm. Las emisiones de fluorescencia se miden de acuerdo con el detector que se dispone en cada equipo. Ello permitió demostrar que los carotenoides de SGH1 ingresaban al interior de las células intactas de THP-1, usando como controles positivos a los fluoróforos DHE y MTRed (Fig. 10).

BR es una xantofila lineal de 50 carbonos con sus dos extremos hidrofílicos, de modo que se localiza en la bicapa lipídica de las membranas de arqueas, donde participa en el control de la presión osmótica en células en ambientes hipersalinos, protegiendo o disminuyendo el daño por radicales libres y en la estabilización y rigidez de las membranas (14, 23). Por ello, era razonable suponer que las membranas de THP-1 serían permeable a BR, tal como fue demostrado en este trabajo. De hecho, BR no solo se localizó a nivel de la membrana citoplasmática de THP-1, sino que presentó una distribución homogénea al interior de estas células,

tal como se observó con DHE y MTRed. En base a esta evidencia, se procedió a evaluar experimentalmente la citotoxicidad y actividad antioxidante de BR en células THP-1 en cultivo.

Ya que Antimicina A se usó en ensayos para la evaluación de la citotoxicidad y actividad antioxidante de BR en monocitos THP-1, es necesario indicar que el antibiótico Antimicina A se une específicamente al sitio de reducción de la ubiquinona del complejo III en mitocondrias, inhibiendo la oxidación de ubiquinol al bloquear la transferencia de electrones entre el citocromo b y c1 (42). La inhibición del complejo III genera un incremento en la producción de ROS y una reducción en los niveles de ATP (43), debido al colapso de la gradiente de protones a nivel de la membrana interna de las mitocondrias y la consecuente pérdida del potencial de membrana.

5.1.3. Estudios de citotoxicidad.

Es evidente que para el uso potencial de nuevas moléculas en aplicaciones biotecnológicas (por ejemplo, en la industria alimentaria, biomedicina y otras), es necesario evaluar inicialmente el eventual efecto tóxico (daño en membranas, inhibición de procesos celulares tales como biosíntesis de proteínas, actividad mitocondrial, entre otros) que ellas puedan mostrar en modelos celulares y posteriormente en sistemas más complejos como sería el caso de animales.

La citotoxicidad es uno de los indicadores más importantes para los estudios de evaluación biológica en Toxicología y Farmacología, aplicando diversos ensayos para evaluar la citotoxicidad de productos químicos, tales como medicamentos y pesticidas (ensayos de exclusión de colorantes, colorimétricos, fluorométricos y luminométricos) (50).

Estudios sobre efectos biológicos de carotenoides C50 de haloarqueas son escasos, a diferencia de lo que ocurre con carotenoides C40 (52). Por ejemplo,

Abbes et al. (53) reportaron en 2013 la actividad antiproliferativa de los extractos de carotenoides de *Halobacterium halobium*, una cepa de haloarquea aislada de una salina en Túnez. Más recientemente, Hou and Cui (52) demostraron que extractos acetónicos de siete haloarqueas presentaban actividades antioxidantes mayores a la de β -caroteno; además, todos los extractos mostraron un efecto protector contra la hemólisis mediada por agua oxigenada y los extractos de dos de las arqueas mostraron una actividad antiproliferativa en células HepG2, una línea de células hepáticas cancerosas humanas. También, Sikkandar et al. (54) publicaron un trabajo sobre citotoxicidad de extractos crudos de carotenoides de la arquea *Haloferax volcani* en células HepG2 demostrando un efecto dosis-dependiente y sugiriendo probables propiedades anticancerígenas de estos carotenoides. Otros estudios demostraron que el 82% de los carotenoides correspondían al isómero all-trans bacteriorrubrina, en *Haloferax volcani* (55).

Los resultados generados en la presente tesis sobre efectos biológicos de los carotenoides de la haloarquea *Haloterrigena* sp. SGH1 sobre monocitos humanos se discuten a continuación y han sido incorporados en un reciente artículo publicado en Marzo de 2020 (5). Es interesante mencionar que en Abril de 2020, Hegazy et al. (56) demostraron que extractos de carotenoides de la haloarquea alcalófila *Natrialba* sp. M6 no eran citotóxico a fibroblastos de pulmón, presentaron un efecto inductor de apoptosis mediado por caspasa mayor que la droga 5-fluoruracilo en diversas líneas celulares cancerosas y finalmente, mostraron un efecto antiviral en células infectadas con los virus de la hepatitis humana C y B (HCV, HBV). Sin embargo, y a diferencia del trabajo presentado en esta tesis que usa isómeros purificados por HPLC de carotenoides C50 de *Haloterrigena* sp. SGH1, el trabajo de Hegazy et al (56) usó un extracto orgánico de *Natrialba* sp. M6 en que predomina un carotenoide C50, único para este microorganismo, y solo en el resumen de dicho artículo se menciona que es bacteriorrubrina, lo que no es sustentado

explícitamente en base a la abundancia de los datos de caracterización química proporcionados por los autores.

En conjunto, los estudios disponibles sobre efectos biológicos de carotenoides C50 de haloarqueas demuestran la potencialidad de estos metabolitos en aplicaciones biomédicas.

5.1.3.1. Citotoxicidad de los carotenoides de SGH1 sobre la permeabilidad de la membrana citoplasmática de monocitos THP-1.

En este trabajo de tesis se pudo demostrar el efecto los carotenoides de SGH1 sobre monocitos THP-1, en base a un estudio en triplicado sobre permeabilidad de membranas (ver Fig. 11, Fig. 12 y Tabla 3). Las células THP-1 fueron incubadas con el marcador fluorescente IP, que sólo ingresa a células con alteraciones en la permeabilidad de sus membranas citoplasmáticas. Al ingresar a la célula dañada, IP se une al DNA celular, se acumula y su fluorescencia puede ser cuantificada por citometría de flujo (35). IP ha sido utilizado en estudios de apoptosis en cultivos de células leucémica HL-60, en los que se evaluó el ingreso del marcador fluorescente antes y después que dichas células iniciaban el proceso apoptótico (35, 36).

Cuantitativamente, y tal como se esperaba, el efecto citotóxico de Antimicina A sobre monocitos THP-1, comparado con las células control (incubadas en presencia del solvente etanol, sin otra adición), se reflejó en una disminución de la población de células basales desde un $81\% \pm 4$ a un $47\% \pm 4$. Además, el antibiótico permitió registrar un aumento cercano a tres veces en las poblaciones de células THP-1 IP+ y THP-1 muertas.

Antimicina A es un agente desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, afectando negativamente la carga energética de la célula, lo que se refleja en alteraciones en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo

la desestabilización de la membrana citoplasmática (42, 43). Por ello, es posible entender el aumento del ingreso del fluorocromo IP a monocitos THP-1 incubados con el antibiótico, su unión a DNA y el aumento en la correspondiente señal fluorescente intracelular captada por citometría de flujo.

Los resultados sobre el efecto del extracto metanólico SGH1 sobre la población de células THP-1, fue una disminución de células basales desde $80\% \pm 3$ a un $60\% \pm 5$ y en células muertas desde $14\% \pm 4$ a un $8\% \pm 2$, con relación al bajo o nulo efecto del solvente metanol. A diferencia del efecto de Antimicina A, el extracto metanólico aumentó la población de células IP+ en cerca de 5 veces, con respecto al control correspondiente. Entonces, el extracto metanólico de SGH1 mantuvo una subpoblación de células basales ($60\% \pm 5$) y de células muertas ($8\% \pm 2$) pero aumentó el porcentaje de la subpoblación de células IP+ (desde $6\% \pm 1$ hasta $33\% \pm 3$).

La mayor diferencia en el efecto de las fracciones F_0 a F_5 sobre permeabilidad celular de los monocitos, con respecto a Antimicina A y el extracto SGH1, se observó como un menor o nulo efecto sobre la población de células basales (de 80% en el control a $76-85\%$ en los ensayos con las fracciones). Las fracciones F_0-F_5 tienen un efecto similar al extracto SGH1, disminuyendo la población de células THP-1 muertas (desde 14% a $4-8\%$), mientras que el antibiótico aumenta el porcentaje de esta población (desde 15% a cerca de 40%). Finalmente, las fracciones, el extracto y el antibiótico aumentan la población de células IP+, siendo el extracto metanólico el más efectivo (de 6% a 33%), en comparación a aumentos menores (6% a $11-17\%$ para las fracciones y 5% a 14% para el antibiótico).

Para explicar esta última observación (el aumento evidente en la subpoblación de monocitos IP+), se debe recordar que el extracto metanólico de SGH1 contiene una mezcla de carotenoides C50 fluorescentes y que la membrana citoplasmática de los monocitos es permeable a ellos (ver resultados, secciones 4.2.1. y 4.2.2.);

entonces, el aumento en la intensidad de la señal fluorescente que se interpreta como un aumento en la subpoblación de monocitos IP+ no es consecuencia del ingreso del marcador IP, sino que a los carotenoides fluorescentes localizados intracelularmente. Con esto es posible descartar daños en la integridad y permeabilidad de las membranas de THP-1 a causa de los carotenoides de SGH1. La cromatografía HPLC permite que las fracciones F₀-F₅ contengan carotenoides con un mayor grado de pureza; sin embargo, estas fracciones también aumentan la subpoblación de monocitos IP+ pero con una eficiencia menor a la del extracto metanólico. Así, la mezcla de carotenoides en el extracto metanólico actuarían sinérgicamente, permitiendo que los monocitos emitan una señal fluorescente de mayor intensidad a la observada en cada una de las fracciones HPLC por separado.

Es importante mencionar que los carotenoides de la arquea SGH1, ya sea como una mezcla en el extracto metanólico u como fracciones purificadas por HPLC, disminuyen el porcentaje de la subpoblación de monocitos muertos. Entonces, los carotenoides de la familia de bacteriorrubrina reforzarían la membrana plasmática de los monocitos THP-1, en un rol similar a lo descrito en arqueas (23).

Bajo las condiciones experimentales aplicadas en el desarrollo de los ensayos presentados en esta tesis, el concepto de "*efecto citotóxico*" corresponde a la acción de toda molécula que aumente el porcentaje de células THP-1 muertas desde una población de monocitos intactos (basales). En este contexto, ¿*son células muertas los monocitos identificados como IP+*? La respuesta a esto se sustenta en los antecedentes experimentales que proporciona la citometría de flujo como técnica de medición; esto es, la intensidad de la señal fluorescente es menor en las subpoblaciones de células basales y células IP+, en comparación con una intensidad exponencialmente mayor en la subpoblación de células THP-1 muertas. Entonces, la menor intensidad de la señal fluorescente emitida por la subpoblación IP+, incubada con los carotenoides SGH1, se debería al ingreso parcial del

marcador IP a través de la membrana plasmática de los monocitos que tendría un daño lo suficiente como para que ingrese una cantidad baja del marcador IP, pero mucho menor al que tiene la subpoblación de monocitos muertos.

Darzynkiewicz et al. (35) han indicado que la calidad estructural de la membrana plasmática es el factor central para discriminar entre las fases de apoptosis temprana y tardía en la línea celular HL-60 (células humanas con leucemia mielocítica), usando la medición de intensidad de fluorescencia generada por la unión de IP al DNA celular. De ese modo, fue posible discriminar entre células con la membrana plasmática intacta (células en apoptosis temprana) de células con daño en dicha membrana (células en necrosis y en fase de apoptosis tardía).

En este contexto de los resultados del efecto de los carotenoides de SGH1 sobre los monocitos THP-1 y considerando la definición de efecto citotóxico aplicado en esta tesis, los carotenoides de la arquea SGH1 no son citotóxicos a las células leucémicas de la línea celular THP-1; pero se puede sugerir que la subpoblación de células IP+ serían células en un estado pre-apoptótico.

Vermes et al. (57) mencionan que Anexina V es una proteína con alta afinidad por fosfatidilserina, un fosfolípido que normalmente se localiza al interior de la membrana plasmática, pero migra a la superficie externa de dicha membrana en células pre-apoptóticas y en necrosis, quedando expuesta y disponible para su unión con Anexina V. En consecuencia, es necesario una exploración profunda de los efectos de los carotenoides C50 de SGH1 en células humanas mediante el uso de ensayos que incluyan, además del fluorocromo IP, a la proteína Anexina V unida a un marcador fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína).

Es importante mencionar que la evaluación del potencial de membrana mitocondrial es una estrategia experimental que complementa los ensayos antes mencionados con doble marcación con moléculas fluorescentes. Alteraciones en los potenciales

de membrana mitocondrial ocurren antes que se demuestre la migración de fosfatidilserina en células en apoptosis (58).

En arqueas, BR se localiza en la membrana citoplasmática y estabiliza la doble capa lipídica (23); entonces, los carotenoides de SGH1 podrían actuar a nivel de la membrana citoplasmática del monocito o a nivel intracelular, por ejemplo, en las mitocondrias. Ya que los carotenoides de SGH1 son moléculas con alta capacidad antioxidante, se puede especular que el mecanismo de acción podría estar relacionado con la reducción de radicales libres, evitando alteraciones metabólicas en la célula que se reflejen en cambios en la integridad de la membrana plasmática. Por ello, y como segunda estrategia de evaluación de la citotoxicidad de los carotenoides de SGH1 en los monocitos humanos, se realizaron estudios sobre el efecto de estos carotenoides en la actividad mitocondrial de células THP-1.

5.1.3.2. Citotoxicidad de los carotenoides de SGH1 sobre la actividad mitocondrial de monocitos THP-1.

Una visión alternativa al efecto de los carotenoides de SGH1 sobre la viabilidad de los monocitos THP-1 fue estudiar posibles alteraciones en el potencial de las membranas mitocondriales de THP-1 ($\Delta\psi_m$), ya que ensayos preliminares nos indicaban una aparente alteración del $\Delta\psi_m$ en presencia de los carotenoides de SGH1.

Las mitocondrias capturan el fluorocromo lipofílico MitoStatus Red (MTRed), el cual ingresa al interior de estos organelos y su fluorescencia puede ser evaluada por citometría de flujo (38,39). Además, la citometría de flujo permite discriminar entre poblaciones de células con mitocondrias activas y aquellas con diferentes grados de inactividad. Por tanto, la incubación de monocitos THP-1 con MTRed, en presencia de un agente desacoplante como la Antimicina A, permite demostrar y cuantificar poblaciones con diferente nivel de $\Delta\psi_m$.

En este estudio se demostró que fue posible discriminar entre tres poblaciones de monocitos THP-1 con $\Delta\psi_m$ alto, medio y bajo. Así, el efecto de Antimicina A sobre las células THP-1 fue de $18\% \pm 12$, $19\% \pm 2$ y $62\% \pm 11$ para las subpoblaciones con alto, medio y bajo $\Delta\psi_m$, respectivamente. Comparativamente, las células THP-1 control, incubadas en ausencia del agente desacoplante se distribuyeron en $77\% \pm 1$, $4\% \pm 1$ y $20\% \pm 2$ para las subpoblaciones con alto, medio y bajo $\Delta\psi_m$, respectivamente (ver Tabla 4). Estos resultados indican que el efecto del antibiótico fue aumentar el porcentaje de células con $\Delta\psi_m$ medio y bajo, en paralelo a la disminución de la población de células con alto potencial.

En ausencia de Antimicina A, tanto la adición del extracto metanólico como las adiciones de las fracciones de carotenoides de la arquea SGH1 a los monocitos THP-1, dio como resultado una gran disminución en el porcentaje de células con alto $\Delta\psi_m$ (desde $80\% \pm 2$ hasta el rango de $5\% \pm 5$ a $22\% \pm 21$, dependiendo de la fracción estudiada) y un incremento paralelo en el porcentaje de la población de células con un $\Delta\psi_m$ medio (desde $3\% \pm 1$ al rango $46\% \pm 5$ a $63\% \pm 8$, dependiendo de la fracción estudiada). La incubación con las fracciones de carotenoides aumentó la población de células con bajo $\Delta\psi_m$ desde un $17\% \pm 2$ al rango de $24\% \pm 9$ a $41\% \pm 32$, dependiendo de la fracción estudiada (ver Tabla 4).

En resumen, bajo las condiciones experimentales usadas en este trabajo, los carotenoides de la arquea *Haloterrigena* sp. SGH1 afectan negativamente el potencial de las membranas mitocondriales de los monocitos THP-1, pero este efecto es sustancialmente inferior al efecto observado con el antibiótico. Entonces, los carotenoides de SGH1 son parcialmente tóxicos a las células THP-1.

Los resultados obtenidos en los ensayos de medición de potencial de membrana mitocondrial, a partir de tres experimentos independientes, muestran una alta desviación estándar. Como ejemplo de esto, la Fig. 15 muestra las diferencias en

la distribución de las tres subpoblaciones de monocitos incubados con o sin la adición del antibiótico o carotenoides en los tres experimentos, y su efecto en las desviaciones estándares (Fig. 14 y Tabla 4).

El bajo número de réplicas para la medición del potencial de membrana mitocondrial sería el principal origen de las desviaciones estándares obtenidas; en consecuencia, futuros estudios deberán considerar un aumento del número de réplicas y de los posibles errores metodológicos propios de este tipo particular de experimentos (revisión del diseño experimental, error humano, diferencias en la sensibilidad a luz ambiental de reactivos, entre otros).

Entonces, ¿son los carotenoides de SGH1 citotóxicos a los monocitos THP-1? Considerando que los carotenoides de SGH1 mantienen la integridad estructural de la membrana plasmática, pero alteran la población de monocitos THP-1 desde células con un alto $\Delta\psi_m$ a células con un $\Delta\psi_m$ medio, ellos serían moléculas citotóxicas que no afectan la permeabilidad de la membrana citoplasmática, pero estarían induciendo a los monocitos a ingresar a etapas tempranas de apoptosis, debido al efecto a nivel mitocondrial.

El uso de la traslocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática, como marcador de células en procesos apoptóticos y de necrosis (57), puede ser considerado para su aplicación en el estudio del efecto biológico de los carotenoides C50 de arqueas, particularmente en el caso de la arquea halófila *Haloterrigena* sp. SGH1, y así confirmar que ellos serían inductores apoptóticos en monocitos THP-1. Además, y siendo los monocitos THP-1 una línea celular de origen canceroso (24), la proposición de una posible actividad citotóxica de los carotenoides de SGH1 sobre células cancerosas debe ser explorado con mayor profundidad para evaluar la potencial aplicación farmacológica de estas biomoléculas.

5.1.4. Estudios de actividad antioxidante.

Los extractos metanólicos de la arquea halófila extrema *Haloterrigena* sp. SGH1 poseen una alta actividad antioxidante *in vitro*, superior a otros antioxidantes como Trolox y β -caroteno (5). También, extractos de carotenoides de *Haloterrigena turkmenica* y otras arqueas halófilas son fuertes agentes antioxidantes en comparación a antioxidantes de referencia, tales como ácido ascórbico, β -caroteno, vitamina E y otros (51,52,60). Además, BR de SGH1 ingresa al interior de los monocitos THP-1 (ver Resultados, sección 4.2.) y que tanto el extracto metanólico como las fracciones HPLC de los carotenoides de SGH1 disminuyen la muerte celular de monocitos THP-1. En consecuencia, este trabajo se focalizó en responder si los carotenoides de SGH1 actúan intracelularmente como agentes antioxidantes en los monocitos THP-1.

Como marcador fluorescente para este estudio, se utilizó DHE, una molécula que, al ingresar a una célula, es oxidada por oxígeno dando origen a dos moléculas fluorescentes, 2-hidroxi-etidio y etidio. Etidio se forma por medio de una reacción redox inespecífica y en su estado oxidado emite fluorescencia 610 nm. Por otra parte, 2-hidroxi-etidio es oxidado por moléculas ROS y emite fluorescencia entre 590-620 nm (40, 41). Ambas emisiones cubren un rango de longitudes de onda cercanos, dificultando la medición de fluorescencias específicas, particularmente en estudios con microscopía confocal. En este trabajo de tesis, usando DHE en citometría de flujo, se incluyeron controles con los solventes metanol y etanol, para descartar la fluorescencia inespecífica emitida por etidio, y medir la que corresponde a 2-hidroxi-etidio, como consecuencia de la presencia de ROS.

Los resultados obtenidos nos indicaron que los carotenoides de SGH1 son moléculas protectoras al daño oxidativo al interior de los monocitos. Antimicina A es una molécula inductora de la producción de ROS en mitocondrias, debido a que inhibe el Complejo III de la cadena transportadora de electrones, como ha sido

establecido (42, 43). La incubación de monocitos THP-1 con Antimicina A durante 30 min permitió demostrar que cerca del 80% de la población celular produce radicales libres, con un bajo efecto por parte de etanol (4%) como solvente del antibiótico, en las condiciones experimentales usadas en este trabajo de tesis (ver Resultados, sección 4.4.1). Así, este modelo experimental permitió evaluar el grado de protección antioxidante que entregaban los carotenoides de SGH1 a los monocitos THP-1.

Aquellos monocitos con una alta fluorescencia se denominaron células ROS+ y son monocito THP-1 que activamente están produciendo radicales libres en presencia de Antimicina A, y son detectadas por la fluorescencia intracelular producida por DHE oxidado. Por otra parte, el metabolismo celular de los monocitos basales genera normalmente un bajo nivel de moléculas ROS que se traduce en una baja intensidad de fluorescencia en presencia de DHE. Tanto la población de células basales como de las células ROS+ se cuantificaron por citometría de flujo utilizando un haz de luz láser de 488 nm y un detector de 585 nm. Los resultados se expresaron como porcentajes de células basales y ROS+ en base a las diferencias en la intensidad de las señales fluorescentes.

Trolox es una molécula antioxidante que actúa a nivel intracelular en células eucariontes (44-46). En este trabajo, Trolox fue utilizado con propósitos comparativos y se demostró su efecto intracelular en monocitos humanos (ver Resultados, sección 4.4.2). Incubaciones de monocitos en presencia o ausencia de 18,75 μ M Antimicina A y 3 mM Trolox durante 30 min fueron las condiciones experimentales óptimas para evaluar y comparar el efecto antioxidante intracelular de los carotenoides de SGH1 en monocitos THP-1.

Las observaciones obtenidas en la evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides de SGH1 en la población de monocitos THP-1, constituida esencialmente de células intactas (basales), indicaron que (a) Antimicina A

aumenta sustantivamente la población de células ROS+, (b) que en presencia de Antimicina A, el antioxidante Trolox disminuye el porcentaje de células THP-1 ROS+, revierte el efecto oxidativo de los radicales libres y aumenta la población de células THP-1 basales, y (c) que en presencia de Antimicina A, la mayor actividad antioxidante intracelular fue obtenida con la fracción HPLC F₀, con un porcentaje de células basales levemente superior al efecto de Trolox; el extracto metanólico SGH1 y la fracción F₅ de SGH1 mostraron la menor protección antioxidante a los monocitos frente a ROS.

Vale la pena mencionar que el extracto metanólico de la arquea SGH1 tuvo un efecto antioxidante menor al compararlo con las fracciones de carotenoides purificadas por HPLC, con excepción de la fracción F₅. Una explicación razonable para esto es difícil de encontrar y se puede especular en la existencia, no demostrada hasta ahora, de alteraciones químicas en la mezcla de carotenoides de la arquea SGH1 que disminuyesen su efecto antioxidante. Esta especulación se sustenta en información publicada sobre los carotenoides C40 como moléculas con alta actividad oxidativa, de modo que su acción genera el correspondiente radical libre (60,61). Ya que las arqueas sintetizan carotenoides C40 en baja cantidad (47,51), al extraer los carotenoides totales de SGH1 con metanol, la fracción C40 podría oxidar carotenoides C50 y así disminuir la actividad antioxidante de estos al interior de los monocitos THP-1.

Sobre el caso de la fracción F₅, se puede mencionar que ella está enriquecida en el derivado *all-trans*-mono anhidro bacteriorrubrina, que constituye un bajo porcentaje (9%) del total de carotenoides de la familia BR y no se localizó en las otras fracciones HPLC (5, 14); en consecuencia, este derivado tendría la menor capacidad antioxidante intracelular en los monocitos THP-1.

La fracción F₀, purificada por HPLC, fue la más efectiva en proporcionar protección a los monocitos THP-1 frente a las moléculas ROS producida por Antimicina A. Esta

fracción fue dejada sin evaluación en trabajos anteriores (5, 14, 19), principalmente por el bajo rendimiento obtenido para esta fracción. En este trabajo de tesis, se aumentó la producción de biomasa mediante el escalamiento en el cultivo de la arquea y, por tanto, se mejoró la obtención de la fracción F₀, siendo la fracción con el menor tiempo de retención (2,2 min) en el sistema HPLC. De este modo, fue posible incluirla en los ensayos, aun cuando su composición en carotenoides está pendiente y la aplicación de UHPLC-MS permitirá su identificación.

Recientes revisiones de estudios sobre los carotenoides indican que estas moléculas pueden minimizar los efectos de drogas inductoras de la formación de ROS en células normales, actuando como agentes antioxidantes (60,61). Alternativamente, los carotenoides C40 actúan como potentes moléculas "prooxidantes" (generando radicales CAR•⁺ de los carotenoides) en líneas celulares cancerosas, activando señalizaciones pro-apoptóticas mediadas por ROS y posterior muerte celular por apoptosis (60,61). Sin embargo, no hay referencias explícitas sobre estudios similares en líneas celulares humanas usando carotenoides C50 de arqueas, como etapa previa en aplicaciones biotecnológicas de estos pigmentos.

Finalmente, y por razones de la contingencia nacional, sólo se reporta un experimento completo sobre la capacidad antioxidante de los carotenoides en la protección de los monocitos THP-1 frente a ROS producidos a nivel mitocondrial. En su conjunto, estos resultados nos entregan una primera visión positiva sobre el efecto antioxidante intracelular que ejercen los carotenoides de BR en monocitos humanos, pero deben ser considerados preliminares, ya que futuros experimentos con un mayor número de réplicas permitirán obtener una visión estadística apropiada sobre la significancia de estos efectos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Al término de las actividades experimentales de la tesis de pregrado, necesaria para optar al título de Bioquímico entregado por la Universidad de Antofagasta, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. Se confirmó que es factible aumentar la producción de biomasa de la arquea en estudio, mediante el escalamiento del cultivo de SGH1 a volúmenes finales de 10 litros. De esta manera, se facilitan los futuros estudios sobre los carotenoides de la familia de bacteriorrubrina presentes en *Haloterrigena* sp. SGH1; por ejemplo, composición de la fracción F₀ purificada por HPLC.
2. Se demostró que bacteriorrubrina es una molécula permeable a la membrana citoplasmática e ingresa al interior de los monocitos THP-1. Así, es factible evaluar el efecto intracelular de los carotenoides de la arquea en células humanas en cultivo y probar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas en farmacología y otras áreas de interés.
3. Ya que la integridad de la membrana plasmática de los monocitos THP-1 no es afectada por la presencia de los carotenoides de SGH1; esto indica que los carotenoides no son citotóxicos a ese nivel.
4. Un efecto citotóxico de los carotenoides de la arquea SGH1 sobre la línea celular de monocitos THP-1 se infiere de la transformación de la población de células THP-1 con alto potencial de membrana mitocondrial a células con potencial de membrana medio y bajo.
5. Los carotenoides de la arquea SGH1 actúan como moléculas antioxidantes a nivel intracelular en los monocitos THP-1, disminuyendo sustantivamente el daño oxidativo de moléculas ROS.

6. Los monocitos THP-1 están metabólicamente activos en presencia de los carotenoides de SGH1. La disminución en el potencial de membrana mitocondrial de los monocitos THP-1 incubados con los carotenoides de la arquea halófila sugiere que estos pigmentos son moléculas citotóxicas que estarían induciendo el ingreso de los monocitos a etapas tempranas de apoptosis. De este modo, es necesario avanzar en la potencial aplicación farmacológica de estas biomoléculas en esta y otras líneas celulares cancerosas.
7. En base a las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo de tesis de pregrado, la hipótesis propuesta fue parcialmente confirmada. Esto es, aun cuando los carotenoides de SGH1 mantienen la integridad de la membrana citoplasmática de los monocitos THP-1 y actúan intracelularmente como moléculas antioxidantes, ellos afectan y cambian la población de monocitos THP-1 desde células con alto potencial de membrana mitocondrial a células con un potencial medio.
8. Esta tesis ha permitido implementar un nuevo procedimiento experimental en el Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Antofagasta, que podrá ser usado con otras líneas celulares humanas (miocitos, células cancerosas y otras asociadas a enfermedades) para evaluar posibles aplicaciones de biomoléculas obtenidas de la microflora del Desierto de Atacama.
9. Parte de los resultados de esta tesis se han incluido en una reciente publicación en la revista *Frontiers in Microbiology* (5).

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Bull, A. T., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Gómez-Silva, B. (2016). The Atacama Desert: Technical Resources and the Growing Importance of Novel Microbial Diversity. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 215–234. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095236
2. Gómez-Silva, B. (2018). Lithobiontic life: “Atacama rocks are well and alive.” *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1333–1343. doi:10.1007/s10482-018-1033-9
3. Gramain, A., Díaz, G. C., Demergasso, C., Lowenstein, T. K., & McGenity, T. J. (2011). Archaeal diversity along a subterranean salt core from the Salar Grande (Chile). *Environmental Microbiology*, 13(8), 2105–2121. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02435.x
4. Chong Díaz, G., Mendoza, M., García-Veigas, J., Pueyo, J. J., & Turner, P. (1999). Evolution and geochemical signatures in a Neogene forearc evaporitic basin: the Salar Grande (Central Andes of Chile). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 151(1-3), 39–54. doi:10.1016/s0031-0182(99)00014-0
5. Flores N, Hoyos S, Venegas M, Galetović A, Zúñiga LM, Fábrega F, Paredes B, Salazar-Ardiles C, Vilo C, Ascaso C, Wierzchos J, Souza-Egipsy V, Araya JE, Batista-García RA and Gómez-Silva B. (2020). *Haloterrigena* sp. Strain SGH1, a Bacterioruberin-Rich, Perchlorate-Tolerant Halophilic Archaeon Isolated From Halite Microbial Communities, Atacama Desert, Chile. *Front. Microbiol.* 11:324. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00324>.

- 6.** Wierzchos, J., Ascaso, C., & McKay, C. P. (2006). Endolithic Cyanobacteria in Halite Rocks from the Hyperarid Core of the Atacama Desert. *Astrobiology*, 6(3), 415–422. doi:10.1089/ast.2006.6.415
- 7.** Gómez-Silva B (2010). On the Limits Imposed to Life by the Hyperarid Atacama Desert in Northern Chile. In: *Astrobiology: Emergence, Search and Detection of Life*. Chapter 9, pp. 199-213. VA Basiuk (Ed.). American Scientific Publishers, Los Angeles, CA, USA.
- 8.** Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 1–7. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00900.x
- 9.** Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Biología Molecular: La Célula*. Quinta Edición en español 2010
- 10.** Hoyos, S. A. (2016). Estudio fisiológico y taxonómico de *Haloterrigena* sp. SGH1, la primera arquea halófila aislada de halitas del Desierto de Atacama. Tesis de pregrado, para optar al título profesional de Bioquímico, Universidad de Antofagasta.
- 11.** Meléndez-Martínez, Antonio J, Vicario, Isabel M y Heredia, Francisco J. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57 (2), 109-117.
- 12.** Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228–237. doi:10.1096/fasebj.10.2.8641556
- 13.** Sánchez, A., Flores-Cotera, LB, Langley, E., Martín, R., Maldonado, G. y Sánchez, S. (1999). Carotenoides: Estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista latinoamericana de microbiología*, 41 (3), 175-191

- 14.** Flores N. (2017). Identificación y cuantificación de bacteriorrubrina, carotenoide producido por *Haloterrigena* sp. SGH1, una arquea halófila extrema asilada del Salar Grande, del norte de Chile. Tesis para optar al grado de Magister, Universidad de Antofagasta.
- 15.** Yoshimura, K., & Kouyama, T. (2008). Structural Role of Bacterioruberin in the Trimeric Structure of Archaeorhodopsin-2. *Journal of Molecular Biology*, 375(5), 1267–1281. doi:10.1016/j.jmb.2007.11.039
- 16.** Jagannadham, M. V., Chattopadhyay, M. K., & Shivaji, S. (1996). The Major Carotenoid Pigment of a Psychrotrophic *Micrococcus roseus* Strain: Fluorescence Properties of the Pigment and Its Binding to Membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220(3), 724–728. doi:10.1006/bbrc.1996.0471
- 17.** Chattopadhyay, M. K., Jagannadham, M. V., Vairamani, M., & Shivaji, S. (1997). Carotenoid Pigments of an Antarctic Psychrotrophic Bacterium *Micrococcus Roseus*: Temperature Dependent Biosynthesis, Structure, and Interaction with Synthetic Membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(1), 85–90. doi:10.1006/bbrc.1997.7433
- 18.** Jagannadham M. V. (1998). Adaptation of bacteria to low temperatures: the role of carotenoid pigments. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Centre, for Cellular and Molecular Biology. Jawaharlal Nehru University New Delhi, India.
- 19.** Venegas M. Tesis de Pregrado. Bacteriorrubrina, un carotenoide producido por la arquea halófila extrema *Haloterrigena* sp. SGH1. 2019

- 20.** Rioja Antezana Alejandra P., Vizaluque Beatriz E., Aliaga-Rossel Enzo, Tejeda Leslie, Book Olof, Mollinedo Patricia, Peñarrieta J. Mauricio (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de chenopodium quinoa, Revista Boliviana de Química, vol. 35, núm. 5, 2018. Universidad Mayor de San Andrés.
- 21.** FRAP Assay Kit (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay). <https://www.abcam.com/frap-assay-kit-ferric-reducing-antioxidant-power-assay-ab234626.html#:~:text=The%20FRAP%20assay%20is%20high,antioxidants%20present%20in%20the%20samples.>
- 22.** Rodríguez Aguirre Oscar Eduardo, Andrade Barreiro William Alejandro, Diaz López Fabio Eduardo (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). Revista de Tecnología | Journal of Technology | Volumen 14 | Número 2 | Págs. 21-36.
- 23.** Tarik Lazrak, Genevieve Wolff, Anne-Marie Albrecht, Yoichi Nakateni, Guy Ourisson and Morris Kates. Bacterioruberin reinforce reconstituted Halobacterium lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 939 (1988) 160-162. Elsevier
- 24.** https://www.biopedia.com/organismos%20modelos/?fbclid=IwAR0VOd1cOW8W%20FcLMAqDXUxOtoVlODOixQSTn4oRpvFu%207CynBIGL9oQKN_Y
- 25.** Tolosa Amparo, Genética Médica News. Importancia de la validación de las líneas celulares utilizadas en investigación. Septiembre 16, 2016
- 26.** Castaño O. María E. y Zapata J. Juan C. Principios de virología, tercera edición., Capítulo 4: Cultivos Celulares

- 27.** Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980 Aug;26(2):171-6. doi: 10.1002/ijc.2910260208. PMID: 6970727.
- 28.** Patel, P., Kansara, K., Singh, R., Shukla, R. K., Singh, S., Dhawan, A., & Kumar, A. (2018). Cellular internalization and antioxidant activity of cerium oxide nanoparticles in human monocytic leukemia cells. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 39–41. doi:10.2147/ijn.s124996
- 29.** https://bioquochem.com/es/producto/sonda-dcfh-da/?fbclid=IwAR16-_qj1BJfJUoR9qftTXugMDJtiAkxg602za4Xq4IbNUmWjAd-QxSHPaE
- 30.** Rodríguez-Amaya DB. Carotenoides y Preparación de alimentos: La retención de los carotenoides Provitamina A: En: Alimentos preparados, procesados y almacenados. OMNI Project, Brazil. 1999.
- 31.** Carranco Jáuregui María Elena, Ma. de la Concepción Calvo Carrillo, Fernando Pérez-Gil Romo. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Volumen 61, No. 3, Año 2011.
- 32.** Zalazar, L., Pagola, P., Miró, M. V., Churio, M. S., Cerletti, M., Martínez, C., ... De Castro, R. (2018). Bacterioruberin extracts from a genetically modified hyperpigmented *Haloferax volcanii* strain: Antioxidant activity and bioactive properties on sperm cells. *Journal of Applied Microbiology*.doi:10.1111/jam.14160
- 33.** Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. L. (2018). Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Frontiers in Pharmacology*, 9.doi:10.3389/fphar.2018.00392

- 34.** Córdova Izquierdo A. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3 (1) 2009: 01-38
- 35.** Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, and F. Traganos (1992). Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. The Cancer Research Institute, New York Medical College, Valhalla, New York 10595. *Cytometry* 13:795-808 (1992).
- 36.** Barrera Ramírez, Lourdes María, Drago Serrano, MA. Elisa, Pérez Ramos, Julia, Sainz Espuñes, Teresita Del Rosario, Zamora, Ana Cecilia, Gómez Arroyo, Fabiola, & Mendoza Pérez, Felipe. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55.
- 37.** Ljubava D. Zorova, Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis. N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, Savva D. Zorov, Anastasia V. Balakireva, Magdalena Juhaszova, Steven J. Sollott, Dmitry B. Zorov. Mitochondrial membrane potential (2018). *Analytical Biochemistry*. Volume 552, 1 July 2018, Pages 50-59. 10.1016/j.ab.2017.07.009
- 38.** Rottenberg, H., & Wu, S. (1998). Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1404(3), 393–404. doi:10.1016/s0167-4889(98)00088-3
- 39.** Seth W. Perry, John P. Norman, Justin Barbieri, Edward B. Brown, and Harris A. Gelbard (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* 50:98-115 (February 2011) doi 10.2144/000113610.

- 40.** Dikalov, S., Griending, K. K., & Harrison, D. G. (2007). Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension*, 49(4), 717–727. doi:10.1161/01.hyp.0000258594.87211.6b
- 41.** Wang, Q., & Zou, M.-H. (2018). Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) and Mitochondrial ROS in AMPK Knockout Mice Blood Vessels. *AMPK*, 507–517. doi:10.1007/978-1-4939-7598-3_32
- 42.** Huang L. S., Cobessi D., Tung E. Y., Berry E. A. (2005) Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J. Mol. Biol.* 351, 573-597.
- 43.** Ma, X., Jin, M., Cai, Y., Xia, H., Long, K., Liu, J., ... Yuan, J. (2011). Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy. *Chemistry & Biology*, 18(11), 1474–1481. doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.009
- 44.** Lin, C.-C., Su, T.-H., & Wang, T.-S. (2009). Protein Carbonylation in THP-1 Cells Induced by Cigarette Smoke Extract via a Copper-Catalyzed Pathway. *Chemical Research in Toxicology*, 22(7), 1232–1238. doi:10.1021/tx900008h
- 45.** Kaur, P., Evje, L., Aschner, M., & Syversen, T. (2010). The in vitro effects of Trolox on methylmercury-induced neurotoxicity. *Toxicology*, 276(1), 73–78. doi:10.1016/j.tox.2010.07.006
- 46.** Davargaon, R. S., Sambe, A. D., & Muthangi V V, S. (2019). Trolox prevents high glucose-induced apoptosis in rat myocardial H9c2 cells by regulating GLUT-4 and antioxidant defense mechanism. *IUBMB Life*. doi:10.1002/iub.2133

- 47.** Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., ... Nakamura, S. (2014). Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00100
- 48.** Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M., & Martínez-Espinosa, R. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology. *Marine Drugs*, 13(9), 5508–5532. doi:10.3390/md13095508
- 49.** Giani, M., Garbayo, I., Vílchez, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2019). Haloarchaeal Carotenoids: Healthy Novel Compounds from Extreme Environments. *Marine Drugs*, 17(9), 524. doi:10.3390/md17090524
- 50.** Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. doi:10.5772/intechopen.71923
- 51.** Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., & Morana, A. (2017). Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 21(5), 933–945. doi:10.1007/s00792-017-0954-y
- 52.** Hou, J., & Cui, H.-L. (2017). In Vitro Antioxidant, Antihemolytic, and Anticancer Activity of the Carotenoids from Halophilic Archaea. *Current Microbiology*, 75(3), 266–271. doi:10.1007/s00284-017-1374-z
- 53.** Abbes, M., Baati, H., Guerhazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1). doi:10.1186/1472-6882-13-255

- 54.** Sikkandar, Shahitha & Kasi, Murugan & Al-Sohaibani, Saleh & Rayappan, Flora & Nair, Aneesh & Tilton, Florida. (2013). Halophilic Bacteria-A Potent Source of Carotenoids with Antioxidant and Anticancer Potentials. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 7. 2825-2830.
- 55.** Ronnekleiv, M. (1995). Bacterial carotenoids 53* C50-carotenoids 23; carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(6), 627–634. doi:10.1016/0305-1978(95)00047-x
- 56.** Hegazy, G. E., Abu-Serie, M. M., Abo-Elela, G. M., Ghozlan, H., Sabry, S. A., Soliman, N. A., & Abdel-Fattah, Y. R. (2020). In vitro dual (anticancer and antiviral) activity of the carotenoids produced by haloalkaliphilic archaeon *Natrialba* sp. M6. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-62663-y
- 57.** Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51. doi:10.1016/0022-1759(95)00072-i
- 58.** Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., & Gelbard, H. A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, 50(2), 98–115. doi:10.2144/000113610
- 59.** BD Pharmingen™ MitoStatus Reagents Assessing Mitochondrial Membrane Potential on the BD Accuri™ C6 Flow Cytometer.
https://uni-chem.rs/download/BD_Pharmingen_MitoStatus_reagensi.pdf
- 60.** Shin, J., Song, M.-H., Oh, J.-W., Keum, Y.-S., & Saini, R. K. (2020). Pro-Oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence. *Antioxidants*, 9(6), 532. doi:10.3390/antiox9060532

- 61.** Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, A. M. S., Carvalho, F., & Fernandes, E. (2018). Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 681–699. doi:10.1016/j.fct.2018.07.060 59 shi et al 2020.
- 62.** Barrera Ramírez, Lourdes María, Drago Serrano, Ma. Elisa, Pérez Ramos, Julia, Sainz Espuñes, Teresita Del Rosario, Zamora, Ana Cecilia, Gómez Arroyo, Fabiola, & Mendoza Pérez, Felipe. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55.
- 63.** McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

ANEXO 1: Medio de cultivo para Haloterrigena sp. SGH1.**Protocolo preparación de medio de cultivo Z8 MOD**

Se utilizan 4 tipos de soluciones stock en un litro

Solución Stock I

| | |
|--|--------|
| NaNO ₃ | 46.7 g |
| Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O | 5.9 g |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 2.5 g |

Disolver en un litro de agua destilada

Solución Stock II

| | |
|---------------------------------|-------|
| K ₂ HPO ₄ | 3.1 g |
| Na ₂ CO ₃ | 2.1 g |

Disolver en un litro de agua destilada

Solución Stock III

Fe- solución: 2.80 g FeCl₃•6H₂O disolver en 100 mL 0.1 N HCl

EDTA- solución: 3.90 g EDTA-Na₂ disolver en 100 mL 0.1 N NaOH

10 mL de la Fe-solución se disuelven en c. 900 mL dH₂O.

Luego añadir 9.5 mL de EDTA-solución, y llenar hasta un litro.

Solución Stock IV

| | | |
|-----|---|------------------|
| 1. | $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.330 g/100 mL |
| 2. | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.880 g/100 mL |
| 3. | KBr | 1.20 g/100 mL |
| 4. | KI | 0.83 g/100 mL |
| 5. | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2.87 g/100 mL |
| 6. | $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.55 g/100 mL |
| 7. | $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1.46 g/100 mL |
| 8. | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1.25 g/100 mL |
| 9. | $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1.98 g/100 mL |
| 10. | $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 0.410 g/100 mL |
| 11. | V_2O_5 | 0.0890 g/1000 mL |
| 12. | $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 4.74 g/100 mL |
| 13. | H_3BO_3 | 3.10 g |
| | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 1.60 g /1000 mL |

Agregue 1 ml de las soluciones 1-10 y 12, y 10 ml de la solución 11 y 100 ml de la solución 13 a 700 ml de H_2O destilada. Diluir a 1 litro con H_2O destilada.

Se utilizan 4 tipos de soluciones stock en un litro

Solución Z8 I, 10 mL

Solución Z8 II, 10 mL

Solución Z8 III, 10 mL

Solución Z8 IV, 1 mL

Adicionalmente se le agrega:

50 mM KCl (peso molecular 74,55 g/mol)

250 g NaCl (de esta manera queda al 25% NaCl en un litro)

Se prepara 10 g Cas aminoácido en 50 mL de agua destilada y de esta solución preparada se agrega 1 mL cada 40 mL de medio Z8 MOD (Este último paso solo al momento de llevar a cultivo).

ANEXO 2: Cultivo de monocitos THP-1 (ATCC® TIB-202™)

Medio de crecimiento completo

El medio base para esta línea celular es Medio RPMI-1640 formulado por ATCC, N° de catálogo 30-2001. Para hacer el medio de crecimiento completo, se agregan los siguientes componentes al medio base: 2-mercaptoetanol hasta una concentración final de 0.05 mM; suero fetal bovino hasta una concentración final del 10%.

Condiciones de cultivo

Atmósfera: aire, 95%; dióxido de carbono (CO₂), 5%

Temperatura: 37,0 ° C

Protocolo de subcultivo

Los cultivos se pueden mantener mediante la adición de medio fresco o la sustitución del medio.

Alternativamente, los cultivos se pueden establecer por centrifugación con resuspensión posterior a $2-4 \times 10^5$ células viables/ml. Subcultivar cuando la concentración celular alcance 8×10^5 células/mL. La concentración celular no debe exceder 1×10^6 células / mL.

Se recomiendan los matraces Corning® T-75 (catálogo # 431464) para subcultivar este producto.

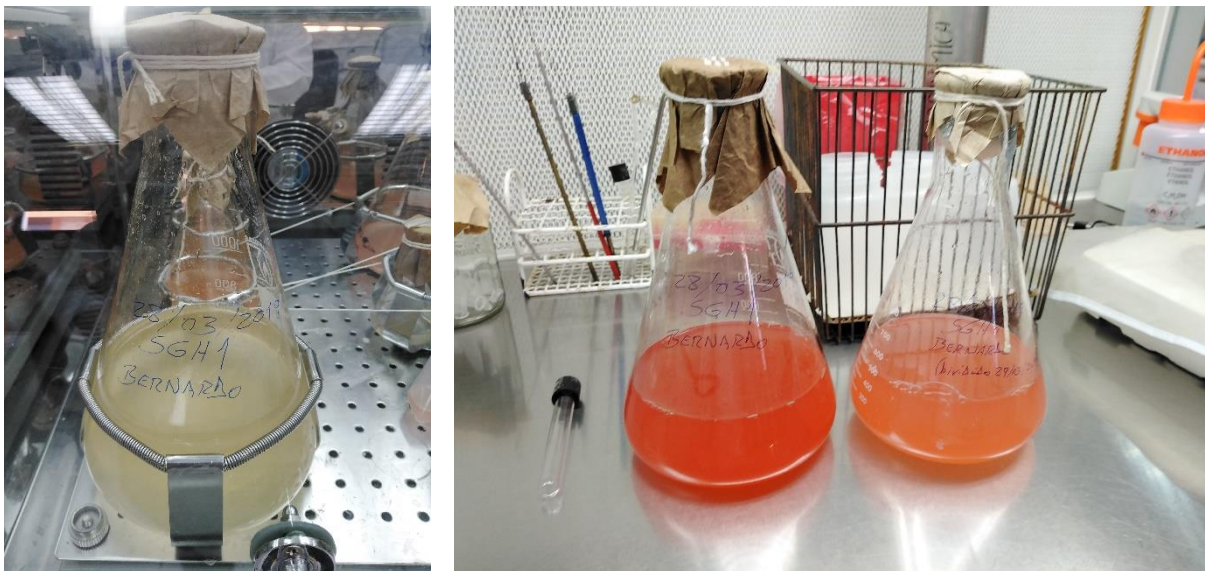
Renovación media: cada 2 a 3 días

Criopreservación

Medio de congelación: medio de crecimiento completo suplementado con DMSO al 5% (v/v)

Temperatura de almacenamiento: -196°C (nitrógeno líquido).

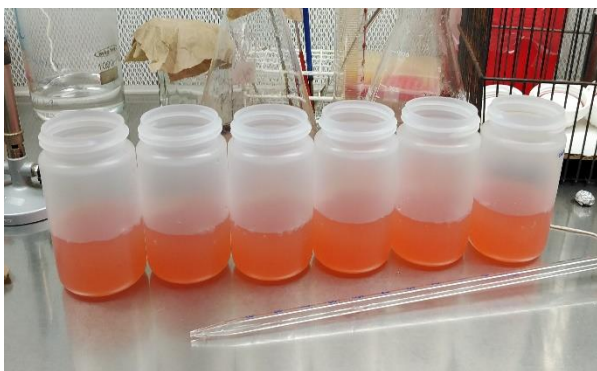
ANEXO 3: Imágenes sobre el cultivo y obtención de carotenoides de *Haloterrigena* sp. SGH1.



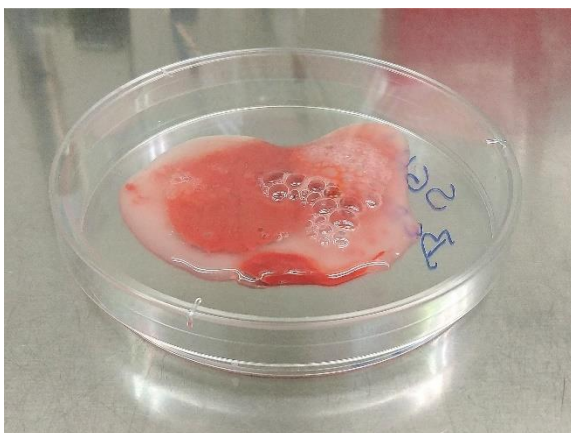
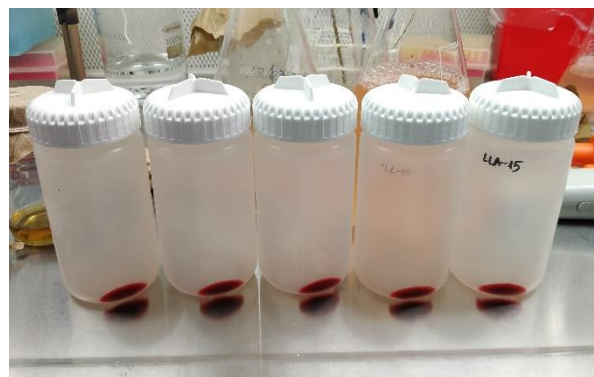
Etapas del cultivo inicial de 500 mL



Cultivo de 10 Litros



Proceso de centrifugado para concentrar el pellet



Pellet antes de liofilizar



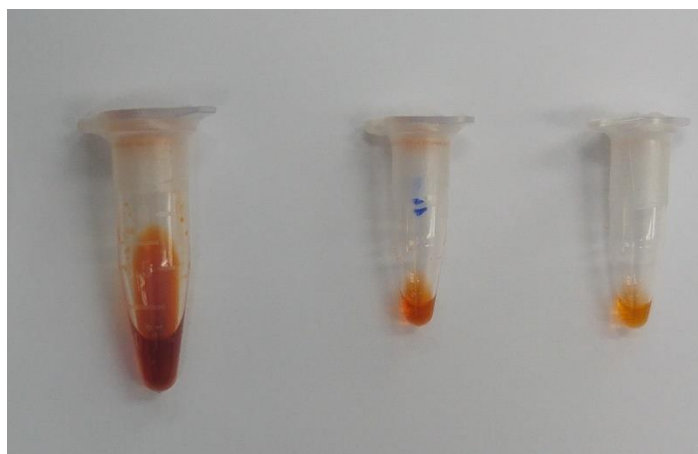
Pellet después de liofilizar



Obtención de extracto metanólico por centrifugación, a partir de la biomasa liofilizada



Presencia de cristales de NaCl en el extracto Metanólico durante la extracción de carotenoides



Extracto crudo y ejemplo de dos fracciones HPLC luego de la eliminación parcial de metanol mediante Speedback.

ANEXO 4: Descripción de la metodología de citometría de flujo.

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar rápidamente células o partículas individuales suspendidas en una solución salina tamponada a medida que pasan alineadas e individualmente frente a un emisor de luz laser de excitación con filtros para diferentes longitudes de onda o un emisor de luz visible.

El tamaño y complejidad de cada célula o partícula puede ser analizada mediante la dispersión de la luz visible. La dispersión de luz visible se mide en dos direcciones diferentes, la dirección de avance (dispersión hacia adelante o FSC) que puede indicar el tamaño relativo de la célula, y a 90 ° (dispersión lateral o SSC) que indica la complejidad interna o granularidad celular (60).

Además, el citómetro permite medir la emisión de luz fluorescente usando fluorocromos agregados a las células o partículas luego de ser excitados por luz laser (59, 60). La dispersión de la luz es independiente de la fluorescencia. Las muestras se preparan para la medición de la fluorescencia mediante la transfección y expresión de proteínas fluorescentes (por ejemplo, Proteína verde fluorescente, GFP), tinción con tintes fluorescentes (Yoduro de propidio, ADN) o tinción con anticuerpos conjugados de forma fluorescente (CD3 FITC). Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas usando un programa computacional proporcionado por el fabricante del equipo (59, 60).