



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA  $\alpha$ -MANGOSTINA SOBRE LA NEUROTOXICIDAD  
INDUCIDA POR ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO EN CULTIVOS  
PRIMARIOS DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE  
RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**LAURA MARÍA REYES FERMIN**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE</b>	Profesora: <b>Lucía Cornejo Barrera</b>
<b>VOCAL</b>	Profesor: <b>José Pedraza Chaverri</b>
<b>SECRETARIO</b>	Profesora: <b>Perla Carolina Castañeda López</b>
<b>1er. SUPLENTE</b>	Profesora: <b>Perla Deyanira Maldonado Jiménez</b>
<b>2do. SUPLENTE</b>	Profesora: <b>Yolanda Irasema Chirino López</b>

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 209, segundo piso, edificio F, Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. José Pedraza Chaverri

**SUPERVISORA TÉCNICA:**

---

M. en C. Marisol Orozco Ibarra

**SUSTENTANTE:**

---

Laura María Reyes Fermin

## **Agradecimientos**

Al Doctor José Pedraza Chaverri por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por la paciencia que me tuvo durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Marisol Orozco Ibarra por el asesoramiento, enseñanza, apoyo y comprensión durante este tiempo.

A la M. en C. Lucía Cornejo Barrera por ser parte del jurado calificador y por que ser una persona muy importante en la carrera de Q. A.

Al jurado calificador: Dra. Perla Carolina Castañeda López, Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez y Dra. Yolanda Irasema Chirino López.

Por el donativo otorgado por DGAPA (IN207007) y por CONACYT (48812M) para la realización del presente trabajo.

## **Dedicatorias**

A Rosario y Raymundo, por permitirme ser parte de tan bonita familia. Por su tiempo, dedicación, cuidados y entrega. Gracias los quiero mucho.

A Mirian, Mayra y Norma por acompañarme en el transcurso de mi vida.

A Ismael por haber sido una parte importante en la toma de decisiones de mi vida y por estar a mi lado.

A mis amigos de primer semestre y a los que fui formando durante el transcurso de estos años. Chicas que bueno que las conocí.

A Irasema y Omar por ayudarme cuando lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio porque hacen que el laboratorio permanezca vivo. A Silvia, Susy y Eva por el apoyo brindado.

A la UNAM y a mis valiosos profesores. Gracias por el espacio, tiempo y conocimientos.

A la vida misma por dejarme aún estar aquí.

# Índice

	Página
1. Resumen.....	1
2. Antecedentes	
2.1 <i>Garcinia mangostana</i> Lin.....	2
2.1.2 Xantonas y $\alpha$ -mangostina.....	2
2.2 Ácido 3-nitropropiónico.....	5
2.3 Especies reactivas de oxígeno y sistema antioxidante...	6
3. Justificación.....	8
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivos.....	8
6. Materiales y métodos.....	9
7. Resultados y discusión.....	13
8. Conclusiones.....	21
9. Perspectivas.....	21
10. Referencias.....	22

## Abreviaturas

<b>ANOVA</b>	<b>Análisis de varianza</b>
<b>Carboxi-DCF</b>	<b>5-(y 6-) Carboxi -2', 7'-diclorofluoresceina</b>
<b>Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	<b>Diacetato de 5-(y 6-) carboxi -2', 7'-diclorofluoresceina</b>
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>Concertación inhibitoria al 50%</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetil sulfóxido</b>
<b>DIV</b>	<b>Días <i>in vitro</i></b>
<b>EEM</b>	<b>Error estándar de la media</b>
<b>Et</b>	<b>Etidio</b>
<b>GM</b>	<b><i>Garcinia mangostana</i> Lin.</b>
<b>HE</b>	<b>Dihidroetidio</b>
<b>HEt</b>	<b>Hidroetidio</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>LDL</b>	<b>Lipoproteínas de baja densidad</b>
<b>MBE</b>	<b>Medio basal Eagle</b>
<b>MTT</b>	<b>Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio</b>
<b>NGC</b>	<b>Neuronas granulares de cerebello de rata</b>
<b>NMDA</b>	<b><i>N</i>-metil-<i>D</i>-aspartato</b>
<b>3-NP</b>	<b>Ácido 3-nitropropiónico</b>
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxígeno singulete</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	<b>Radical anión superóxido</b>
<b><sup>•</sup>OH</b>	<b>Radical hidroxilo</b>
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	<b>Peroxinitrito</b>
<b>ROO<sup>•</sup></b>	<b>Radical peroxilo</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>RNS</b>	<b>Especies reactivas de nitrógeno</b>
<b>SDH</b>	<b>Succinato deshidrogenasa</b>

## 1. Resumen

El mangostán (*Garcinia mangostana* Lin) (GM) pertenece a la familia Guttiferae, es un árbol tropical de hoja perenne de crecimiento lento. La cáscara de la fruta de GM se ha usado durante siglos en la medicina tradicional del Sudeste de Asia para el tratamiento de infecciones superficiales, heridas, disentería y diarrea. Diversos estudios han sugerido que el efecto medicinal se debe principalmente a metabolitos secundarios llamados xantonas, que se encuentran presentes en hojas, tallo, tronco y en mayor cantidad en la cáscara de la fruta. La xantona que se ha aislado con mayor rendimiento de la cáscara de la fruta es la  $\alpha$ -mangostina, y se ha sugerido que ésta posee capacidad antioxidante en algunos modelos *in vivo* e *in vitro*.

Por otro lado, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es un compuesto que provoca daño neurotóxico, ya que inhibe de manera covalente a la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), ocasionando un aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), estrés oxidante, y finalmente muerte neuronal.

Por lo tanto, si la  $\alpha$ -mangostina presenta capacidad antioxidante podría prevenir el daño neuronal y la producción de ROS inducidas por 3-NP. Por lo que se consideró como objetivo principal estudiar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre la neurotoxicidad del 3-NP en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC), bajo distintos tratamientos: 1) incubadas con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina e 2) incubadas con  $\alpha$ -mangostina y 3-NP (2 mM). Debido a que se encontró efecto protector de la  $\alpha$ -mangostina se procedió a buscar si 3) la producción de ROS estaba involucrada en dicho efecto.

Se encontró que la  $\alpha$ -mangostina no afecta la viabilidad celular de NGC hasta 14  $\mu$ M. Además se observó efecto protector de la  $\alpha$ -mangostina dependiente de la concentración en la neurotoxicidad por 3-NP, siendo el mayor efecto a la concentración de 12  $\mu$ M de  $\alpha$ -mangostina. Se encontró también, que el efecto neuroprotector de la  $\alpha$ -mangostina se asocia con una disminución en la producción de ROS inducida por 3-NP, observándose una disminución de hasta 90%. Lo anterior confirma la capacidad antioxidante de la  $\alpha$ -mangostina.

Por lo que se puede concluir que la  $\alpha$ -mangostina no afecta la viabilidad de NGC hasta 14  $\mu$ M. Además, presenta efecto protector frente a la neurotoxicidad inducida por 3-NP de manera dependiente de la concentración, y parte del mecanismo de protección se debe a que la  $\alpha$ -mangostina es capaz de inhibir la producción de ROS.



## 2. Antecedentes

### 2.1. *Garcinia mangostana* Lin.

El mangostán (*Garcinia mangostana* Lin) (GM) pertenece a la familia Guttiferae, es un árbol tropical de hoja perenne de crecimiento lento (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008). El árbol del mangostán logra alcanzar de 6 a 25 m de altura, dando las primeras frutas después de 6 años. Completamente madura, esta fruta tiene una cáscara gruesa, de color marrón rojizo hasta violeta-púrpura, a menudo difícil de abrir, en el interior se encuentra la pulpa de color blanco, textura blanda y, sabor agridulce, exótico y refrescante (Jung *et al.*, 2006), por lo que en Asia es conocida como la “Reina de las Frutas” (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008).

GM es originario del sudeste de Asia (Ji *et al.*, 2007), pero también se cultiva en el norte de Australia, Brasil, Centroamérica, Hawái, sur de India, Indonesia, Malasia, Tailandia, y otros países tropicales (Mahabusarakam, 1987; Jung *et al.*, 2006).

La cáscara de la fruta de GM se ha usado durante siglos en la medicina tradicional en el Sudeste de Asia para el tratamiento de infecciones superficiales, heridas, disentería y diarrea (Mahabusarakam, 1987; Williams *et al.*, 1995; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008).

Además de un poco de vitamina C, GM contiene entre otros componentes como calcio, fósforo e hierro, altas concentraciones de xantonas, una clase de compuestos polifenólicos que se ha sugerido presentan propiedad antibacteriana (Sakagami *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Chomnawang *et al.*, 2007), neuroprotectora (Weecharangsan *et al.*, 2006), antitumoral (Nabandith *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2006; Suksamrarn *et al.*, 2006), antioxidante (García *et al.*, 2005; Weecharangsan *et al.*, 2006), entre otras propiedades.

Las xantonas no son las únicas sustancias biológicamente activas en GM ya que también se encuentran catequinas y otros polifenoles, que son poderosos antioxidantes pero que están presentes en bajas concentraciones.

#### 2.1.2. Xantonas y $\alpha$ -mangostina.

El término xantona (griego *xantos*=amarillo) designa a un grupo de compuestos químicos dibenzo- $\gamma$ -pirona (Roberts, 1961), los cuales son metabolitos secundarios encontrados en la naturaleza en un grupo restringido de plantas superiores, hongos y líquenes.

Su estructura se compone de un sistema aromático de tres anillos (Fig. 1) el cual se puede sustituir con grupos como fenol, metoxilo, isopreno, hidroxilo, etc., generando una gran variedad de derivados (Walker, 2007).

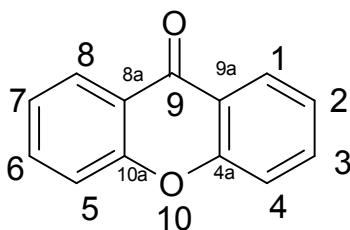


Figura 1. Estructura base de las xantonas.

Por lo que las xantonas se pueden clasificar en 5 grandes grupos: a) xantonas simples oxigenadas (sustituidas generalmente con grupos hidroxilo, metoxilo o metilo), b) xantonas glicosiladas (tienen un residuo de glucosa, xilosa, arabinosa, etc.), c) xantonas preniladas (tienen un grupo prenilo y constituyen el mayor número en la naturaleza) y sus derivados, d) xantolignoides, y e) xantonas misceláneas. (Vieira y Kijjoa, 2005; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008).

Diversos autores al aislar las xantonas de la cáscara de la fruta han encontrado que la  $\alpha$ -mangostina es la xantona que se encuentra en mayor concentración (Jung *et al.*, 2006; Suksamrarn *et al.*, 2006; Walker, 2007).

La  $\alpha$ -mangostina (Fig. 2) es un compuesto cristalino de color amarillo brillante, ópticamente inactivo, de punto de fusión de 182-183°C (Yates y Stout, 1958; Ee *et al.*, 2006), peso molecular de 410 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub>, soluble en una gran variedad de disolventes orgánicos. Fue aislada por primera vez de la cáscara de la fruta por Schmid en 1855, con un rendimiento del 30-50% (Yates y Stout, 1958) y en 1968 se dilucidó su estructura (Yates y Bhat, 1968).

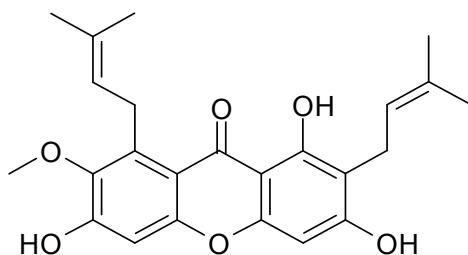


Figura 2. Estructura de la  $\alpha$ -mangostina

La  $\alpha$ -mangostina ha tenido un gran interés en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* porque se ha sugerido que es responsable de diversas actividades biológicas, entre ellas la capacidad antioxidante. Algunas publicaciones científicas en las que se reporta la capacidad antioxidante de este compuesto son las que se mencionan a continuación:

- 1) En 1995, Williams y colaboradores aportaron la primer evidencia de que la  $\alpha$ -mangostina inhibe *in vitro* la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mediada por cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y AAPH (compuesto que genera radical peroxilo). La adición de  $\alpha$ -mangostina después de iniciada la oxidación de LDL, inhibió la formación de dienos conjugados y produjo una disminución en la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico de manera dependiente de la concentración.
- 2) En el año 2000, Mahabusarakam y colaboradores evaluaron el efecto de derivados de la  $\alpha$ -mangostina, en el mismo modelo de oxidación de LDL que el usado por Williams y colaboradores en 1995, para explorar la funcionalidad del grupo hidroxilo y prenilo en la actividad antioxidante. Concluyeron que los grupos hidroxilo de los carbonos 3 y 6 no son necesarios en la actividad antioxidante, ya que al sustituirse con derivados aminoetilo se mejora dicha actividad. También encontraron que la ciclación tiene una pequeña influencia en la actividad antioxidante. Aunque no quedó claro el mecanismo por el cual la  $\alpha$ -mangostina inhibe la oxidación de LDL.
- 3) En el año 2006, Jung y colaboradores evaluaron la capacidad antioxidante de xantonas aisladas de la cáscara de GM, una de ellas la  $\alpha$ -mangostina, la cual presentó capacidad atrapadora *in vitro* de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Adicionalmente, se evaluó la capacidad de inhibir los efectos del compuesto 7,12-dimetilbenzo[ $\alpha$ ]antraceno, el cual provoca lesiones preneoplásicas en cultivo mamario de ratón, obteniendo una concentración inhibitoria al 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) de 1.0 g/mL, lo que sugiere la eficacia de la  $\alpha$ -mangostina en este modelo.
- 4) En el año 2007, Devi Sampath y Vijayaraghavan evaluaron el efecto de la  $\alpha$ -mangostina *in vivo* en el sistema antioxidante, al evaluar la actividad de enzimas antioxidantes y la lipoperoxidación inducidos por isoproterenol en ratas. Los resultados sugieren que la  $\alpha$ -mangostina protege de la lipoperoxidación, daño cardíaco y restablece la defensa antioxidante.

## 2.2. Ácido 3-nitropropiónico.

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (Fig. 3) es una toxina que se encuentra en la naturaleza en varias plantas y hongos. Este compuesto cuando se administra *in vivo*, produce neurodegeneración preferencialmente en el estriado pero también en otras partes del cerebro, ya que la distribución de la toxina es hacia la estructura cerebral (Brouillet *et al.*, 2005).

Este compuesto forma un enlace covalente con la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que se localiza en la membrana interna mitocondrial y que forma parte tanto del ciclo de Krebs como de la cadena de transporte de electrones. Se piensa que debido a esto produce estrés oxidante y daño metabólico (Olsen *et al.*, 1999; Gabrielson *et al.*, 2001).

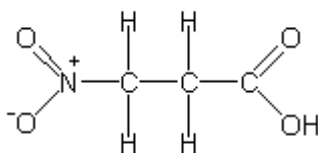


Figura 3. Estructura del 3-NP.

Adicionalmente, se ha sugerido que la neurotoxicidad inducida por 3-NP se debe a la activación del receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), entrada de calcio, disminución del potencial de membrana y de los niveles de ATP así como, la formación de ROS, entre ellas el radical anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito (Riepe *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1999; Brouillet *et al.*, 2005; Mandavilli *et al.*, 2005). Además se ha observado una disminución en el nivel intracelular de glutatión, lo cual probablemente contribuye al daño oxidativo (Olsen *et al.*, 1999), y se ha postulado que estos eventos pueden desencadenar la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis (Mandavilli *et al.*, 2005).

Además, el uso de compuestos atrapadores de ROS como el *N*-*t*-butil- $\alpha$ -fenilnitron (PBN) previene la muerte celular en NGC tratadas con 3-NP (Olsen, 1999). Por otro lado la sobreexpresión de proteínas proapoptóticas Bcl-2 inhibe la formación de ROS inducidas por el tratamiento con 3-NP, y con ello la disminución en la viabilidad celular de células de feocromocitoma de rata (Mandavilli *et al.*, 2005). También se ha observado que la liberación del factor nuclear- derivado 2 eritroide (Nrf2), el cual sobrerregula la expresión de genes citoprotectores antioxidantes, combate el estrés oxidante provocado por 3-NP en modelos *in vivo* e *in vitro* (Calkins *et al.*, 2005; Shis *et al.*, 2005).

### 2.3 Especies reactivas de oxígeno y sistema antioxidante.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son una gran variedad de moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno. Pueden ser o no radicales libres (especies que poseen uno o más electrones desapareados). Las ROS pueden existir de forma independiente y reaccionar fácilmente con proteínas, lípidos y ADN (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

La reducción univalente del oxígeno produce intermediarios inestables (Fig. 5).

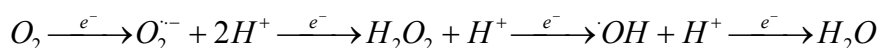


Figura 5. Reducción univalente del oxígeno.

El radical anión superóxido  $O_2^{\bullet -}$ , es el primer intermediario formado y éste es a su vez es el precursor de otras ROS. La enzima que se encarga de eliminar esta ROS es la superóxido dismutasa, la cual lleva a cabo la reacción de dismutación del  $O_2^{\bullet -}$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Fig. 6). Por su parte, el  $H_2O_2$  puede ser reducido completamente a agua, por la acción de la enzima catalasa o la enzima glutatión peroxidasa (Fig. 6) o ser reducido parcialmente por metales de transición a radical hidroxilo  $\cdot OH$  en la reacción de Fenton (Fig. 7).

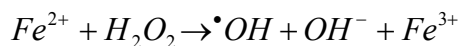


Figura 7. Reacción de Fenton

El  $\cdot OH$  es considerado como uno de los compuestos mayormente oxidantes en la naturaleza, debido a que reacciona fácilmente con las moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN, y cuando este radical se genera cerca de las membranas biológicas, puede reaccionar con los ácidos grasos y producir hidroperóxidos que se descomponen en una serie de compuestos tóxicos como aldehídos (Eberhardt, 2000; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Adicionalmente el  $O_2^{\bullet -}$  puede reaccionar con otros radicales como el óxido nítrico dando como producto peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Fig. 6), considerado dentro de las especies reactivas de nitrógeno (RNS). El  $ONOO^-$  es un oxidante muy poderoso, ya que se ha sugerido que el daño involucra varios efectos como peroxidación de lípidos, estrés oxidante, disminución en las defensas antioxidantes y daño al ADN. Por otro lado se sabe que bajas concentraciones de  $ONOO^-$  pueden activar muerte celular por apoptosis,

y concentraciones superiores pueden conducir a necrosis (Turrens, 2003; Santiago-López et al., 2004).

Como se ha visto el organismo cuenta con enzimas antioxidantes para mantener el balance de ROS y RNS aunque también, el consumo de antioxidantes en la dieta provee de defensas para el organismo. Algunos de estos antioxidantes exógenos no enzimáticos son:

- Los carotenos, son compuestos liposolubles que pueden reaccionar con  $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$ , oxígeno singulete ( $O_2^1$ ) (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Aunque su principal función es ser precursores de la vitamina A.

- La vitamina C (ácido ascórbico) es un poderoso antioxidante porque puede donar un átomo de hidrógeno y formar un radical libre estable (Koc *et al.*, 2008). Además, es capaz de atrapar  $O_2^{\bullet-}$  y radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ) (Dikalov et al., 2008).

- La vitamina E es un compuesto liposoluble que al entrar en el organismo permanece en las membrana biológicas y es capaz de atrapar  $O_2^{\bullet-}$  y  $ROO^{\bullet}$ , pero en menor eficacia que la vitamina C (Dikalov *et al.*, 2008), e inhibir las reacciones en cadena de la oxidación de lípidos de la membrana (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999; Wang y Quinn, 1999).

- Los polifenoles, que incluyen a los flavonoides, los ácidos fenólicos y los estilbenos. Son compuestos que pueden atrapar  $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$  y radicales lipídicos. Adicionalmente los polifenoles son quelantes de iones metálicos como  $Cu^{2+}$  previniendo su participación en la reacción de Fenton y la generación de  $OH^{\bullet}$ . (Zou *et al.*, 2004; Sies *et al.*, 1992).

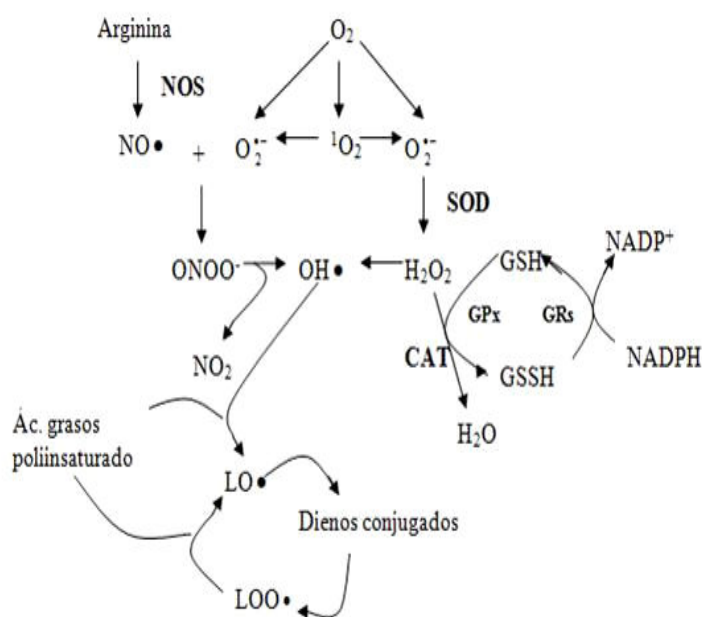


Figura 6. Resumen de producción de ROS, RNS y la reacción llevada a cabo por algunas enzimas del sistema antioxidante.

NOS= sintasa de óxido nítrico, SOD=superóxido dismutasa, CAT=catalasa, GPx=glutación peroxidasa, GRs= glutación reductasa, GSH= glutación reducido, GSSG= glutación oxidado,  $^1O_2$ =oxígeno singulete,  $LO^{\bullet}$ =radical alcoxido,  $LOO^{\bullet}$ =radical hidroperóxido.

### **3. Justificación**

Se ha sugerido que la  $\alpha$ -mangostina tiene propiedades antioxidantes pues es capaz de disminuir el estrés oxidante en algunos modelos de estudio. Por otro lado, parte del mecanismo por el cual algunas moléculas como el 3-NP provocan daño es por la generación de ROS y estrés oxidante, por lo que la disminución de éstas puede aminorar el daño que generan dichas moléculas. Por lo anterior se espera que un tratamiento con  $\alpha$ -mangostina prevenga la neurotoxicidad inducida por el 3-NP.

### **4. Hipótesis**

Si la  $\alpha$ -mangostina presenta capacidad antioxidante, podría prevenir el daño neuronal y producción de ROS inducidos por el 3-NP.

### **5. Objetivos**

#### **Objetivo general.**

Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la neurotoxicidad inducida por 3-NP en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC).

#### **Objetivos específicos.**

- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la viabilidad neuronal en NGC.
- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre la neurotoxicidad inducida por el 3-NP.
- Si la  $\alpha$ -mangostina previene el daño neuronal inducido por 3-NP, se evaluará si tal efecto está relacionado con la producción de ROS.

## 6. Materiales y métodos:

### Materiales

El medio Basal Eagle (MBE), la L-glutamina, la gentamicina, la citosina- $\beta$ -D-arabinofuranosina (citosina), la glucosa, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirieron de Sigma (St Louis, MO, EUA). El suero fetal bovino y la penicilina/estreptomicina se adquirieron de Gibco (México, D.F.). El diacetato de 5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorohidrofluoresceina (carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA) y el dihidroetidio (HE) se adquirieron de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR). Los demás reactivos usados son de grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente.

La  $\alpha$ -mangostina usada fue aislada del polvo del pericarpio del mangostán por González-Cuahutencos O (2007).

### Métodos

#### Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC).

Los cultivos primarios de NGC se obtuvieron del cerebelo de ratas de la cepa Wistar de 7 días de nacidas de la manera descrita previamente por García y Massieu (2001). Para esto, los cerebelos se disectaron y se liberaron de meninges, luego se machacaron y tripsinizaron. Las células aisladas se resuspendieron en MBE suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 90 U/mL de penicilina, 90  $\mu$ g/mL estreptomicina, 50  $\mu$ g/mL de gentamicina y 20 mM de KCl. Después las células se sembraron a una densidad de 310 a 320 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pozos marca Costar pretratadas con poli-L-lisina, y se mantuvieron en una atmósfera con 5% de humedad, 5% CO<sub>2</sub>/ 95% de aire atmosférico a 37°C. Las células se trataron con citosina (10  $\mu$ M) 24 h después de sembradas, con el fin de prevenir el crecimiento de células no neuronales, a los 4 días *in vitro* (DIV) se adicionó glucosa a una concentración final de 5 mM. Las neuronas se usaron a los 9 DIV.

Mediante este método se sabe que se obtiene más del 95% de neuronas granulares (Estrada-Sánchez *et al.*, 2007).



## Determinación de la viabilidad celular.

### A) Método de MTT.

El número de células viables se determinó mediante el método de MTT descrito inicialmente por Mosmann en 1983. Dicho método se basa en la reducción de una sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), por deshidrogenasas mitocondriales (Berrigid y Tan, 1993), reacción que produce la forma reducida del MTT: formazán, de color púrpura (Fig. 8).

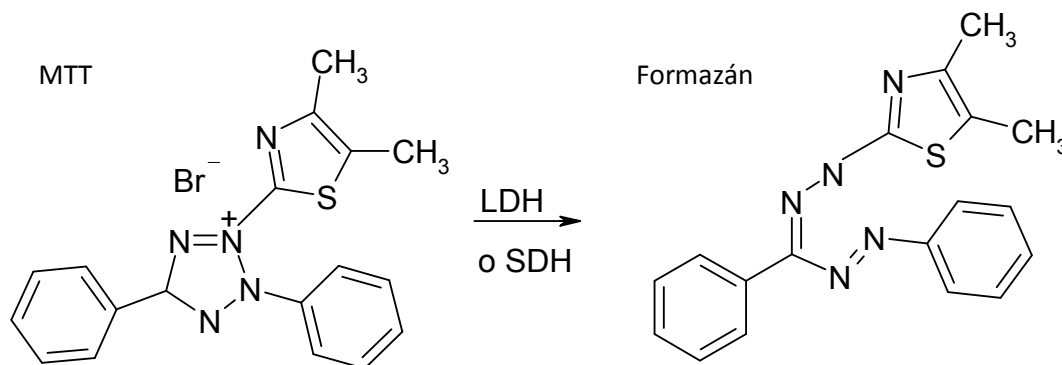


Figura 8. Fundamento del método. Oxidación del MTT a formazán, por enzimas deshidrogenasas.

El MTT se adicionó al cultivo celular a una concentración final de 0.144 mM 24 h después del tratamiento y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y el formazán formado se disolvió con isopropanol ácido. La cuantificación se realizó a una  $\lambda$  de 570 nm y los datos se expresaron como el porcentaje de la reducción del MTT respecto al control.

### B) Exclusión con IP.

El yoduro de propidio (IP) se usa para evaluar los índices de mortalidad celular, ya que sólo penetra las células con membrana dañada, para después formar un complejo con el ADN (Dengler *et al.*, 1995). Este complejo emite fluorescencia roja a una  $\lambda$  de 620 nm cuando se excita a una  $\lambda$  de 480 nm.

Después de 24 h del tratamiento se retiró el medio y se lavaron las células, para después ser incubadas en presencia de IP disuelto en solución Ringer Krebs a una concentración final de 5  $\mu$ M durante 20 min a 37°C. Después de la incubación las células se lavaron y se mantuvieron en solución Ringer Krebs. Las células teñidas se contaron usando 5 campos por pozo por cada condición con el software NIS Elements (Nikon, Co), los resultados se expresaron respecto al control o 3-NP según se indica en la sección de resultados, y se normalizó a una unidad.

### Método para determinar ROS.

La detección de ROS se realizó utilizando dos sondas, dihidroetidio (HEt) y 5-(y 6-) diacetato de carboxi -2',7'-diclorohidrofluoresceína (carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA). El HEt es usado como un marcador de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> porque es relativamente específico para esta ROS (Bindokas *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2006). El HEt cuando entra a las células es oxidado en el citosol a etidio (Et), el cual es retenido dentro del núcleo celular debido a una interacción con el ADN, emitiendo fluorescencia de color rojo brillante (Fig. 9) (Bindokas *et al.*, 1996).

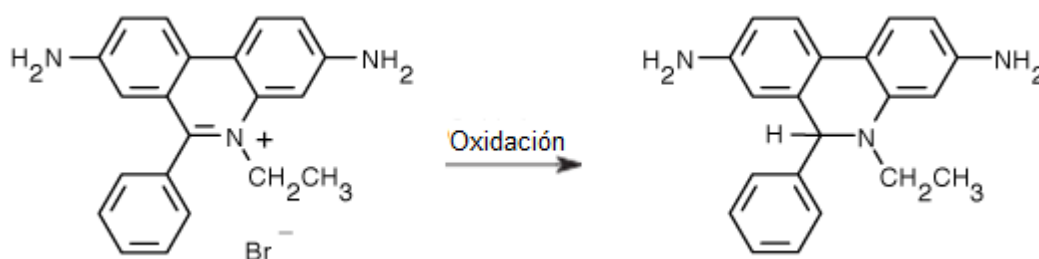


Figura 9. Fundamento del método fluorescente. Oxidación del HEt a Et.  $\lambda_{\text{excitación}}=488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisión}}= 535 \text{ nm}$ .

Por su parte la carboxi-H<sub>2</sub>DCFA al ser oxidada por ROS, se desacetilada dando como producto un compuesto fluorescente llamado 5-(y 6-) carboxi -2',7'-diclorofluoresceína (carboxi-DCF), la cual permanece en el citoplasma emitiendo fluorescencia de color verde brillante (Fig. 10) (Hernández-Fonseca *et al.*, 2008).

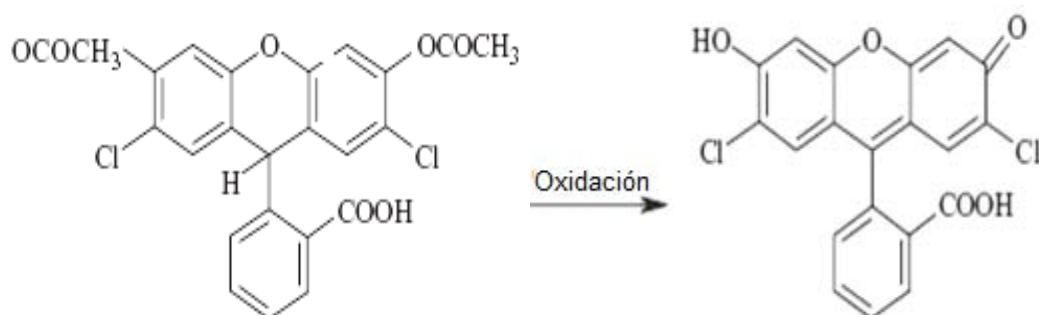


Figura 10. Fundamento del método fluorescente. Oxidación carboxi- H<sub>2</sub>DCFA a carboxi-DCF.  
 $\lambda_{\text{excitación}}=488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisión}}= 530 \text{ nm}$ .

Después del tratamiento se retiró el medio y se lavaron las células para ser incubadas en la presencia de las dos sondas disueltas en solución Ringer Krebs, usando una concentración final de HEt de 2  $\mu\text{M}$  y de carboxi-  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  20  $\mu\text{M}$ , durante 30 min a 37°C. Después de la incubación las células se lavaron y se mantuvieron en solución Ringer Krebs. La intensidad de fluorescencia del Et y carboxi-DCF se midió en 5 campos por pozo por cada condición usando el software NIS Elements (Nikon, Co), los resultados se expresaron respecto al 3-NP, normalizando a una unidad.

## **Determinaciones**

### **a) Evaluación del efecto de la $\alpha$ -mangostina en la viabilidad neuronal.**

Se realizó un estudio de toxicidad usando diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina de 0 a 20  $\mu\text{M}$ . La  $\alpha$ -mangostina se disolvió en amortiguador de fosfatos y 10 % de DMSO. La viabilidad celular se determinó a las 24.5 h.

Adicionalmente se determinó que la concentración de DMSO usada no afecta la viabilidad celular de NGC.

### **b) Evaluación del efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la neurotoxicidad inducida por 3-NP.**

Las NGC se preincubarón con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina de 0 a 12  $\mu\text{M}$ , durante 30 min, y después se trataron con 2 mM de 3-NP durante 2 h. A las 24 h se determinó la viabilidad celular.

### **c) Evaluación de la producción de ROS.**

La presencia de ROS en las NGC se determinó a las 6 horas después del tratamiento, según la metodología descrita antes, en células tratadas con  $\alpha$ -mangostina 6 y 12  $\mu\text{M}$  con y sin 3-NP.

La determinación se realizó a las 6 h porque en el laboratorio se demostró que a este tiempo existe la mayor producción de ROS inducidas por 3-NP en las NGC.

## **Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido de una prueba de Dunnett. Los valores se consideraron significativamente diferentes con una  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados y discusión

### Evaluación del efecto de la $\alpha$ -mangostina en la viabilidad neuronal.

La evaluación del efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre la viabilidad de las NGC se realizó como una prueba de toxicidad. Tomando en cuenta estudios publicados previamente, los cuales sugieren que 10  $\mu$ M de  $\alpha$ -mangostina tiene un efecto biológico en células de leucemia humana HL60 (Matsumoto *et al.*, 2004) y que el  $CI_{50}$  para  $ONOO^-$  es de 12.2  $\mu$ M (Jung *et al.*, 2006) se evaluaron concentraciones de 0 a 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -mangostina en la viabilidad celular de NGC.

En la figura 11 se muestra el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la viabilidad celular. En el panel A se observó que la  $\alpha$ -mangostina no afecta la viabilidad celular hasta 14  $\mu$ M y que existe una disminución marcada después de 16  $\mu$ M, esta disminución representa cerca del 40% y 70% a la concentración de 20  $\mu$ M.

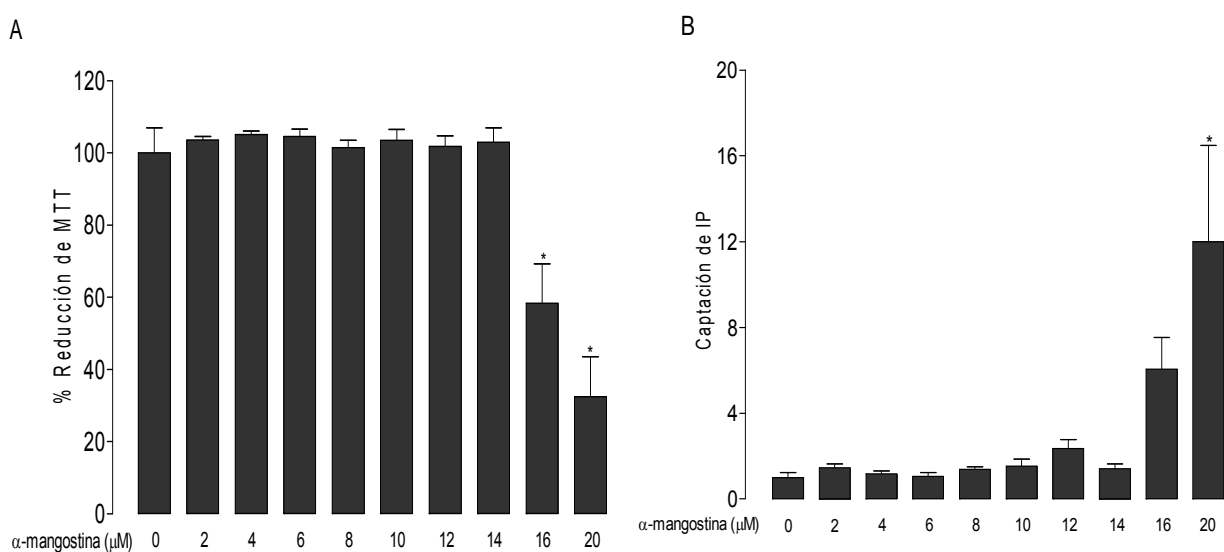


Figura 11. Viabilidad celular de NGC tratadas con  $\alpha$ -mangostina. A) Determinación de viabilidad celular por el método de MTT,  $n=5-6$ . B) Determinación de viabilidad celular por el método de exclusión de IP,  $n=4$ . Las NGC se incubaron con  $\alpha$ -mangostina durante 24.5 h. Los resultados se representan como promedio  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.001$  vs control.

En el panel B se muestra la determinación de viabilidad celular por el método de IP, donde se confirmó lo encontrado con el método MTT, ya que a 16 se observa un aumento de la muerte celular, aunque ésta es significativa sólo en 20  $\mu$ M.

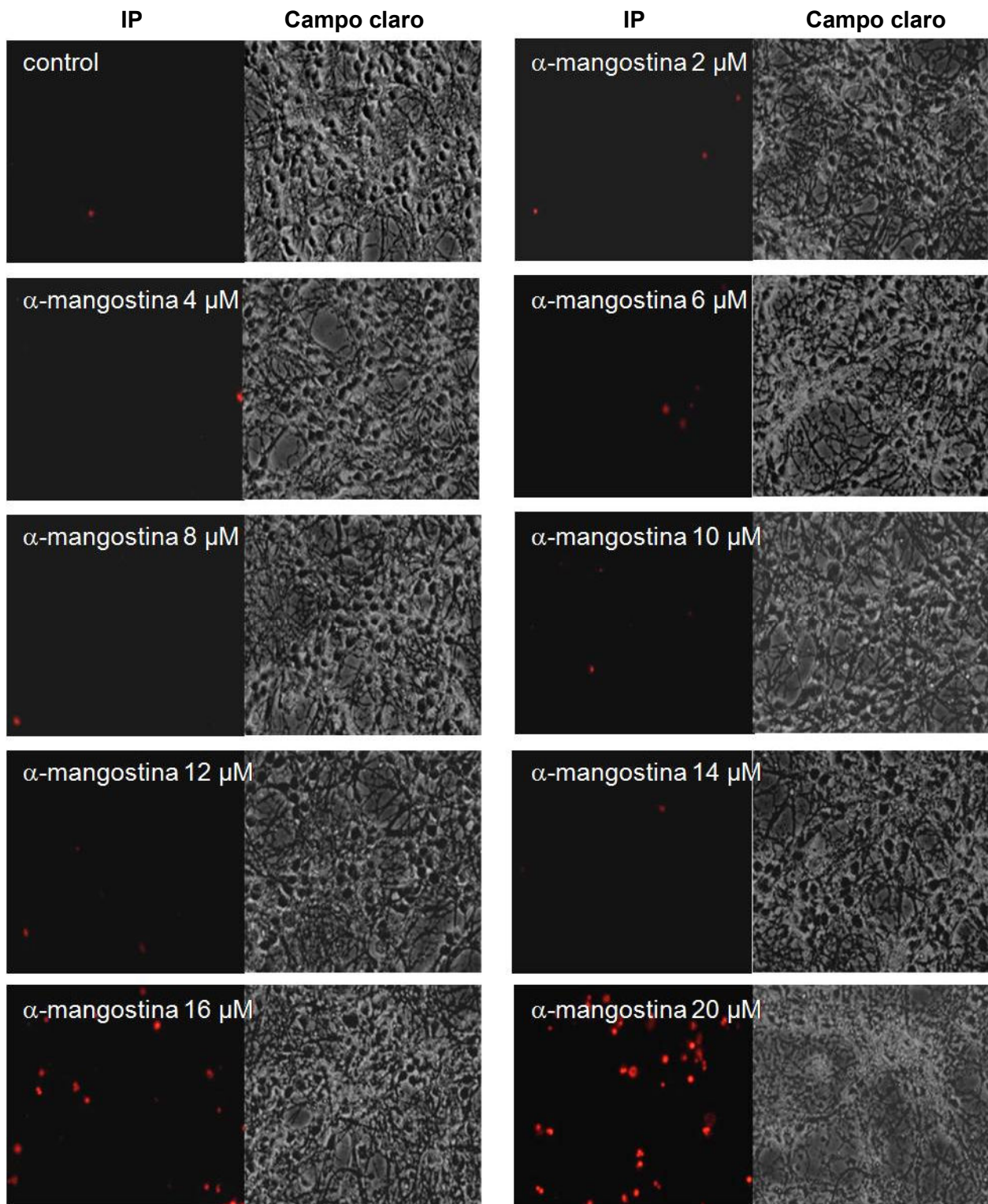


Figura 12. Micrografías de la captación de IP y de campo claro. La células se trataron con difetrentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina durante 24.5 h.

En la figura 12, se presentan las micrografías de NGC tratadas con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina siendo representativas de los experimentos con los que se construyó la figura 11B. Como se mencionó en la sección de métodos, el IP entra a las células con membrana dañada y las marca con un color un color rojo brillante, por lo que una mayor cantidad de puntos rojos indica mayor número de células dañadas.

Como se observa, en las concentraciones 16 y 20  $\mu\text{M}$  el número de células marcadas es mayor comparado con el control y el resto de las concentraciones de  $\alpha$ -mangostina. Las micrografías en campo claro de las células tratadas con  $\alpha$ -mangostina desde 0 a 14  $\mu\text{M}$  muestran las características morfológicas normales de las NGC: el soma es oscuro y de forma ovalada rodeado de un halo refringente, y los procesos son gruesos, oscuros y bien definidos. Sin embargo en las células tratadas con  $\alpha$ -mangostina 16  $\mu\text{M}$ , muestran algunas células hinchadas y células dañadas cuyo soma ya no es oscuro y han perdido el halo refringente, además los procesos se ven delgados. Estas características anormales son aún más evidentes en las células tratadas con  $\alpha$ -mangostina 20  $\mu\text{M}$ .

Esta determinación se hizo con la finalidad de saber desde que concentración la  $\alpha$ -mangostina es tóxica a las NGC, ya que se sabe que otros compuestos resultan tóxicos a ciertas concentraciones (Diplock, 1995).

### **Evaluación del efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la neurotoxicidad inducida por 3-NP.**

Con los resultados anteriores fue posible escoger un rango de concentraciones de  $\alpha$ -mangostina para evaluar el efecto del 3-NP, las concentraciones usadas de  $\alpha$ -mangostina fueron de 0 a 12  $\mu\text{M}$ . Las NGC se preincubaron 30 min con  $\alpha$ -mangostina, y después se expusieron al 3-NP durante 2 h. La viabilidad celular se determinó 24 h después.

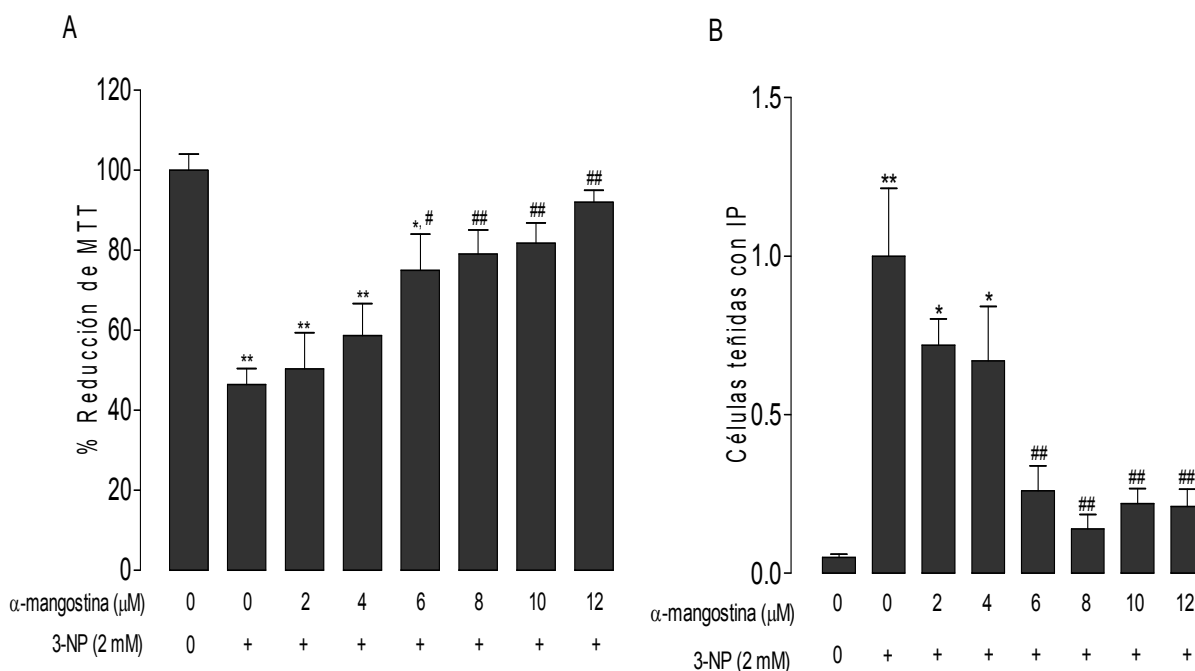


Figura 13. Viabilidad celular de NGC preincubadas con  $\alpha$ -mangostina en la neurotoxicidad por 3-NP a las 24 h. A) Determinación de la viabilidad celular por el método de MTT, n=12-6. B) Determinación de la viabilidad celular por el método de exclusión de IP, n= 4. Las NGC se preincubaron 30 min con  $\alpha$ -mangostina para ser expuestas después a 2 mM de 3-NP. Con Los resultados se representan como promedio  $\pm$  EEM. \*p<0.05 y \*\*p<0.001 vs control, #p<0.05 y ##p<0.001 vs 3-NP.

Tabla 1. Porcentaje de prevención de la  $\alpha$ -mangostina en la neurotoxicidad inducida por 3-NP.

Concentración de $\alpha$ -mangostina	% De prevención	
	MTT	IP
2	5.7	29.5
4	22.6	34.7
6	52.8	77.9
8	60.4	90.5
10	66.0	82.1
12	84.9	83.2

En la figura 13, se muestra el efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre el daño neuronal inducido por 3-NP. De acuerdo a lo reportado anteriormente (Olsen *et al.*, 1999; Mandavilli *et al.*, 2005) el 3-NP disminuye la viabilidad celular (figura 13). En el panel A se observa que el 3-NP provoca una disminución de la viabilidad celular en un 53%, y es estadísticamente diferente respecto al control. Mientras que en el panel B la captación de IP es 10 veces mayor respecto al control. En ésta figura se observa que la  $\alpha$ -mangostina previene el daño de manera dependiente de la concentración, siendo significativa a partir de 6  $\mu$ M.

En la tabla 1 se encuentran los porcentajes de protección de la  $\alpha$ -mangostina, tanto para el método MTT como para IP.

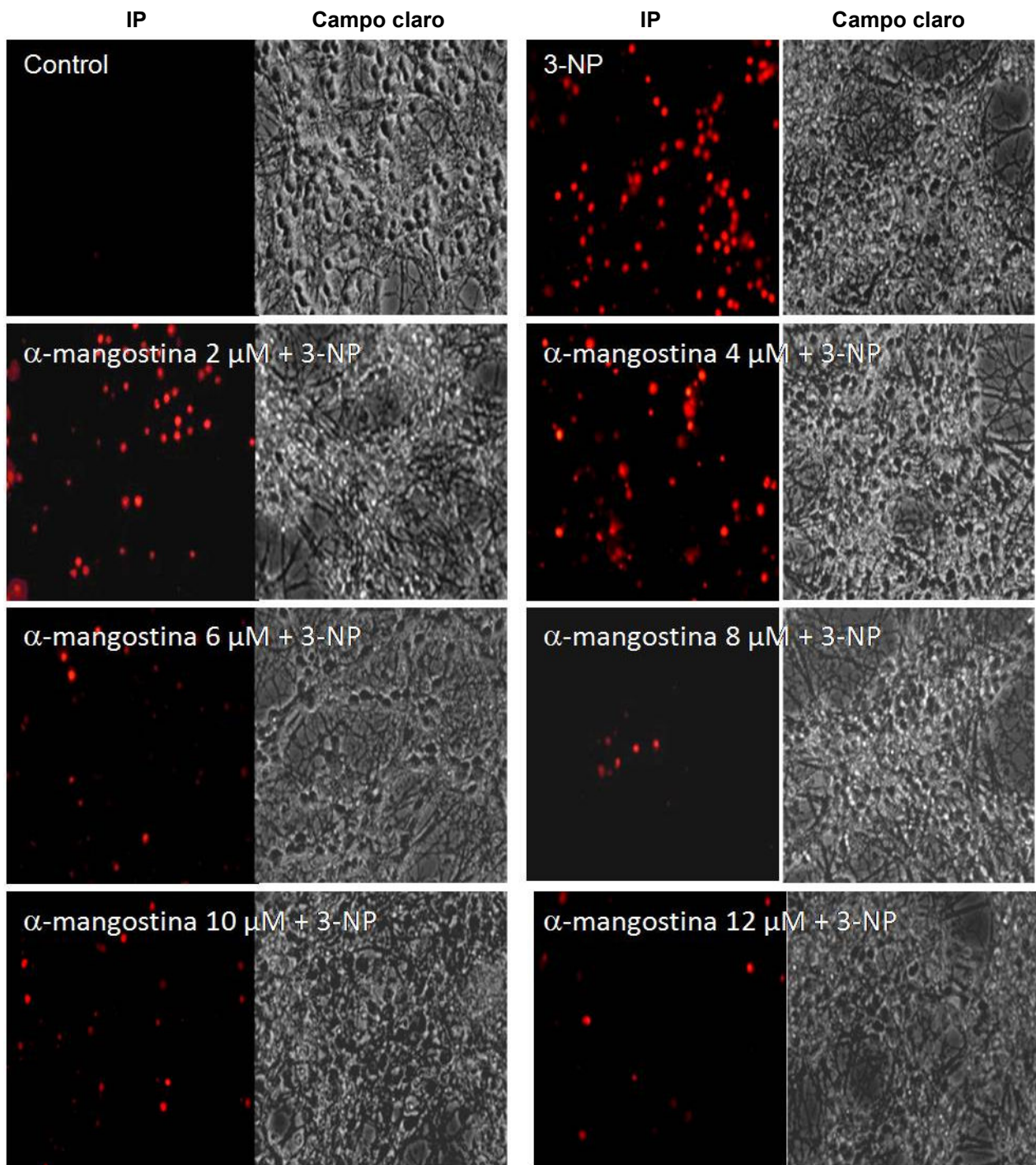


Figura 14. Micrografías de la captación de IP y de campo claro, 24 h después del tratamiento. Las células se preincubaron con  $\alpha$  mangostina 30 min, para ser tratadas con 2 mM de 3-NP como de describe en los métodos.

En la figura 14, se presentan las micrografías de NGC tratadas con 3-NP y diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina siendo representativas de los experimentos con los que se construyó la figura 13B. Como se observa, el 3-NP muestra un mayor número de células marcadas con IP y las micrografías de campo claro las características de daño celular. El daño celular se observa porque algunas células están hinchadas, otras no presentan un soma oscuro y han perdido el halo refringente, además los procesos



se ven delgados y deshechos. Al usar las concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina no se observa una disminución en el número de células marcadas con IP y las características morfológicas no se mejoran. A partir de 6  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina se observa que existe menor cantidad de células marcadas con IP y se recuperan las características morfológicas normales de las NGC: el soma es oscuro y de forma ovalada rodeado de un halo refringente, y los procesos son gruesos, oscuros y bien definidos.

### **Evaluación de la producción de ROS.**

Por otra parte se sabe que parte del mecanismo por el cual el 3-NP produce daño celular es debido a la producción de ROS, como  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^{\bullet}\text{OH}$  y  $\text{ONOO}^-$  (Olsen *et al.*, 1999; Nasr *et al.*, 2003; Mandavillin *et al.*, 2005), y que el uso de antioxidantes puede disminuir la toxicidad inducida por éste (Olsen *et al.*, 1999; Mandavillin *et al.*, 2005). Tomando en cuenta que a la  $\alpha$ -mangostina se le ha atribuido capacidad antioxidante (Williams *et al.*, 1995; Mahabusarakam *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2006; Devi Sampath y Vijayaraghavan, 2007), el efecto protector de ésta podría estar involucrado en la producción de ROS.

Con la finalidad de estudiar al menos en parte del mecanismo por el cual la  $\alpha$ -mangostina previene la muerte celular inducida por 3-NP, se evaluó la producción de ROS. Utilizando las concentraciones de  $\alpha$ -mangostina en las que se encontró la mínima y la máxima protección (6 y 12  $\mu\text{M}$ ) en la neurotoxicidad por 3-NP.

La producción de ROS se evaluó mediante el uso de dos sondas, HET y carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , las cuales al ser oxidadas por ROS dan como productos compuestos fluorescentes, Et y carboxi-DCF respectivamente. Se utilizaron estos dos marcadores porque el HET es un marcador considerado específico para  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y la carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  no es específica para un tipo de ROS por lo que puede dar un panorama general, ya que se ha reportado que es oxida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^{\bullet}\text{OH}$ ,  $\text{ROO}^{\bullet}$  (Gomes *et al.*, 2005).

En la figura 15 se muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia de los productos de oxidación de las sondas antes mencionadas, cuando las NGC son tratadas con 3-NP y  $\alpha$ -mangostina. Se encontró que las NGC tratadas con las dos concentraciones de  $\alpha$ -mangostina escogidas produjeron una menor cantidad de ROS.

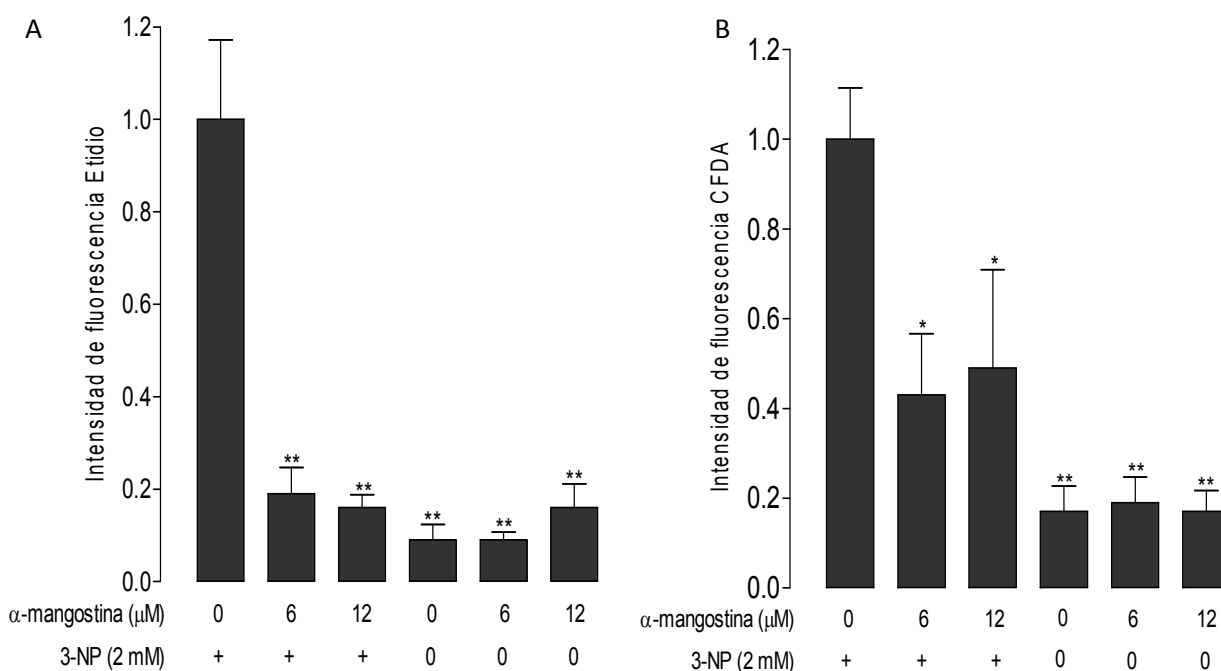


Figura 15. Evaluación de la producción intracelular de ROS en NGC tratadas con 3-NP y  $\alpha$ -mangostina. Las células fueron incubadas con  $\alpha$ -mangostina con y sin 3-NP. A) Evaluación de la producción de ROS con la sonda HET a una concentración final de 2  $\mu$ M, n=5-3. B) Evaluación de la producción intracelular de ROS con la sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA, n=4-3. Los datos se representan como promedio  $\pm$  EEM. \*p<0.05 y \*\*p<0.001 vs 3-NP.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la oxidación de Et y carboxi-CDFA en NGC tratadas con  $\alpha$ -mangostina y 3-NP.

Concentración $\alpha$ -mangostina con 3-NP	% de inhibición de ROS	
	Et	Carboxi-CFDA
6	88.6	68.8
12	91.8	60.7

Sin embargo, la menor producción de ROS se detectó utilizando el HET lo cual puede deberse como ya se mencionó, a que ésta sonda es más específica para  $O_2^{\bullet-}$ , mientras que la carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA es inespecífica. Lo cual nos estaría dando evidencia de que el  $O_2^{\bullet-}$  tiene un papel muy importante en el daño inducido por 3-NP lo cual ya se ha observado en otros trabajos (Bacsi *et al.*, 2006), y que la  $\alpha$ -mangostina es capaz de neutralizar dicha ROS. Por otra parte, el hecho de que la disminución no fue tan evidente con la carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA estaría sugiriendo la participación de otras ROS las cuales no fueron neutralizadas por la  $\alpha$ -mangostina. Esto es relevante dado que en nuestro laboratorio se determinó que la  $\alpha$ -mangostina es capaz de atrapar  $O_2^{\bullet-}$  y ONOO<sup>-</sup> (Nolasco-Amaya, 2008), y  $O_2^1$  (datos no publicados).

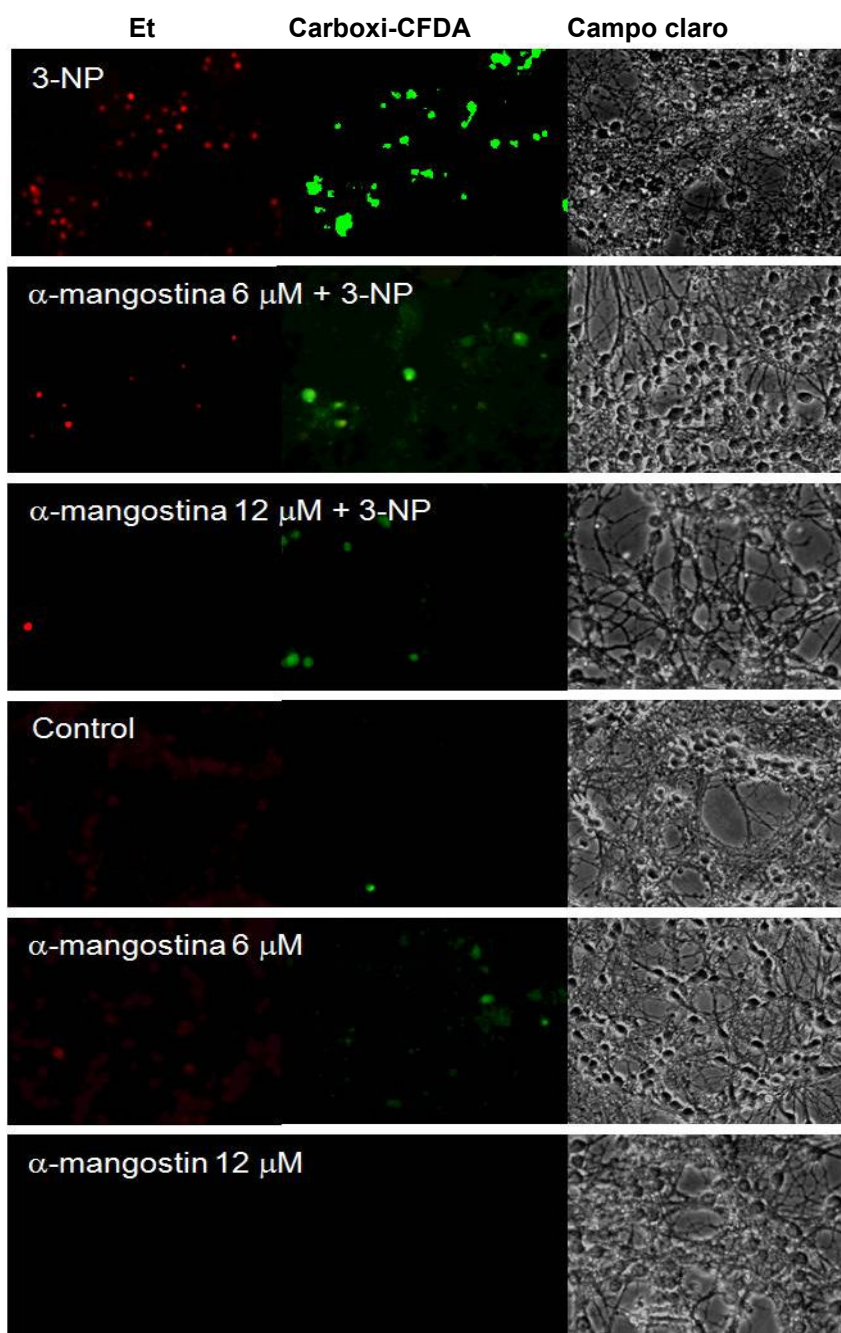


Figura 16. Micrografías fluorescentes de la producción intracelular de ROS usando las sondas HEt y carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA. Las NGC se trataron con  $\alpha$ -mangostina y 3-NP, y la producción de ROS se determinó a las 6 h.

Adicionalmente se puede observar en la figura 16 la disminución en la producción de ROS. Ya que existe una menor cantidad de células con fluorescencia usando las sondas en las dos concentraciones de  $\alpha$ -mangostina. Esta disminución representa hasta un 92 % con Et y 69 % con carboxi-CFDA (tabla 2). Además, se observa que la fluorescencia de ambas sondas es prácticamente igual en el control y al usar las dos concentraciones de  $\alpha$ -mangostina sin el tratamiento con 3-NP. Lo que indica que la  $\alpha$ -mangostina por si misma no produce ROS.

## **8. Conclusiones**

- La  $\alpha$ -mangostina no afecta la viabilidad celular de NGC hasta 14  $\mu$ M.
- Existe efecto protector de la  $\alpha$ -mangostina en la neurotoxicidad por 3-NP de manera dependiente de la concentración.
- Parte del mecanismo por el cual la  $\alpha$ -mangostina ejerce su efecto protector es por la disminución en la producción de ROS inducidas por 3-NP.

## **9. Perspectivas**

Profundizar el estudio del mecanismo neuroprotector de la  $\alpha$ -mangostina en las NGC.

## 10. Referencias

- Bacsi A, Woodberry M, Widger W, Papaconstantinou J, Mitra S, Peterson JW, Boldogh I, 2006. Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NP-treated cells. *Mitochondrion* 6(5): 235-244.
- Berridge MV, Tan AS, 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303 (2): 474-482.
- Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ, 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16 (4): 1324-1336.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D, 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95 (6): 1521-1540.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, 2006. Sustancias reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educ Quim* 17 (2): 164-173
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R, 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 37(9-10): 949-62.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W, 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia* 78 (6): 401-408.
- Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH, 1995.. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs.* 6(4): 522-32.
- Devi Sampath P, Vijayaraghavan K, 2007. Cardioprotective effect of alpha-mangostin, a xanthone derivative from mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 21 (6):336-339.
- Dikalov S, Losik T, Arbiser JL, 2008. Honokiol is a potent scavenger of superoxide and peroxy radicals. *Biochem Pharmacol.* 76(5): 589-96.
- Diplock AT, 1995. Safety of antioxidant vitamins and  $\beta$ -carotene. *Am J Clin Nutr* 62 (6 suppl): 1510S-1516S.
- Eberhardt MK. Reactive oxygen metabolites: Chemistry and medical consequences. USA. CRC Press LLC, 2000.
- Ee CG, Daud S, Taufiq-Yap YH, Ismail NH, Rahmani M, 2006. Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res* 20 (12): 1067-1073.

Estrada-Sánchez AM, Camacho A, Montiel T, Massieu L, 2007. Cerebellar granule neurons are more vulnerable to transient transport-mediated glutamate release than to glutamate uptake blockade. correlation with excitatory amino acids levels. *Neurochem Res* 32 (3): 423–432.

Gabrielson KL., Hogue BA, Bohr VA, Cardounel AJ, Nakajima W, Kofler J, Zweier JL, Rodriguez ER, Martin LJ, de Souza-Pinto NC, Bressler J, 2001. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces cardiac and neurotoxicity differentially in mice. *Am J Pathol* 159 (4): 1507-1520.

García O, Massieu L, 2001. Strategies for neuroprotection against L-trans-2, 4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J Neurosci Res* 64 (4): 418–428.

Garcia VV., Magpantay TO, Escobin LD, 2005. Antioxidant potential of selected philippine vegetables and fruits. *Philipp Agric Scientist* 88 (1): 78-83.

Gomes A, Fernandes E, Lima J, 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys. Methods* 65: 45–80

González-Cuahutencos O. 2007. Propiedades antioxidantes *in vitro* del mangostán (*Garcinia mangostana* L.). Tesis de Licenciatura de QFB. Facultad de Química, UNAM.

Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L, 2007. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86 (8): 1768-1780.

Ji X, Avula B, Khan IA, 2007. Quantitative and qualitative determination of six xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by LC–PDA and LC–ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 43 (4): 1270-1276.

Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD, 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 54(6): 2077-2082.

Koc M, Imik H, Odabasoglu F., 2008. Gastroprotective and Anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. *Biol Trace Elem Res.* Aug 23.

Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Croft K, 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radic Res* 33 (5): 643-659.

Mahabusarakam W, Wiriyaichitra P, Taylor W, 1987. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod* 50: 474-478.

Mandavillin BS, Boldogh I, Van Houten B, 2005. 3-Nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 133 (2): 215-223.

Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y, 2003. Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod* 66 (8): 1124-1127.

Nabandith V, Suzui M, Morioka T, Kaneshiro T, Kinjo T, Matsumoto K, Akao Y, Iinuma M, Yoshimi N, 2004. Inhibitory effects of crude  $\alpha$ -mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pac J Cancer Prev* 5 (4): 433-438.

Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondada V, Lee J, Hadley RW, Geddes JW, 2003. Influence of cytosolic and mitochondrial  $Ca^{2+}$ , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* 43 (2): 89-99.

Nolasco-Amaya EG, 2008. Propiedades antioxidantes de la  $\alpha$ -mangostina. Tesis de Licenciatura de QA. Facultad de Química, UNAM.

Olsen C, Rustad A, Fonnum F, Paulsen RE, Hassel B, 1999. 3-Nitropropionic acid: an astrocyte-sparing neurotoxin in vitro. *Brain Res* 850 (1-2): 144-149.

Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM, 2008 Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol*, en prensa.

Riepe M, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO, Spencer PS, Allen CN, 1992. Inhibition of energy metabolism by 3-nitropropionic acid activates ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res* 586 (1): 61-66.

Roberts JC, 1961. Naturally occurring xanthenes. *Chem Rev* 61 (6): 591-605.

Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS, 2006. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (41): 15038-15043.

Sakagami Y, Iinuma M, Piyasena KGNP, Dharmaratne HRW, 2005. Antibacterial activity of  $\alpha$ -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine* 12 (3): 203-208.

Santiago-López S, Vázquez-Roma B, Pérez-De La Cruz V, Barrera D, Rembao D, Salinas-Lara C, Pedraza-Chaverri J, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A, 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54 (4): 233-238.

Sies H, Stahl W, Sundquist AR, 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 669:7-20.

Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N, Suksamrarn A, 2006. Cytotoxic Prenylated Xanthenes from the Young Fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 54 (3): 301-305.

Turrens JF, 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552 (Pt 2): 335-344.

Vieira LM, Kijjoa A, 2005. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Curr Med Chem* 12 (21): 2413-2446.

Wang X, Quinn PJ, 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 38(4): 309-36

Walker EB, 2007. HPLC analysis of selected xanthenes in mangosten fruit. *J Sep Sci* 30 (9): 1229-1234.

Weecharangsan W, Opanasopit P, Sukma M, Ngawhirunpat T, Sotanaphun U, Siripona P, 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn). *Med Princ Pract* 15 (4): 281-287.

Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L, 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radic Res* 23 (2): 175-784.

Yates P, Bhat HB, 1968. Structure of  $\beta$ -mangostin. *Can J Chem* 46: 3770-3772.

Yates P, Stout GH, 1958. The structure of mangostin. *J Am Chem Soc* 80: 1691-1700.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, 2003. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34(11): 1359-1368.

Zou Y, Lu Y, Wei D., 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. : *J Agric Food Chem* 52(16): 5032-9.