



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE
LA ALFA-MANGOSTINA EN DIFERENTES
MODELOS NEUROTÓXICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BERENICE MÁRQUEZ VALADEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DOCTOR ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**

2010



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Márquez Valadez Berenice 58579498 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 302262489</p>
<p>2. Datos del tutor Doctor Abel Santamaría Del Ángel</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Doctora Gertrudis Hortencia González Gómez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Doctor Jorge Humberto Arce Rincón</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Doctor José Pedraza Chaverri</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Doctor Rolando Efraín Hernández Muñoz</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Evaluación del efecto antioxidante de la alfa-mangostina en diferentes modelos neurotóxicos. 102 pp. 2010</p>

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Chánez Cárdenas por todo su apoyo, comprensión y conocimiento transmitido. Gracias por todo el trabajo invertido en esta investigación, por siempre escuchar y resolver todas mis dudas; por ser un excelente ejemplo de profesora, tutora y científica.

Al Dr. Abel Santamaría Del Ángel por permitirme realizar esta investigación en su laboratorio; y por la dirección y revisión de este trabajo.

A mis sinodales:

Dra. Gertrudis Hortencia Gonzáles Gómez

Dr. Jorge Humberto Arce Rincón

Dr. José Pedraza Chaverri

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

Gracias por sus correcciones y comentarios.

A mis profesores, compañeros y amigos del Laboratorio de Aminoácidos Excitadores (Verónica, Paul, Daniela, Luis, Rafa, Yola y Diana), con quienes día a día; aprendí, trabajé y reí. Gracias por todos los buenos momentos...los voy a extrañar mucho!!!

A las doctoras, compañeros y amigos del Laboratorio de Patología Vasculare, quienes afectuosamente me recibieron en su laboratorio y me permitieron aprender y trabajar junto a ellos.

A las doctoras Sonia Galván Arzate y Perla Maldonado Jiménez por el asesoramiento en diversas técnicas realizadas para esta tesis.

A mis amigos Rafael Lugo Huitrón y Luis Alejandro Méndez Cuesta, quienes me apoyaron incondicionalmente en los experimentos realizados para esta tesis.

A la UNAM, por todo el conocimiento adquirido dentro y fuera de sus aulas; por convertirse en un segundo hogar para mí.

A DGAPA-UNAM PAPIIT (IN207007) y al Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) por el apoyo recibido para realizar este trabajo.

Dedicatorias

A mis padres (Alejandra Valadez y Javier Márquez), por todo su amor, por siempre apoyarme y guiarme en los buenos y malos momentos. Agradezco de todo corazón el enorme esfuerzo que han realizado ambos para que yo pudiera llevar a cabo este logro, que es en gran parte suyo. Estoy realmente orgullosa de tenerlos como padres, los amo con todo mi corazón!

A mis hermanos (Diego Márquez y Javier Márquez) y mi sobrino (Iván Javier Márquez), quienes cada uno a su manera han hecho que sea una mejor persona, los quiero mucho.

Al Dr. Jorge Humberto Arce Rincón, simplemente me faltan palabras para que entiendas lo agradecida que estoy y estaré siempre contigo. Gracias por ser mi profesor y tutor durante todo este tiempo; pero sobre todo por brindarme tú valiosa amistad, por escucharme, por los buenos consejos, por todas y cada una de las pláticas, por las risas, por las lágrimas, por siempre estar ahí, por aceptarme, por quererme y más aún por siempre confiar en mí, te quiero muchísimo!!!

A mis amigos de toda la vida (Marbella y Juan); Marbella (mi consciencia) eres como la hermana que nunca tuve, gracias por siempre estar ahí para escuchar cada una de mis locuras, por los regaños, por los buenos y malos consejos (en realidad más por los malos!!!), por todos los momentos compartidos y por todas las fiestas (y las que faltan!!!), te quiero muchísimo linda!. Juan de Dios tú eres como el ángel que está en mi hombro derecho y que siempre me da los buenos consejos (y aunque por lo regular no te hago caso!), sabes lo mucho que valoro tu amistad y tus consejos, gracias por todos los momentos juntos, por las infinitas retas de basket ball y por las largas platicas telefónicas, sabes que significas mucho para mí, te quiero muchísimo y siempre lo haré. Sé que la vida no valdría la pena sin ustedes a mi lado...los amo mucho!!!

A Luis Alejandro, por brindarme la fortuna de permitirme estar a tu lado y poder conocerte. Gracias por todo lo que has hecho por mí; por cada momento juntos, por las platicas tan interesantes y chistosas, por las risas, por los sueños compartidos, por escucharme, por apoyarme, por quererme, por consentirme, por tus lindos ojos y tus miradas tan expresivas, por ser como eres y aceptarme (tal cual soy!), pero sobretodo por tu increíble paciencia y amor, te quiero y amo muchísimo guapo!!!

A mis amigos que siempre han estado ahí; Alejandra, Donají, Milka, Dulce, Mirna, Claudia, Laura, Yadira, Rafa, Dianita, Víctor, Fernando, Jorge, Iván, Román y Deborah; por compartir conmigo sueños, anhelos y vivencias.

A aquellas personas que por el hecho de haberlas conocido hicieron que mi vida sea más feliz y placentera, gracias por haber tocado mi vida.

Por último, pero no menos importante, a mis angelitos que amo con todo mi corazón y que siempre amaré, Luigui (te extraño mucho precioso), Leslie (mi nena) y mi Arenita.

Todos tenemos en el fondo la misma tendencia, es decir, a irnos viendo como el resultado y compendio de lo que nos ha ocurrido y de lo que hemos logrado y de los que hemos realizado, como si fuera sólo eso lo que conforma nuestra existencia. Y olvidamos casi siempre que las vidas de las personas no son sólo eso: cada trayectoria se compone también de nuestras pérdidas y nuestros desperdicios, de nuestras omisiones y nuestros deseos incumplidos, de lo que una vez dejamos de lado o no elegimos, o no alcanzamos, de las numerosas posibilidades que en su mayoría no llegaron a realizarse –todas menos una, a la postre- de nuestras vacilaciones y nuestras ensoñaciones, de los proyectos frustrados y los anhelos falsos y tibios, de los miedos que nos paralizaron, de lo que abandonamos o nos abandonó a nosotros. Las personas tal vez consistimos, en suma, tanto en lo comprobable y cuantificable y recordable como en lo más incierto, indeciso y difuminado, quizá estemos hechos en igual medida de lo que fue y de lo que pudo ser.

Javier Marías, *Mañana en la batalla piensa en mí*

“Ten confianza en ti mismo. En la inteligencia que te permitirá ser mejor de lo que ya eres y en el instinto de tu amor, que te abrirá a merecer la buena compañía.”

Fernando Savater, *Ética para Amador*

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	9
1. ABREVIATURAS.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 Estrés oxidativo y nitrosativo.....	11
2.1.1 Especies reactivas del oxígeno.....	12
2.1.2 Especies reactivas del nitrógeno.....	15
2.1.3 Daño oxidativo.....	17
2.1.4 Sistemas antioxidantes endógenos.....	20
2.1.4.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	20
2.1.4.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos.....	23
2.2 <i>Garcinia mangostana</i> Linn.....	28
2.2.1 Descripción.....	28
2.2.2 Origen y distribución.....	30
2.2.3 Composición.....	30
2.2.4 Xantonas del mangostán.....	31
2.3 Alfa-mangostina.....	32
2.3.1 Propiedades anti-tumorales.....	33
2.3.2 Propiedades anti-inflamatorias.....	34
2.3.3 Propiedades anti-bacterianas.....	36
2.3.4 Propiedades fungicidas.....	37
2.3.5 Propiedades anti-oxidantes.....	38
2.4 Modelos de daño neuronal.....	42
2.4.1 Modelos pro-oxidantes.....	42

2.4.1.1 Sulfato ferroso (FeSO ₄).....	44
2.4.1.2 FeSO ₄ y daño oxidativo.....	44
2.4.2 Modelos excitotóxicos.....	45
2.4.2.1 Ácido quinolínico (QUIN).....	46
2.4.2.2 Vía de la kinurenina.....	47
2.4.2.3 QUIN y daño excitotóxico.....	49
2.4.2.4 QUIN y daño oxidativo.....	50
2.4.2.5 QUIN y alteraciones energéticas.....	52
2.4.3 Modelos de déficit energético.....	53
2.4.3.1 Ácido 3-nitropropiónico (3-NP).....	55
2.4.3.2 3-NP y alteraciones energéticas.....	56
2.4.3.3 3-NP y daño oxidativo.....	57
3. PLANTEAMIENTO GENERAL.....	60
4. JUSTIFICACIÓN.....	61
5. HIPÓTESIS.....	62
6. OBJETIVOS.....	63
6.1 Objetivo general.....	63
6.2 Objetivos particulares.....	63
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
7.1 Reactivos y animales.....	64
7.2 Extracción y purificación de la α-mangostina.....	65
7.3 Obtención de la fracciones sinaptosomales.....	66
7.4 Diseño experimental.....	66
7.5 Determinación de la peroxidación de lípidos <i>in vitro</i>	67
7.6 Estimación de la funcionalidad mitocondrial.....	68

7.7 Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH).....	69
7.8 Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (Gpx).....	70
7.9 Estimación de la actividad de la glutatión S-transferasa (GST).....	71
7.10 Cuantificación de proteínas.....	72
7.11 Análisis estadístico.....	73
7.12 Diagrama de flujo metodológico.....	74
8. RESULTADOS.....	75
8.1 Efecto de la α -mangostina sobre la peroxidación de lípidos inducida por QUIN, 3-NP y FeSO_4	75
8.2 Efecto de la α -mangostina sobre la disfunción mitocondrial inducida por QUIN, 3-NP y FeSO_4	77
8.3 Efecto de la α -mangostina sobre los niveles de glutatión (GSH) inducido por QUIN, 3-NP y FeSO_4	79
8.4 Efecto de la α -mangostina sobre la actividad enzimática basal de la glutatión peroxidasa e inducida por FeSO_4	81
8.5 Efecto de la α -mangostina sobre la actividad enzimática basal de la glutatión-S- transferasa e inducida FeSO_4	82
9. DISCUSIÓN.....	85
10. CONCLUSIONES.....	93
11. PERSPECTIVAS.....	94
12. BIBLIOGRAFÍA.....	95

RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) dañan estructural y funcionalmente a las diversas macromoléculas presentes en la célula; dichas especies juegan un papel importante en eventos de muerte neuronal presentes en diversas enfermedades neurodegenerativas. La *Garcinia mangostana* Linn, miembro de la familia *Guttiferae*, es un árbol que se encuentra distribuido en países del sureste de Asia, en donde su fruto es utilizado como tratamiento para diversos padecimientos en la medicina tradicional. El fruto del mangostán es rico en xantonas, los cuales son metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas. La α -mangostina fue la primera xantona aislada del pericarpo del mangostán, la cual puede ser aislada de la corteza y látex. A esta xantona se la han atribuido diversas actividades y propiedades biológicas como anti-oxidante, anti-tumoral, anti-inflamatoria, anti-bacteriana y fungicida. En el presente trabajo, se evaluaron el efecto de la α -mangostina como tratamiento frente a 3 diferentes modelos experimentales de daño neuronal: (1) un modelo excitotóxico y pro-oxidante (QUIN 100 μ M), (2) un modelo de déficit energético (1 mM) y (3) un modelo típicamente pro-oxidante (FeSO_4 5 μ M). Se realizó la incubación de las fracciones sinaptosomales a 1 hora con las diferentes toxinas y una curva de concentraciones crecientes de la α -mangostina; posteriormente se determinó los niveles de lipoperoxidación y GSH, además de evaluar la funcionalidad mitocondrial y la actividad enzimática de la Gpx y la GST. Se encontró que la α -mangostina disminuyó de manera concentración dependiente la lipoperoxidación en los 3 modelos probados, recuperó la capacidad reductora mitocondrial inducida por QUIN y 3-NP, restableció los niveles de GSH inducidos por el 3-NP y FeSO_4 . Por otra parte al igual que el FeSO_4 la administración de la α -mangostina *per se* incrementó la actividad de la Gpx, pero no afectó la actividad de la GST. La α -mangostina es una potente molécula con propiedad antioxidante, que ejerce su efecto probablemente en parte a la inducción de mecanismos antioxidantes endógenos, como es el sistema glutatión. Es de gran importancia continuar haciendo estudios con esta molécula para elucidar el mecanismo a nivel bioquímico, molecular y celular, por el cual actúa. De esta manera podremos postular eventualmente a la α -mangostina como una herramienta útil e importante en el diseño de terapias antioxidantes a nivel experimental para el manejo de alteraciones neurológicas.

1. ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleíco.....	ADN
Ácido kinurénico.....	KYNA
Ácido 3-nitropropiónico.....	3-NP
Ácido quinolínico.....	QUIN
Ácido tiobarbitúrico	TBA
Adenosín trifosfato.....	ATP
Anión superóxido.....	O ₂ ^{•-}
Catalasa.....	CAT
Dimetil sulfóxido.....	DMSO
Especies reactivas de nitrógeno	ERN
Especies reactivas de oxígeno	ERO
γ-glutamilcisteína ligasa.....	γGCL
γ-glutamil transpeptidasa.....	γGT
Glutación oxidado.....	GSSG
Glutación peroxidasa.....	Gpx
Glutación reducido.....	GSH
Glutación reductasa.....	GR
Glutación sintetasa.....	GS
Glutación S-transferasa.....	GST
3-hidroxikinurenina.....	3-HK
4-hidroxi-2-nonenal.....	HNE
Malondialdehído.....	MDA
Nicotinamida adenina dinucleótido.....	NAD ⁺

N-metil-D-aspartato.....	NMDA
Oxido nítrico.....	NO•
Oxígeno molecular.....	O ₂
Oxígeno singlete	¹ O ₂
Peróxido de hidrógeno.....	H ₂ O ₂
Peroxinitrito.....	OONO ⁻
Radical hidroxilo.....	•OH
Radical peroxilo.....	ROO•
Sintasa de óxido nítrico endotelial.....	NOSe
Sintasa de óxido nítrico inducible.....	NOSi
Sintasa de óxido nítrico neuronal.....	NOSn
Succinato deshidrogenasa.....	SDH
Sulfato ferroso.....	FeSO ₄
Superóxido dismutasa.....	SOD

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Estrés oxidativo y nitrosativo

El estrés oxidativo y nitrosativo se definen como una serie de eventos tóxicos producidos a nivel celular y molecular, debidos a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN), y la consecuente oxidación de sustratos biológicos (Halliwell., 1999; Santamaría et al., 2005; Valko et al., 2007). Estos eventos son tóxicos debido al desbalance que puede ocurrir entre la formación de las ERO/ERN en los sistemas biológicos, y una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos.

Las ERO y ERN son moléculas capaces de dañar funcionalmente cualquier estructura celular; los radicales libres forman parte de estas especies, pero no todas las especies reactivas son necesariamente radicales libres. Un radical libre se define como aquella molécula que tiene uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales atómicos o moleculares (Halliwell, 1999). Por lo general, los radicales libres son altamente reactivos y tiene un tiempo de vida media corto ($<1 \mu\text{seg.}$), y se combinan para generar moléculas más estables.

Las ERO, como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2); son bioproductos generados en el metabolismo redox normal, que transfieren electrones al oxígeno molecular (O_2). A su vez, las ERN también son generadas como moléculas reactivas en el metabolismo celular, y algunas de estas especies son el óxido nítrico (NO^\bullet) y el peroxinitrito (OONO^-).

Aunque se sabe que muchas de estas especies tienen funciones importantes en la célula, cuando el metabolismo se convierte en anómalo, ya sea por un estímulo endógeno o exógeno, la concentración de estas especies se incrementa significativamente y pueden llegar a niveles tóxicos (Santamaría et al., 2005; Valko et al., 2007).

Tanto el estrés oxidativo como el estrés nitrosativo son eventos que convergen y actúan de manera conjunta, mediando la activación en diferentes vías de transcripción, respuestas inflamatorias y diversas cascadas de señalización de muerte apoptótica y necrótica, a través de las especies reactivas (Santamaría et al., 2005).

Varias características implicadas en las acciones tóxicas de las ERO y ERN están presentes en diversas patologías, como son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la demencia tipo Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica. El estrés oxidativo y nitrosativo juegan un papel importante como un evento primario en estos desórdenes, lo cual no significa que estos eventos sean responsables de su origen.

2.1.1 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

El 21% de nuestra atmósfera es oxígeno molecular o dioxígeno (O_2), y la mayor parte de éste proviene de la oxidación de la molécula del agua, que es un proceso llevado a cabo por los organismos fotosintéticos. Aunque el O_2 puede ser tóxico, su toxicidad dependerá de la concentración y de su tasa de reactividad (Hansberg, 2008).

La mayor parte del O_2 que consumen los organismos aerobios se reduce a agua por el complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria mitocondrial. La toxicidad del O_2 se debe básicamente a la formación de ERO durante el metabolismo redox normal de la célula, que reduce de manera incompleta el oxígeno a agua, y cerca del 2 al 5% de éste escapa en una reducción univalente, resultando en la formación de ERO (Figura 1) (Pérez-De La Cruz, 2007a).

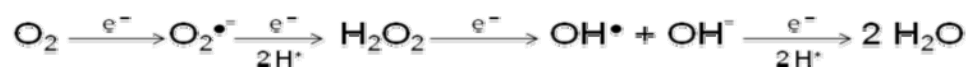


Figura 1. Reducción univalente del oxígeno

Se consideran ERO al oxígeno atómico (O), ozono (O₃), oxígeno molecular (O₂), oxígeno singulete (¹O₂), anión superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxilo ([•]OH) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). De igual manera, la toxicidad de las ERO dependerá de la concentración en la que se encuentre y del contexto bioquímico en que se producen.

El O₂^{•-} se forma cuando el O₂ capta un electrón, éste se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales π* y forma así O₂^{•-}, que es a la vez un anión y un radical (Hansberg, 2008). El O₂^{•-} es producido por numerosas enzimas en la célula, entre las que destacan las xantina oxidasa, las ciclo-oxigenasas y las oxidasas mitocondriales. Sin embargo, las fuentes más importantes de O₂^{•-} para la célula son producidas en la cadena respiratoria mitocondrial, debido a que una mínima fracción (1-2%) del O₂ es reducido incompletamente al anión superóxido (Valko et al., 2004). Otra fuente importante de este radical para la célula son las NADPH oxidasas, las cuales catalizan la transferencia de un electrón al O₂, y de esta manera forman al O₂^{•-}. Las NADPH oxidasas son una familia de enzimas localizadas en la membrana plasmática de diversas células y aunque su función puede variar dependiendo de la NADPH oxidasa que se trate, es por demás sabido que estas enzimas participan en el sistema de defensa del organismo que las contiene (Geiszt, 2006).

La toxicidad del O₂^{•-} depende básicamente de su habilidad para formar otros ERO, ya que se considera un radical poco reactivo; por lo tanto es un oxidante débil y su capacidad para difundir es lenta. A partir de la interacción con otras moléculas el O₂^{•-} puede dar paso a la formación de otras ERO, tales como [•]OH, el OONO⁻ ó el H₂O₂; esta reacción dependerá de que existan metales de transición en el medio, óxido nítrico o de la actividad de algunas enzimas (Sas et al., 2007).

El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H₂O₂) se forma cuando cada uno de los dos electrones libres del O₂ se han apareado con un electrón del giro contrario. Como estos

electrones entraron en los orbitales anti unión, en el H₂O₂ las dos ligaduras del O₂ se han reducido a una (Hansberg, 2008).

El H₂O₂ se produce principalmente por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), aunque también puede ser producido por otras fuentes, tales como son el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y la actividad de la xantina oxidasa (Forman et al., 2010). El H₂O₂ tiene una alta capacidad para difundir a través de los compartimientos celulares; su toxicidad dependerá de su capacidad para difundir y reaccionar con otras ERO o metales de transición, y dar paso así a la formación del •OH, ya sea a través de la reacción de Fenton o la de Haber-Weiss (Sas et al., 2007).

El •OH se genera por medio de la reacción de Fenton, cuando el H₂O₂ acepta un electrón desapareado de un metal de transición como el Fe (II) o el Cu (I), y se fragmenta formando el •OH y el ión hidroxilo OH⁻. También puede originarse a través de la reacción de Haber-Weiss, utilizando al O₂^{•-} y al H₂O₂, y ser catalizada por el hierro (Figura 2) (Hansberg, 2008).

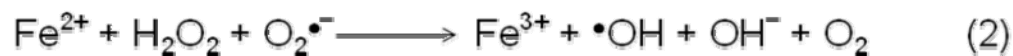
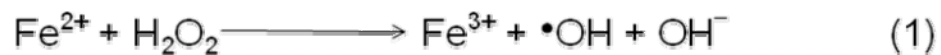


Figura 2. Reacción de Fenton (1) y Reacción de Haber-Weiss (2).

Por lo general, la reacción de Haber-Weiss no ocurre *in vivo*, debido a que existen otros compuestos reductores en la célula; y por lo tanto la producción de •OH es a través de la reacción de Fenton, aunque también puede ser generado por una variedad de mecanismos, tales como son la radiación ionizante que causa la descomposición del H₂O₂, resultando en la formación de •OH; o bien por descomposición fotolítica de

alquilhidroperóxidos (Valko et al., 2004).

El $\bullet\text{OH}$ es un radical altamente reactivo, sin embargo su capacidad para difundir es baja y su tiempo de vida media es también muy bajo ($<$ a 1 nano-segundo), por lo cual en condiciones *in vivo* reacciona muy cerca de su sitio de origen. Al tener una alta capacidad oxidante, puede reaccionar con casi cualquier molécula biológica; ya sea ácidos nucleicos, proteínas o lípidos. Este radical puede dañar funcional y estructuralmente a las macromoléculas de la célula; causando daño irreversible a las proteínas al reaccionar con cualquier aminoácido que se encuentre, además de atacar a los lípidos de las membranas celulares, generando así una serie de reacciones que dañan severamente a la membrana plasmática y a las membranas de los diferentes organelos. También oxida a las bases nitrogenadas del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Valko et al., 2004).

Para que la reacción de Fenton ocurra debe haber disponibles metales de transición como el Fe (II) o el Cu (I) en el medio, por lo cual es necesario que exista una fuente de dichos metales en la célula, ya que la cantidad de metales libres en el citosol es muy baja. Las metaloproteínas, son proteínas que tienen la capacidad de secuestrar uno o varios metales y liberarlos dependiendo de las condiciones del medio. También existen las chaperonas de metales; las cuales son proteínas que suministran el metal de manera específica a los sitios de las proteínas que lo requieren (Hansberg, 2008).

2.1.2 Especies reactivas del nitrógeno (ERN)

Las ERN son moléculas reactivas derivadas del nitrógeno y al igual que las ERO; se generan en el metabolismo celular; algunas de estas especies son el $\text{NO}\bullet$, OONO^- , el dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\bullet$) y el ácido nitroso (HNO_2), entre otros.

El $\text{NO}\bullet$, se forma por la acción de la sintasa de óxido nítrico (NOS), la cual a partir de

la L-arginina, O₂ y NADPH forma al NO•, L-citrulina y NADP⁺ oxidado (Figura 3). El NO• es un gas incoloro y no tiene carga eléctrica, por lo cual es altamente soluble en solventes orgánicos, y por ende tiene una alta capacidad para difundir a través de las membranas celulares.



Figura 3. Reacción de la NOS

Se han identificado tres isoformas de la NOS en mamíferos, dos constitutivas y una inducible. La NOS neuronal (NOS_n) y la NOS endotelial (NOS_e) se consideran constitutivas y su actividad está regulada a nivel post-traducciona; la NOS inducible (NOS_i) se encuentra en células gliales y macrófagos. Su actividad está regulada por la unión de la calmodulina y Ca²⁺; sin embargo, la actividad de la NOS_i puede ser independiente del calcio (Pérez-De La Cruz, 2007a).

En condiciones fisiológicas normales, el NO• funciona como un mensajero biológico y un segundo mensajero que participa en algunos procesos tales como la regulación del tono vascular, el aprendizaje y la memoria, y la neurotransmisión (Pérez-Severiano et al., 1998). Sin embargo, en condiciones patológicas u anómalas del metabolismo celular, se ha observado que el NO• inhibe de manera reversible la actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria mitocondrial, disminuyendo su afinidad por el O₂ y el flujo de electrones de la cadena, por lo tanto la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) también disminuye (Moro et al., 2005).

El OONO⁻ es una especie altamente oxidante, que se forma por la reacción entre el NO• y el O₂^{•-}, y es conocido como un potente promotor de daño neuronal (Figura 4). Existen varios mecanismos por los cuales este anión ejerce daño celular, entre los que destacan la

nitricación de residuos de tirosina, la peroxidación de lípidos, la oxidación de grupos sulfhidrilos y la fragmentación de ADN (Moro et al., 2005).



Figura 4. Formación del OONO^-

El OONO^- reacciona rápidamente con el dióxido de carbono (CO_2) para formar el anión nitroso peroxicarboxilato (ONOOCO_2^-), que también puede protonarse para formar el ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual se descompone en $\cdot\text{OH}$ y $\text{NO}_2\cdot$ (Pérez-De La Cruz, 2007a). En el sistema nervioso, el OONO^- puede ser generado por las células microgliales y activar así a citocinas pro-inflamatorias; en las neuronas también exagera los procesos inflamatorios y contribuye directamente en eventos de neurodegeneración (González-Cortés et al., 2008).

2.1.3 Daño oxidativo

Un desbalance en el estado redox celular en favor de la actividad oxidativa nos lleva a un aumento en la cantidad de las especies reactivas; y dichas especies tienen la capacidad de oxidar a casi cualquier molécula, siendo sus principales blancos celulares los lípidos, las proteínas y el ADN.

- Proteínas:

Las proteínas son los componentes más abundantes de los organismos y son los blancos iniciales en reacciones con las ERO. Du y colaboradores (2004) observaron que la oxidación de las proteínas es el primer fenómeno que se observa en el daño oxidativo inducido por $\cdot\text{OH}$, antes incluso que el daño a lípidos y ADN.

Los sitios principales de daño a las proteínas son los residuos alifáticos y azufrados,

los anillos aromáticos, los grupos tiol, las cadenas laterales, el esqueleto del carbono y aminoácidos específicos como son el triptófano, tirosina, histidina, metionina, cisteína y fenilalanina (Zentella & Piña, 2008).

Como resultado de la exposición a las ERO/ERN, algunos cambios pueden ocurrir en las proteínas, incluyendo modificación en los aminoácidos, fragmentación, agregación, formación de grupos carbonilo, disminución o pérdida de la función biológica e incremento en la susceptibilidad proteolítica (Salvi et al., 2001). Las proteínas que son severamente afectadas por el daño oxidativo son las proteínas estructurales, las enzimas y las proteínas de membrana (transportadores, receptores, canales iónicos).

Los sistemas de reparación para las proteínas son muy limitados; las reductasas de sulfóxidos convierten las formas oxidadas de cisteína y metionina a sus formas originales no modificadas. Sin embargo, son prácticamente las únicas alteraciones de proteínas que pueden ser reparadas, ya que cuando otra clase de proteínas es oxidada, éstas son catabolizadas para evitar su difusión e interacción con otras moléculas (Zentella & Piña, 2008).

La concentración de grupos carbonilo generados por varios mecanismos y vías oxidativas es una buena medida del índice de oxidación de las proteínas inducido por ERO/ERN (Valko et al., 2007).

- Lípidos:

Los lípidos son las principales moléculas que conforman a las membranas celulares y de los diversos organelos. Las especies reactivas atacan a estos componentes de membrana generando una gran variedad de compuestos tóxicos, y alterando la fluidez y permeabilidad de la membrana, situación que compromete la estructura y función celular. La peroxidación de lípidos se define como el deterioro oxidativo de los lípidos poli-insaturados.

Los ácidos grasos poli-insaturados son los más susceptibles al ataque de las ERO/ERN, debido a la presencia de sus enlaces dobles conjugados, los cuales debilitan la energía de unión del átomo de hidrógeno presente en el carbono adyacente a los enlaces (Zenteno & Saldaña, 2008).

La lipoperoxidación inicia cuando el residuo de un ácido graso poli-insaturado es atacado por una especie reactiva, la cual sustrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, dejando un electrón desapareado y generando un radical lipídico (R^\bullet). Este radical lipídico se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que produce un dieno conjugado, el cual reacciona con el O_2 y se genera un radical hidroperoxilo ó peroxilo (ROO^\bullet); este radical oxida a su vez a otro átomo de hidrógeno del carbono metileno de otro ácido graso poli-insaturado adjunto para quedar como un hidroperóxido lipídico ($ROOH$), y formar así un nuevo radical lipídico y un hidroperoxilo. El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y continúa la reacción en cadena. De esta manera se propaga la lipoperoxidación a través de la membrana. La lipoperoxidación puede finalizar cuando el radical reacciona con otra molécula; ya sea un segundo radical lipídico o con una molécula antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno, y terminar así la cadena de reacciones (Halliwell & Chirico, 1993).

La lipoperoxidación genera una serie de productos diversos, el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) son productos finales de este evento y se consideran altamente tóxicos ya que pueden interactuar directamente con proteínas y ADN (Valko et al., 2007).

- ADN:

El ADN es una macromolécula de gran importancia, ya que contiene la información genética, además de estar presente en una única copia en cada célula. El daño al ADN tiene consecuencias biológicas serias como mutaciones, carcinogénesis e incluso apoptosis.

Las principales especies reactivas que participan en el daño oxidativo al ADN son el $^1\text{O}_2$, $\bullet\text{OH}$ y OONO^- ; estas especies son capaces de interactuar de manera directa sobre el ADN ejerciendo su acción sobre todos los componentes de la molécula, ya sean bases nitrógenadas, azúcares ó fosfatos, además de afectar diversos procesos, tales como la transducción de señales y división celular (Medeiros, 2008).

Tanto las purinas como las pirimidinas pueden sufrir alteraciones por acción de las especies reactivas; sin embargo, la guanina es la base nitrogenada que presenta el potencial de ionización más bajo entre los componentes de los ácidos nucleicos, y por lo tanto es la base más susceptible de ser oxidada (Medeiros, 2008).

El daño en los azúcares del ADN inducido por $\bullet\text{OH}$ inicia con la sustracción de un átomo de hidrógeno unido a un carbono, lo cual lleva a la generación de reacciones subsecuentes, concluyendo con la degradación de la desoxirribosa y originando una gran variedad de productos electrofílicos (Medeiros, 2008). Las diversas formas de daño al ADN inducidas por ERO/ERN se pueden presentar como modificaciones en las bases y azúcares, ruptura de la doble cadena, entrecruzamiento de proteínas con ADN, bloqueo de la replicación y anormalidades cromosómicas (Valko et al., 2004).

Una alteración al ADN que ha sido muy estudiada es la formación de 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG), la cual es una modificación permanente del material genético debido al ataque de ERO/ERN. El 8-oxo-dG se ha tomado como un marcador de daño oxidativo al ADN, además de estar implicado en la carcinogénesis, envejecimiento y diversos desórdenes (Valko et al., 2004).

Existen diversos mecanismos de reparación del ADN que consisten en una amplia gama de enzimas que se activan cuando hay modificaciones y reconocen las anomalías en el ADN, reparando el daño por escisión, re-síntesis y reincorporación del filamento del ADN (Medeiros, 2008).

2.1.4 Sistemas antioxidantes endógenos

Debido a la característica tóxica de las especies reactivas, y a que nos encontramos en una atmósfera rica en oxígeno, la célula ha evolucionado y desarrollado sistemas antioxidantes, que le permiten remover y destoxicarse de ellas. Estos sistemas se han dividido en dos grandes grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos.

2.1.4.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

La célula posee enzimas específicas que catalíticamente neutralizan a las especies reactivas, generando especies menos reactivas; estas enzimas se expresan en un número de isoformas y están distribuidas en varios organelos y compartimientos subcelulares. Asimismo, participan cooperativamente en una red de reacciones metabólicas interconectadas para eliminar a las especies reactivas; entre ellas se encuentran las siguientes:

- Superóxido dismutasa (SOD): Es una metaloproteína encargada de catalizar la dismutación de dos moléculas del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y oxígeno molecular (Figura 5); por medio de las reacciones de oxidación y reducción del metal que se encuentra en su sitio activo.



Figura 5. Reacción de la SOD

Las SOD son una familia de enzimas de las cuales en mamíferos se han encontrado tres isoformas distribuidas en diferentes compartimientos celulares. La SOD 1 o Cu/Zn SOD se encuentra en el citoplasma y tiene un ión cobre y un ión zinc en su sitio activo; la SOD 2 o Mn SOD se localiza en la membrana interna de la mitocondria y une manganeso a su sitio catalítico; y por último, la SOD 3 o EC-SOD, la

cual se localiza unida a la matriz extracelular, y al igual que la SOD 1, une un ión cobre y un zinc en su sitio catalítico (Whittaker, 2010).

- Catalasa (CAT): Es una hemoproteína tetramérica que se localiza principalmente en los peroxisomas y se encarga de catalizar la conversión de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a una molécula de agua y una de oxígeno molecular (Figura 6), utilizando una molécula como agente reductor y otra como oxidante (Putnam et al., 2000). Se considera una enzima antioxidante muy eficiente, debido a que no tiene un grado de saturación, y disminuye la probabilidad de formación del $\bullet\text{OH}$.



Figura 6. Reacción de la CAT

- Glutación peroxidasa (GPx): Es una enzima dependiente de selenio (Se), la cual cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos a agua y alcohol respectivamente, utilizando como donador de electrones al tripéptido, llamado glutación reducido (GSH), el cual queda como glutación oxidado (GSSG) (Figura 7).



Figura 7. Reacción de la GPx con H_2O_2 (1) y con hidroperóxidos orgánicos (2).

En mamíferos hay cuatro principales isoformas de la GPx, y aunque todas son dependientes de Se y de la presencia de GSH, los sustratos a los que son específicos pueden variar; las isoformas son: la citosólica (GPx1), la gastrointestinal (GPx2), la

plasmática (GPx3) y la de fosfolípidos (GPx4). En cerebro, la GPx1 parece ser una de las defensas antioxidantes más importantes, ya que en ratones deficientes de Gpx1, expuestos a diferentes modelos experimentales de estrés mostraron ser severamente más dañados en comparación con los ratones silvestres (Dringen et al., 2005).

- Glutación reductasa (GR): Esta flavoenzima cataliza la conversión del glutati3n oxidado, tambi3n llamado disulfuro de glutati3n (GSSG) a glutati3n reducido (GSH); utilizando como co-factor al NADPH (Figura 8). El proceso llevado a cabo por estas dos enzimas (Gpx y GR), se conoce como el ciclo redox del glutati3n; la tasa relativa de las formas reducidas/oxidadas es alrededor de 100, bajo condiciones normales, pero disminuye a 49 bajo condiciones de estr3s (Aoyama, 2008).

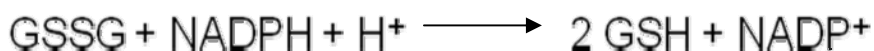


Figura 8. Reacci3n de la GR

- Glutati3n S-transferasa (GST): Es una familia de enzimas que se encarga de catalizar la reacci3n entre el GSH y grupos electr3filicos de diversos compuestos end3genos o xenobi3ticos (Figura 9); generando conjugados con el GSH (glutati3n S-conjugados); los cuales son exportados fuera de la c3lula (Aoyama, 2008).

Esta reacci3n da como resultado no s3lo la remoci3n del electr3filo v3a su metabolismo subsiguiente o transporte fuera de la c3lula, sino que tambi3n contribuye a la eliminaci3n potencial del GSH, sobre todo si la s3ntesis del mismo no est3 en equilibrio con la tasa de supresi3n del electr3filo (Fern3ndez & Garc3a, 2008).

La degradaci3n de los glutati3n S-conjugados comienza en el espacio extracelular por acci3n de 2 enzimas, las cuales catalizan al conjugado y liberan al

GSH, el cual a su vez también es degradado y resintetizado.

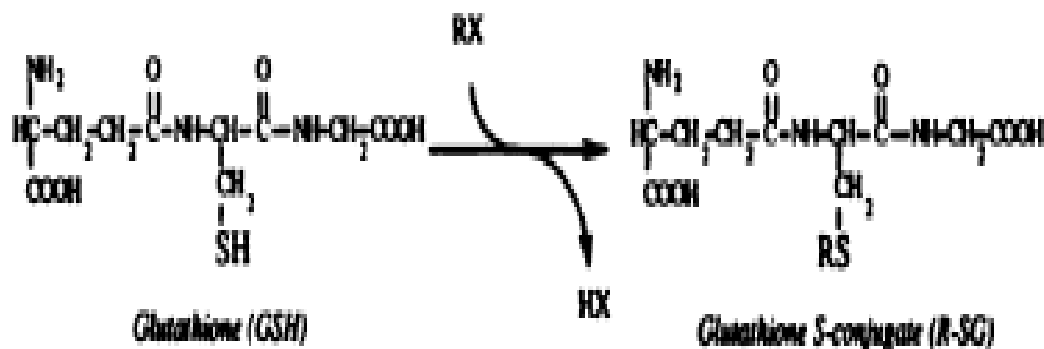


Figura 9. Reacción del GSH con cualquier grupo electrofílico (Tomado de Commandeur et al., 1995).

En mamíferos existen 3 isoformas de la GST (α , μ y π); en el SNC se expresan las 3 isoformas. La isoforma α se expresa en astrocitos, neuronas y células ependimales, la μ sólo en neuronas y astrocitos, y la π se expresa exclusivamente en oligodendrocitos (Dringen, 2000).

Estas enzimas no tienen un sustrato natural para funcionar; aunque diversos productos generados por la oxidación de algunas biomoléculas, como el 4-hidroxi-2-nonenal, pueden funcionar como sustrato. Los compuestos pueden formar conjugados con el GSH, ya sea de manera espontánea o por acción de la GST; sin embargo, algunos estudios han observado que la reacción es de 300 a 600 veces más rápida por medio de la enzima (Xie et al., 1998).

2.1.4.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Existe una gran variedad de moléculas con actividad antioxidante; su mecanismo principal se basa en la donación de un electrón a un radical libre para estabilizarlo y generar moléculas menos reactivas, las cuales no dañan la integridad celular. Entre estas moléculas destacan las siguientes:

- Glutación (GSH): El tripéptido glutación reducido (GSH) es un tiol no proteico compuesto de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Su síntesis ocurre en el citoplasma por la acción consecutiva de dos enzimas, las cuales requieren de la hidrólisis de ATP; la γ -glutamilcisteína ligasa (γ GCL) utiliza al glutamato y a la cisteína como sustratos, formando el dipéptido γ -GluCys, y éste a su vez se combina con la glicina en una reacción catalizada por la glutación sintetasa (GS) para generar al GSH (Figura 10). Los niveles intracelulares de GSH son regulados por una retroalimentación inhibitoria de la enzima GCS, debido a las concentraciones del mismo (Dringen, 2000).

El GSH es el mayor antioxidante endógeno en el cerebro, con una concentración de 2 a 3 mM, y ejerce su efecto por diferentes mecanismos. Un mecanismo muy importante del GSH es que puede reaccionar directamente con diferentes especies reactivas como el $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, NO^{\bullet} y el $OONO^-$ (Clancy et al., 1994; Winterbourn & Metpdiawa, 1994).

El GSH sirve también como un cofactor esencial para diferentes enzimas, funcionando como un donador de electrones para la reducción de H_2O_2 u otros peróxidos en una reacción catalizada por la GPx, además de reaccionar con varios compuestos endógenos ó xenobióticos - acción mediada por la actividad de la GST - (Aoyama, 2008).

Otra importante función del GSH es la de unir metales y funciona en la movilización y distribución de los mismos entre sus diversos ligandos, así como su transporte a través de las membranas celulares. De igual manera, el GSH puede funcionar como agente reductor o cofactor en las reacciones redox que involucran metales (Fernández & García, 2008).

El almacenamiento y transporte de la cisteína es otra función del GSH; éste

aminoácido es muy inestable y se auto-oxida a cistina por un proceso que produce ERO, por lo cual el GSH es un reservorio de cisteína (Fernández & García, 2008), además de ser el mayor sistema de amortiguamiento redox, ya que mantiene la homeostasis intracelular redox al mantener los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas en su forma reducida (Dringen, 2000).

El GSH utilizado para las reacciones de la GPx es reciclado por la GR; sin embargo, el GSH que es liberado por las células y el que es utilizado por la actividad de la GST para la generación de los glutatión S-conjugados, es degradado y resintetizado a partir de los aminoácidos constituyentes.

La degradación del GSH o de los glutatión S-conjugados ocurre exclusivamente en el espacio extracelular por la acción de la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ GT). Esta enzima remueve al γ -glutamil generando al dipéptido cisteinilglicina (CysGly). Posteriormente, el CysGly es hidrolizado por ectopeptidasas, las cuales rompen el enlace peptídico entre la cisteína y la glicina. Estos aminoácidos son subsecuentemente recapturados por las células y pueden servir una vez más para la síntesis del GSH (Dringen, 2000).

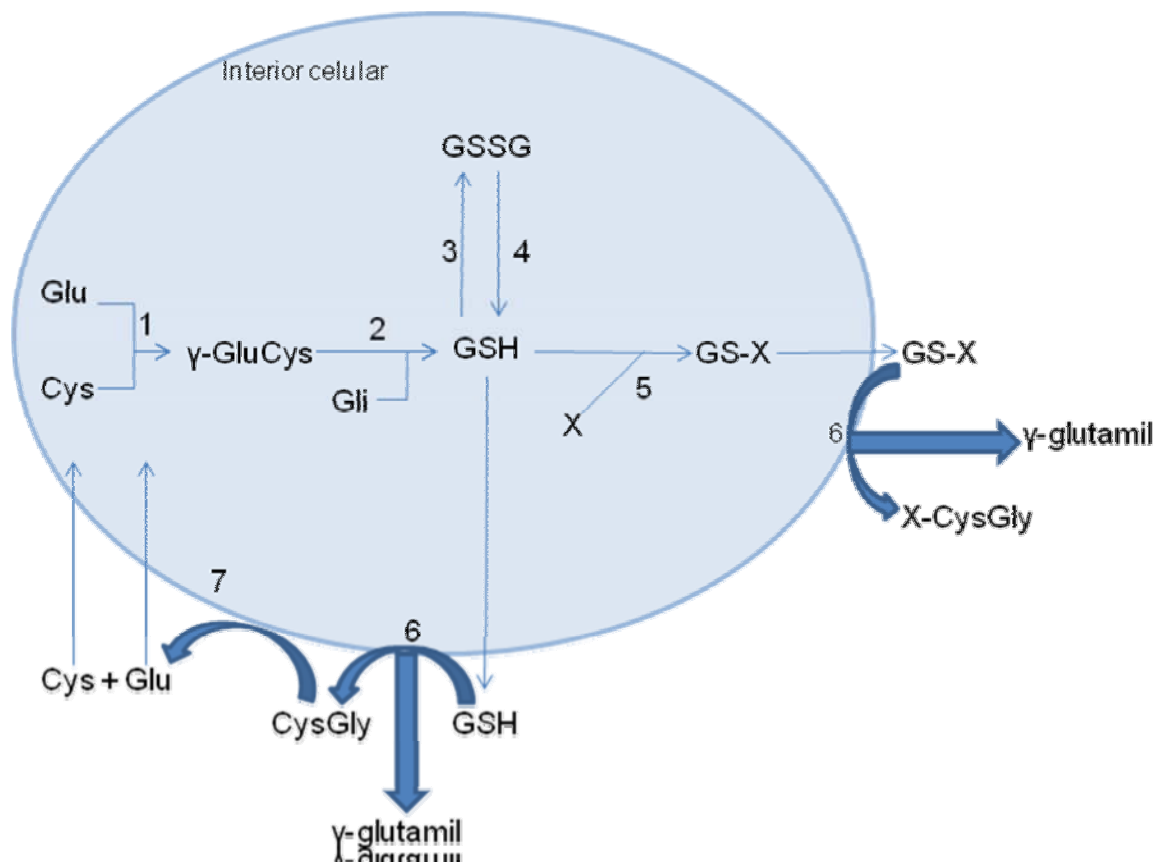


Figura 10. Metabolismo del glutatión. 1, γ -glutamilcisteína ligasa; 2, glutatión sintetasa; 3, glutatión peroxidasa; 4, glutatión reductasa; 5, glutatión S-transferasa; 6, γ -glutamil transpeptidasa; 7, ectopeptidasas; X representa un sustrato para la GST.

- Vitamina C (ácido ascórbico): Esta molécula de carácter hidrofílico se encuentra mayoritariamente en plasma y en menor concentración en el citoplasma; su propiedad antioxidante radica en su capacidad de donar un electrón a diversas especies reactivas (1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, etc.), generando al radical ascorbilo, el cual es de baja reactividad y puede ser reducido a ascorbato por acción de las NADH- y NADPH reductasas. Si el radical ascorbilo no es reducido, dos moléculas de éste pueden dismutar y formar una molécula de ascorbato y una de ácido dehidroascórbico (DHA). El DHA puede ser reciclado ya sea por la acción directa del GSH o por el sistema tiorredoxina reductasa (Harrison & May, 2009).

En el sistema nervioso, a la vitamina C se le han atribuido diferentes funciones,

tales como son en la maduración neuronal, la neurotransmisión, el mantenimiento del metabolismo celular, la síntesis de colágena y la reducción monovalente del Fe^{3+} o Cu^{2+} en los sitios activos de ciertas enzimas (Harrison & May, 2009).

- Vitamina E (α -tocoferol): Esta vitamina de carácter lipofílico se acumula en lipoproteínas y membranas celulares; se compone de un conjunto de derivados tocoferoles y tocotrienoles. Su principal función es proteger la membrana celular del ataque de las especies reactivas, reaccionando con el radical peroxilo (ROO^\bullet) y formando al radical α -tocoferilo ($\alpha\text{-Toc}^\bullet$), el cual es insuficientemente reactivo y detiene la cadena de lipoperoxidación. El $\alpha\text{-Toc}^\bullet$ formado puede reaccionar con otro radical, o bien ceder un átomo de hidrógeno a otro radical, convirtiéndose en una molécula estable (Saldaña, 2008).

A continuación en la tabla 1 se presenta, un resumen de las principales especies reactivas y algunas de sus características.

Tabla 1. Principales especies reactivas y sus características.

Especie Reactiva	Fuente	Concentración intracelular	Reactividad	Eliminación
$^1\text{O}_2$	Descomposición del H_2O_2 , dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\bullet-}$, etc.	pM	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos, etc.	Tocoferoles, glutatión y ascorbato.
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Cadena respiratoria mitocondrial, NADPH oxidasas, xantina oxidasas, ciclooxigenasa.	pM - μM	$\text{O}_2^{\bullet-}$, NO^\bullet , Fe (III).	SOD, dismutación espontánea, glutatión.
$^\bullet\text{OH}$	Reacción de Fenton	≈ 0	Cualquier compuesto cercano.	Glutatión, ascorbato, etc.
H_2O_2	Dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$, oxidasas.	nM - μM	Ascorbato, grupo hemo.	Catalasa, peroxidasas, Gpx.
NO^\bullet	NOS	nM	$\text{O}_2^{\bullet-}$, grupo hemo.	Hemoglobina, glutatión.
OONO^-	$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{NO}^\bullet$	pM	Proteínas, lípidos, CO_2 , tioles.	Espontánea

(pM) picomolar; (nM) nanomolar ; (μM) micromolar.

2.2 *Garcinia mangostana* Linn

La *Garcinia mangostana* Linn es un árbol perteneciente a la Familia *Guttiferae*; la cual alberga aproximadamente 40 géneros y casi 1000 especies generalmente confinadas a climas tropicales húmedos. Es comúnmente llamado “Mangostan”, y se le conoce como la “reinas de las frutas” debido a su agradable sabor y aroma (Figura 11).

La mayoría de las especies de la familia *Guttiferae* son árboles o arbustos y algunos de ellos son utilizados para producción de madera; por ejemplo, los géneros *Garcinia*, *Clusia* y *Calophyllum* (Sultanbawa, 1980). La distribución de esta familia es amplia y variada, dependiendo de la especie o género de que se trate, además de que algunos géneros son endémicos de su lugar de origen.

El género *Garcinia* perteneciente a la subfamilia *Garcinieae* comprende 220 especies que se distribuyen en el sureste del continente Asiático, principalmente en países como Tailandia, Malasia, Sri Lanka, Indonesia y Las Filipinas (Morton, 1987). A varias especies de este género se les han atribuido diferentes propiedades medicinales, fundamentalmente en el sureste de Asia (Chopra et al., 1956). Aunque se han descrito 220 especies para este género, no se conoce a fondo todas las características taxónomicas del grupo, ni tampoco se conoce en su totalidad las propiedades medicinales que cada especie puede tener.

2.2.1 Descripción

La *G. mangostana* es un árbol de crecimiento muy lento, por ello no se deben de esperar frutos hasta varios años después de su nacimiento. Llega a alcanzar de 10 a 12 metros de altura y su corteza es de color café oscuro, pero en el interior tiene un color amarillento. Sus hojas son gruesas y ovaladas de color verde oscuro y sus flores son de 4 a 5 cm de ancho, son de color amarillo rojizo y pueden ser solitarias o agruparse en racimos (de 3 a 9 flores

por racimo) en las puntas de las ramas (Figura 11) (Morton, 1987).

El fruto es redondo, de color púrpura oscuro a púrpura rojizo, es de textura suave y mide 3.4 a 7.5 cm. de diámetro, y está cubierto parcialmente por un prominente cáliz, el cual está unido por un pedúnculo a las ramas. El pericarpo o cáscara mide de 6 a 10 mm. de grosor, es suave y de color rojizo. Cubre totalmente a una pulpa de color blanco, la cual está dividida en 4 a 8 segmentos triangulares suaves y jugosos. El fruto puede no tener semillas o tener de 1 a 3 semillas totalmente desarrolladas, las cuales se pegan a la pulpa (Figura



12). El sabor de la pulpa es dulce y ligeramente ácido, además de tener un aroma muy agradable, lo cual lo hace un fruto muy aclamado (Nagy et al., 1980; Morton, 1987).

Además de ser un alimento el mangostán tiene uso medicinal (Sultanbawa, 1980). Tradicionalmente en el sureste de Asia se ha utilizado el pericarpo del fruto para el tratamiento de diversos padecimientos como son la disentería (Garnett et al., 1932), diarreas (Chopra et al., 1956), edemas y heridas

Figura 11. *G. mangostana* (Tomado de Morton, 1987). en la piel (Morton, 1987), además de que se le han atribuido actividades antimicrobianas (Mahabusarakam et al., 1986) y anti-inflamatorias (Shankaranarayanan et al., 1979). El mangostán es un árbol tropical por lo cual está adaptado a temperaturas cálidas de alrededor de 37.7° como máximo, y requiere una precipitación anual de 127 cm., y no tolera largos períodos de sequías (Morton, 1987).

2.2.2 Origen y distribución

El origen del *G. mangostana* es controversial, ya que autores como Julia F. Morton (1987) afirman que el origen del mangostán es desconocido y se sugiere que pudo haber sido en las Islas Molucas. En cambio, otros autores afirman que el origen del mangostán es en el este de la India, y se ha ido distribuyendo al sureste de Asia (Wan, 1973; Du et al., 1977).

Gracias a los efectos benéficos del mangostán en el tratamiento de diversas enfermedades, desde hace varias décadas atrás se ha cultivado en diferentes regiones del mundo y se cree que pudo haber sido cultivado por primera vez en Tailandia. Actualmente, la distribución de *G. mangostana* predomina en el sureste del continente asiático, fundamentalmente en Malasia, Tailandia, Sri Lanka, Indonesia y Las Filipinas (Morton, 1987).



Figura 12. Fruto del mangostán

2.2.3 Composición

El hecho de que el mangostán presente diferentes propiedades benéficas ha impulsado la realización de diversas investigaciones para conocer y entender sus compuestos y propiedades.

El mangostán contiene una gran variedad de componentes entre los que destacan carbohidratos, vitaminas, antocianinas, flavonoides (catequinas), benzofenonas glucosiladas, pectinas, taninos, resinas y una inmensa variedad de xantonas (Garrity et al., 2004; Huang et

al., 2001). Las xantonas son compuestos biológicamente activos y son de gran interés en los diversos estudios farmacológicos por la gran variedad de efectos benéficos a la salud que presentan.

2.2.4 Xantonas del mangostán

Las xantonas son metabolitos secundarios biológicamente activos. Estos metabolitos se encuentran en diferentes organismos como plantas, algunas especies de hongos y líquenes (Viera & Kijjoa, 2005). El núcleo de las xantonas se conoce como 9-xantenona o dibenzo- γ -pirona (Figura 13), es simétrico y las actividades biológicas de estos componentes se asocian con su estructura tricíclica, aunque también depende de la naturaleza y posición de los diferentes sustituyentes, lo que da lugar a una gran variedad de estructuras químicas (Pinto et al., 2005).

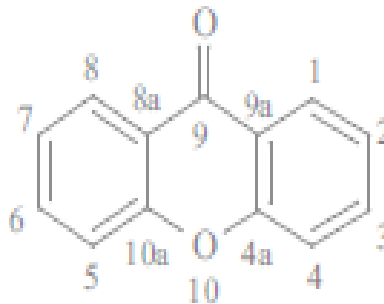


Figura 13. Núcleo de las xantonas (Tomado de Pinto et al., 2005)

Alrededor de 50 xantonas preniladas y oxigenadas se han encontrado en el pericarpo, tronco, ramas y hojas de *G. Mangostana* (Figura 14) (Pedraza-Chaverri et al., 2008). En varios estudios se ha demostrado que las xantonas aisladas del mangostán presentan diversas actividades biológicas. Algunas de estas actividades son: anti-oxidante (Weecharangsan et al., 2006), anti-inflamatorio (Shankaranarayan et al., 1979), anti-tumoral (Matsumoto et al., 2003), anti-bacterial (Suksamrarn et al., 2003) y anti-micótico

(Gopalakrishnan et al., 1997).

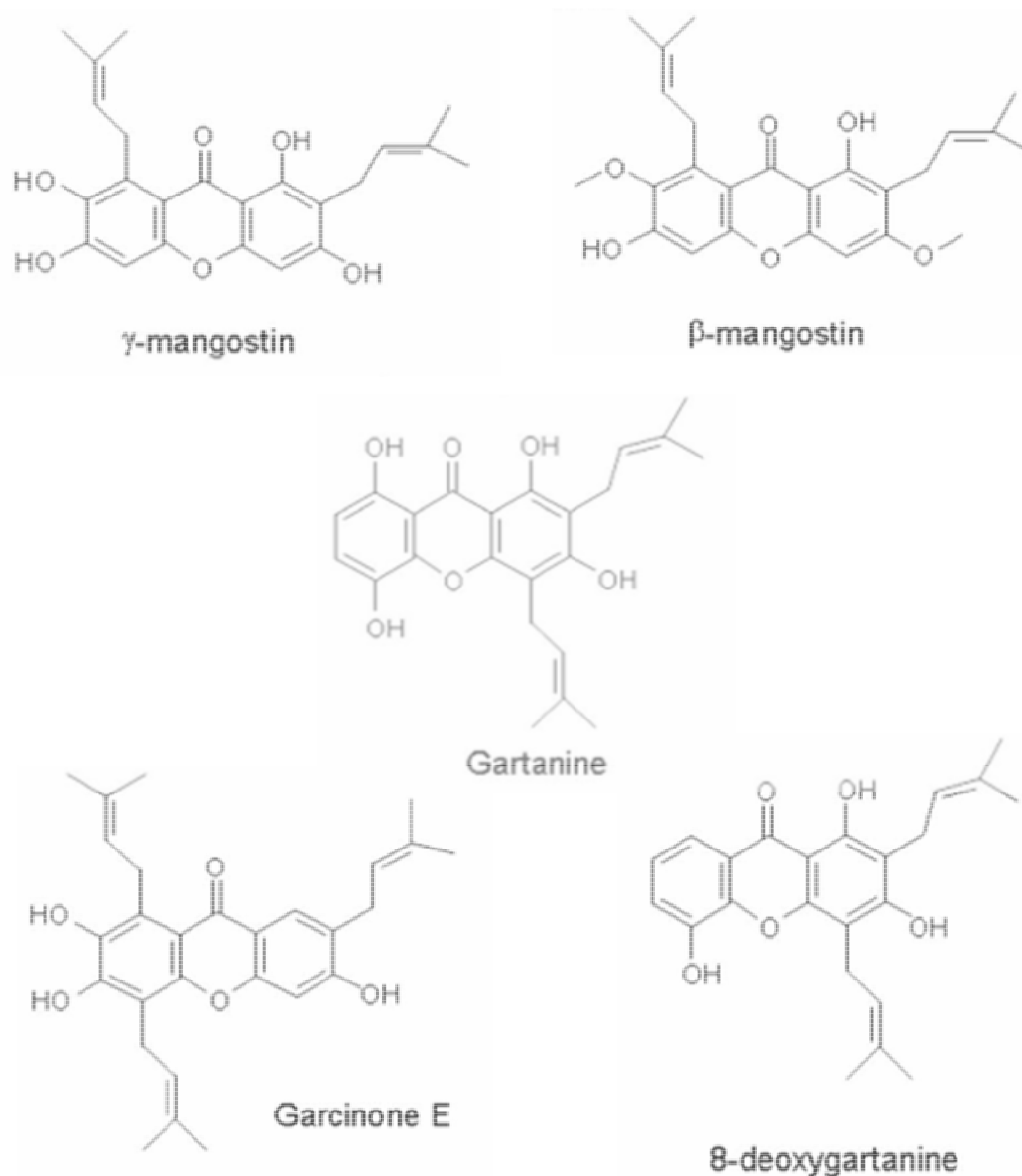


Figura 14. Estructura química de las xantonas más estudiadas del mangostán (Tomado de Pedraza-Chaverri et al., 2008).

2.3 Alfa-mangostina

La primer xantona aislada del pericarpo del fruto del mangostán fue la mangostina (posteriormente llamada α -mangostina) y fue aislada en 1855 por Schmid W. La α -mangostina es un compuesto de color amarillo obtenido del pericarpo de *G. mangostana*; aunque puede también aislarse de la corteza, savia seca y otras partes del árbol. Su

estructura molecular se propuso por primera vez en los trabajos de Yates y Stout en 1958, los cuales establecieron la naturaleza y posición de las cadenas laterales y del núcleo, y sus posibles vías de degradación (Figura 15). Una gran variedad de investigaciones han revelado las diferentes actividades biológicas que la α -mangostina presenta, a continuación se mencionan brevemente.

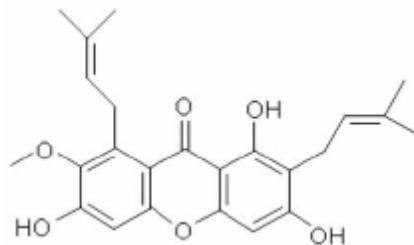


Figura 15. Estructura química de la α -mangostina

2.3.1 Propiedades anti-tumorales

En 2004 el grupo de Moongkarndi evaluó la actividad antiproliferativa de 9 diferentes plantas medicinales de Tailandia, incluyendo el extracto de *G. mangostana*, contra una línea celular de adenocarcinoma humano SKBR3, y encontraron que el extracto del mangostán resultó ser el más potente al inhibir el crecimiento con un valor de IC_{50} de $15.45 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$.

Matsumoto (2003) y colaboradores analizaron el efecto de seis xantonas del mangostán (α -mangostina, β -mangostina, γ -mangostina, garcinona E, mangostinona y 2-isoprenil-1,4-dihidroxy-3-metoxyxantona) en la inhibición de crecimiento de una línea celular de leucemia humana HL60. Aunque todas las xantonas inhibieron significativamente el crecimiento celular, las xantonas α -, γ -, β -mangostina disminuyeron el crecimiento desde dosis bajas ($10 \mu\text{M}$). Sorprendentemente, a esa concentración la α -mangostina inhibió totalmente el crecimiento celular; además, determinaron que la α -mangostina induce muerte celular vía apoptosis en diferentes líneas celulares de leucemia (HL60, K562, NB4 y U937).

Posteriormente, en 2005, el mismo grupo de colaboradores, al continuar con la línea de investigación, determinaron que 3 xantonas (γ -, β - y α -mangostina) obtenidas del pericarpo del mangostán a una concentración 20 μ M, inhiben el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon humano DLD-1. Además, demostraron que la γ -mangostina y la α -mangostina inducen condensación y fragmentación nuclear. También concluyeron que las xantonas pueden detener el ciclo celular: α - y β -mangostina en G1/G0, y γ -mangostina en la fase S del ciclo, ésto a través de la alteración de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, lo cual se encuentra en estrecha relación con el efecto antiproliferativo de las xantonas.

En 2006, Suksamrarn y colaboradores determinaron la actividad citotóxica de 19 xantonas aisladas del fruto del mangostán frente a 3 diferentes líneas celulares de cáncer humano, carcinoma epidermoide de la boca (KB), cáncer de mama (BC-1) y cáncer de pulmón (NCI-H187). La α -mangostina presentó el mayor efecto citotóxico contra las líneas KB y BC-1, con valores IC₅₀ de 2.08 y 0.92 μ g/mL, respectivamente.

Nakagawa y colaboradores (2007) estudiaron el efecto antiproliferativo de α -mangostina (20 μ M) en una línea celular de cáncer de colon humano (DLD-1), y encontraron que la xantona induce apoptosis en una vía independiente de las caspasas, la cual es mediada por liberación de la endonucleasa G de la mitocondria y un incremento en la expresión de los niveles de proteína de Erk1/2 y Erk5, y una disminución en los de Akt.

2.3.2 *Propiedades anti-inflamatorias*

Diversos reportes han estudiado la actividad anti-inflamatoria del extracto de mangostán y de las xantonas garcinona B, γ - y α - mangostina, frente a diferentes modelos de inflamación, resultando en una disminución en los diferentes marcadores de inflamación (Nakatani et al., 2002; Nakatani et al., 2004; Yamakuni et al., 2006).

El grupo de Chomnawang (2007) elaboró un reporte del efecto del extracto del pericarpo del mangostán comparándolo con 19 diferentes extractos de otras plantas medicinales de Tailandia, en un modelo de inflamación causado por *Propionibacterium acnes*, y encontraron que el extracto del mangostán (a concentraciones 5 y 50 µg/mL) ejerce el mayor efecto anti-inflamatorio al suprimir la producción de citocinas pro-inflamatorias, como es el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α), en un 78 y 95 % de inhibición, respectivamente.

Más aún, en una línea celular de macrófago murino (RAW 264.7) tratada con lipopolisacárido (LPS) para inducir inflamación, las xantonas γ- y α-mangostina disminuyeron la producción de la prostaglandinas E2 (PGE2) y de NO• de manera dosis-dependiente; aunque la γ-mangostina presentó un efecto inhibitorio más potente que la α-mangostina. Sin embargo, la actividad de la iNOS y la expresión de la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) no fue inhibida por ninguna de las mangostinas, lo cual sugiere que disminuyen los niveles de PGE2 a través de la inhibición en la actividad de la COX-2. La administración de carragenina en ratones indujo una inflamación aguda (edema), lo cual sirvió para demostrar que solo la α-mangostina inhibe significativamente el edema causado por la carragenina, lo cual demuestra que la α-mangostina tiene mayor actividad anti-inflamatoria que la γ-mangostina en modelos *in vivo* (Chen et al., 2008).

En un modelo *in vivo* de daño cardiovascular inducido por isoproterenol (ISO) en ratas, la α-mangostina se administró oralmente (200 mg/kg) por 6 días antes de la administración de ISO y 2 días subsecuentes junto con ISO, y se demostró que el pre-co-tratamiento con la mangostina restauró las anormalidades en la membrana celular de los miocitos y disminuyó los niveles de expresión de TNF-α y COX-2 inducidos por la administración de ISO, evidenciando el rol citoprotector de la α-mangostina (Devi Sampath & Vijayaraghavan, 2008).

Por otra parte, Chairungsrilerd y colaboradores (1996) demostraron en la aorta

torácica de conejo, que la α -mangostina es un antagonista selectivo y competitivo del receptor de histamina 1 (H1) al inhibir las contracciones inducidas por la histamina; la histamina es un mediador natural de la inflamación, el cual es liberado por las células de sistema inmunológico (mastocitos/basófilos) y se encargan de generar la “hipersensibilidad inmediata”.

2.3.3 Propiedades anti-bacterianas

Existen varias investigaciones enfocadas a determinar la actividad antibacteriana del extracto y de las xantonas del mangostán. Chomnawang et al. (2005) estudiaron el efecto antimicrobial de 19 extractos de plantas de Tailandia inducido por *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* encontrando que el extracto de *G. mangostana* tiene el mayor efecto inhibitorio con un valor de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.039 mg/mL para ambas especies. Similarmente, Voravuthikunchai y Kitpipit (2005) compararon el efecto de 10 extractos de plantas medicinales de Tailandia contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, observando que el extracto etanólico de *G. mangostana* fue el más efectivo con un valor MIC de 0.05 mg/mL.

En un estudio realizado en el 2003 para probar el efecto inhibitorio de xantonas preniladas (γ - α - y β -mangostinas, garcinona B, garcinona D, etc.) del fruto del mangostán contra *Mycobacterium tuberculosis* se demostró que la garcinona B y las α - y β -mangostinas presentan el mayor efecto inhibitorio con un valor MIC de 6.25 μ g/mL (Suksamrarn et al., 2003).

Linuma y colaboradores (1996) estudiaron el efecto inhibitorio de diferentes xantonas de la familia *Guttiferae*, en el crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina, y determinaron que el extracto del pericarpo del mangostán y particularmente la α -mangostina, presenta un potente efecto al inhibir el crecimiento de la bacteria con valores MIC de 80 y 1.57-12.5

µg/mL, respectivamente.

La α -mangostina es capaz de inhibir el crecimiento de *Enterococci* resistente a vancomicina (VRE) con un valor MIC de 6.25 µg/mL; y además tiene la capacidad de generar sinergismo con antibióticos comerciales, por ejemplo con gentamicina y vancomicina, obteniendo un óptimo efecto sinérgico y un efecto sinérgico parcial con ampicilina y minociclina (Sakagami et al., 2005).

2.3.4 Propiedades fungicidas

La actividad fungicida de la α -mangostina y 4 de sus derivados fue evaluada por Sundaram et al. (1983), encontrando que la α -mangostina tuvo el mayor efecto al inhibir a 13 diferentes especies de hongos (*Epidermophyton floccosum*, *Alternaria solani*, *Rhizopus sp*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, etc); sin embargo, *Candida albicans* no fue susceptible a ninguno de los compuestos probados.

En 1986, Mahabusarakam y colaboradores determinaron el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, inducido por la γ - y α -mangostina y la gartanina, y encontraron que las tres xantonas probadas tienen una actividad inhibitoria moderada contra *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*; sin embargo, el crecimiento de *C. albicans* y *C. neoformans* no se alteró por ninguna de las xantonas.

De igual manera el grupo de Gopalakrishnan (1997) evaluó la eficacia fungicida de varias xantonas de *G. mangostana* (gartanina, gracinona D, euxantona, γ - y α -mangostina y BR-xantona) frente a tres hongos fitopatógenos de gran importancia agrícola, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria tenuis* y *Dreschlera oryza*, encontrando que la α -mangostina inhibió el crecimiento de los 3 hongos a concentraciones 1, 10, 100, y 1000 ppm en el medio.

2.3.5 *Propiedades antioxidantes*

La actividad antioxidante del mangostán ha sido ampliamente investigada. Diversos estudios se han enfocado en comparar el efecto de los extractos de diferentes plantas medicinales originaria de Tailandia y encontraron que el mangostán ejerce un potente efecto antioxidante (Haruenkit et al., 2007; Okonogi et al., 2007; Tachakittirungrod et al., 2007). Por otra parte otras investigaciones se han orientado a evaluar el efecto de la xantonas aisladas del fruto, demostrando que todas las xantonas presentan una actividad antioxidante, ya sea en mayor o menor grado (Yoshikawa et al., 1994; Fan & Su et al., 1997).

En 2002, Leong y Shui compararon la capacidad antioxidante total de 27 extractos de frutas encontradas en Singapur, incluido el mangostán, basados en su habilidad para atrapar a los radicales ABST y DPPH. Estos autores determinaron que el mangostán ocupa el octavo lugar en la eficiencia antioxidante. Sin embargo, en una investigación similar, García y colaboradores (2005) estudiaron la capacidad antioxidante de varias frutas y vegetales de las Filipinas, y por medición de la lipoperoxidación y su habilidad para atrapar al $\bullet\text{OH}$, encontraron que el extracto del mangostán es uno de los que presenta una actividad antioxidante más alta.

En un estudio realizado en una línea celular de neuroblastoma NG 108-15 enfocado a examinar la eficacia antioxidante de diferentes extractos del pericarpo del mangostán (agua, 50% etanol, 95% etanol y etil acetato) contra estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , se encontró que todos los extractos exhiben una actividad antioxidante; sin embargo, son el agua y el 50% etanol los extractos más efectivos con valores IC_{50} de 34.98 y 30.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$. También establecieron que las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos presentan la mayor actividad antioxidante y un efecto citotóxico, respectivamente (Weecharangsan et al., 2006).

En cultivo celular de neuronas cerebelares granulosas se indujo estrés oxidativo a

través de la administración de la neurotoxina, ácido 3-nitropropiónico y se evaluó la actividad antioxidante del extracto del pericarpio y el jugo del mangostán, observándose que el daño ocasionado por la toxina disminuyó significativamente con ambas preparaciones del mangostán. También analizaron la capacidad atrapadora del mangostán contra diversas especies reactivas, y se determinó que el extracto y el jugo atrapan de manera concentración-dependiente al ABST, DPPH, $O_2^{\bullet-}$, $OONO^-$ y HOCl; siendo más potente el extracto del pericarpio (Guzmán-Beltrán et al., 2008).

Jung y colaboradores (2006) lograron aislar 2 nuevas xantonas preniladas del extracto metanólico del pericarpio del mangostán, así como 12 xantonas conocidas. Se evaluó la capacidad atrapadora de 13 xantonas contra el $OONO^-$ mediante el monitoreo de la oxidación del compuesto de dihidrorodamina 123 (DHR123) y se encontró que las xantonas 8-hidroxicuadraxantona, gartanina y α -mangostina presentan capacidad atrapadora de peroxinitrito con valores IC_{50} de 4.6, 9.1 y 12.2 μ M, respectivamente.

De igual manera, varios estudios han determinado la actividad antioxidante de la α -mangostina utilizando distintos métodos. Específicamente, Williams y colaboradores (1995) encontraron que la α -mangostina disminuyó la oxidación inducida por cobre y radical peroxilo en lipoproteínas humanas de baja densidad. Además, la α -mangostina disminuyó la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) y el consumo de α -tocoferol inducido por la oxidación de las lipoproteínas, indicando que la α -mangostina tiene la habilidad de atrapar radicales libres.

En un modelo experimental en ratas para inducir infarto al miocardio por la administración de isoproteranol (ISO), una catecolamina sintética causante de estrés oxidativo, se observó que la α -mangostina (200 mg/kg) administrada como pre-tratamiento recuperó la actividad de enzimas antioxidantes (Gpx, GST, SOD y CAT) y los niveles de GSH

inducidos por el ISO; además, disminuyó los niveles de lípidos peroxidados y la actividad de enzimas (GOT, GPT, CPK y LDH), las cuales sirven como un índice de la severidad del infarto en el miocardio (Devi Sampath & Vijayaraghavan, 2007).

Pedraza-Chaverrí y colaboradores (2009) determinaron la capacidad atrapadora de la α -mangostina frente a un modelo de déficit energético y producción de ERO generado por el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) en un cultivo primario de neuronas granulares cerebelosas, y se encontró que la xantona es capaz de atrapar al $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 y $OONO^-$, pero no al H_2O_2 ni al radical $\bullet OH$. También se vio que la mangostina ejerce un efecto neuroprotector contra la toxicidad del 3-NP de una manera dosis-dependiente, y que este efecto puede estar asociado con la habilidad atrapadora de la α -mangostina en este tipo de preparación.

Un estudio realizado en el 2000 por el grupo de Mahabusarakam reveló que la capacidad antioxidante de la α -mangostina depende en parte de su estructura molecular. Por ejemplo, la sustitución de los C-3 y el C-6 con derivados del grupo aminoetil incrementa la actividad antioxidante, mientras que la sustitución con acetato, metilo ó propanediol reduce la actividad antioxidante.

Nuestro grupo (el equipo de trabajo del Laboratorio de Aminoácido Excitadores del INNN), en colaboración con el Departamento de Biología de la Facultad de Química (UNAM), determinó la capacidad anti-peroxidativa de la α -mangostina en tejidos cerebrales, y sorprendentemente encontraron que la mangostina *per se* inhibe la peroxidación lípida basal en homogenados de cerebro de manera concentración-dependiente (Figura 16) (Márquez-Valadez et al., 2009).

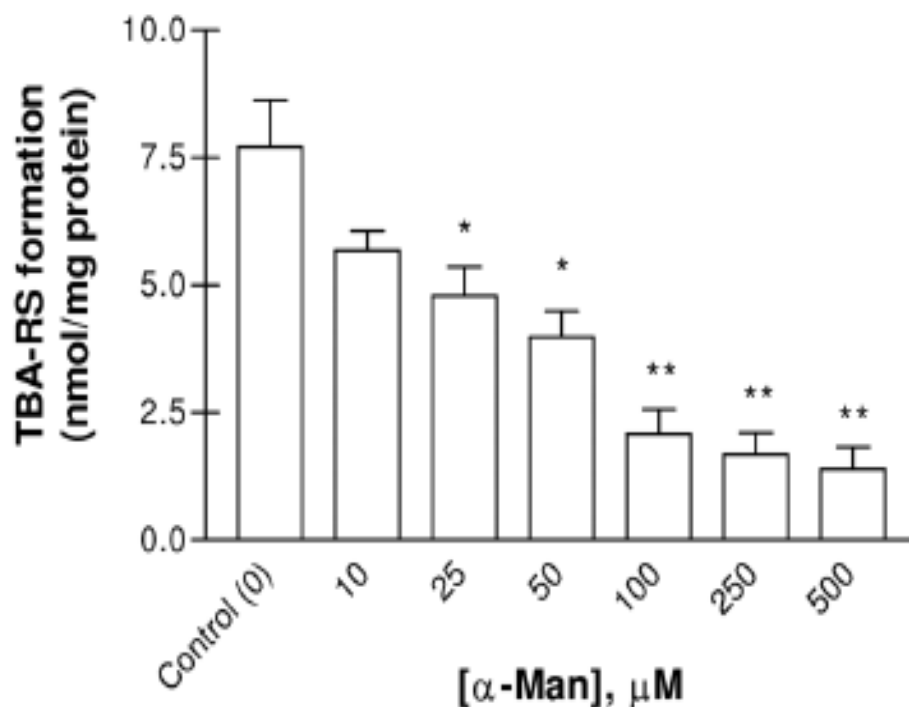


Figura 16. La α -Mangostina disminuye la peroxidación lipídica basal en homogenados de cerebro de manera concentración-dependiente. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs. Control. Se muestran valores de 5 experimentos por grupo, los cuales se expresaron como promedios \pm E.E.M. (Tomado de Márquez-Valadez et al., 2009).

En conclusión, en su conjunto, los datos anteriormente mencionados indican que las propiedades antioxidantes del extracto del mangostán y de la α -mangostina aislada del mismo fruto son potentes antioxidantes al ejercer su efecto como atrapadores de especies reactivas posiblemente a través de su peculiar estructura molecular.

2.4 Modelos de daño neuronal

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente vulnerable a las acciones tóxicas de las ERO y ERN. Entre las principales razones para que esto ocurra destacan:

- El contenido de lípidos en cerebro es mayor en comparación con otros órganos, lo cual se debe a las extensas coberturas lipídicas de las fibras neuronales, y como ya se vio anteriormente, los lípidos representan el blanco más vulnerable para la oxidación por parte de las diferentes especies reactivas (Santamaría, 2008).
- La alta tasa metabólica que el cerebro tiene, debido a que el metabolismo aeróbico es la principal fuente de energía para las células nerviosas. En las neuronas existe una amplia distribución de mitocondrias, las cuales son requeridas para la síntesis de ATP y el metabolismo oxidativo, por lo cual el riesgo de la pérdida de electrones a través de la cadena de transporte es un suceso altamente probable, llevando a la formación de $O_2^{\bullet-}$ (Santamaría, 2008).
- La limitada actividad de algunas enzimas antioxidantes en el SNC, como la catalasa, y los diferentes procesos de óxido-reducción llevados a cabo por enzimas de manera normal en las neuronas, como la xantina oxidasa, sintasas del óxido nítrico, ciclooxigenasas, así como la activación de fosfolipasas, todas las cuales conducen a la formación de especies reactivas (Santamaría, 2008).

Múltiples modelos experimentales sirven para reproducir las características del daño al SNC que se observan en estas neuropatías. A continuación, algunos de ellos son descritos:

2.4.1 Modelos pro-oxidantes

Los metales de transición actúan como catalizadores en el deterioro oxidativo de las

macromoléculas biológicas. Estudios recientes han demostrado que metales como son el hierro, cobre, cromo, mercurio, níquel y vanadio exhiben la habilidad para producir ERO/ERN, resultando en lipoperoxidación, daño a ADN y proteínas, disminución de grupos sulfhidro y alteración en la homeostasis de calcio (Stohs & Bagchi, 1995). El mecanismo principal por el cual los metales producen ERO/ERN es a través de su implicación en los ciclos redox de xenobióticos orgánicos, aunque la toxicidad específica de cada metal dependerá de su solubilidad, transporte, reactividad química, y de los complejos que pueda formar dentro de la célula (Stohs & Bagchi, 1995).

El hierro es un metal de transición, capaz de catalizar reacciones redox entre el oxígeno y las macromoléculas biológicas, y de esta manera generar ERO y consecuentemente eventos de lipoperoxidación. El hierro actúa como catalizador para la reacción de Fenton, la cual forma al radical hidroxilo y a esta especie se le ha propuesto como una de las iniciadoras de la peroxidación de lípidos.

En el cerebro, la ferritina es una metaloproteína que funciona como almacén del hierro y lo mantiene unido en su forma férrica a su núcleo ferrihidrito, por lo cual las concentraciones del hierro libre intracelular se han calculado en alrededor de $\sim 10^{-6}$ M. La liberación del metal de la ferritina provee una fuente de hierro disponible para la participación en procesos de daño oxidativo. Se ha descrito que las concentraciones de este metal en su forma libre están incrementadas en varios desórdenes neurodegenerativos (Double et al., 1998). El incremento del hierro libre en estas enfermedades se ha sugerido como un paso crítico debido a su papel en la formación de ERO vía la reducción del H_2O_2 dependiente de metales.

Existe una gran variedad de moléculas capaces de generar especies reactivas, ya sea por disociación y/o reacción con otras moléculas. Entre éstas podemos encontrar al $FeSO_4$, al $FeCl_2$, al $FeCl_3$ y al nitrilotriacetato de hierro, etc.

2.4.1.1 Sulfato ferroso (FeSO₄)

El sulfato ferroso (FeSO₄) es una molécula altamente pro-oxidante capaz de disociarse, y de esta manera interactuar con otras especies reactivas y generar radicales libres de alta reactividad. El H₂O₂ puede producir •OH, y este proceso se lleva a cabo a través de la reacción de Fenton; dicha reacción requiere que existan metales de transición libres (Fe⁺² ó Cu⁺¹) en el medio para que se lleve a cabo. La reacción de Fenton (Figura 17) catalizada por el hierro o el cobre es considerada actualmente como el mecanismo principal por el cual el radical hidroxilo es generado en los sistemas biológicos (Kehrer, 2000), y parece mediar alteraciones neurológicas importantes.



Figura 17. Reacción de Fenton

2.4.1.2 FeSO₄ y daño oxidativo

En 2005, Pavlica y colaboradores observaron que el FeSO₄ en un cultivo celular de feocromocitoma PC12, produjo un aumento de 425% y 1,188% en la peroxidación de lípidos a concentraciones 0.1 mM y 1 mM, respectivamente, además de un incremento significativo en los niveles de ERO, y una disminución en los niveles de GSH a las mismas concentraciones probadas. Se determinó que la formación de ERO y la lipoperoxidación son la causa directa de la muerte de las células PC12, y que la disminución de los niveles de GSH sólo se correlaciona con la toxicidad del metal. Adicionalmente, este daño puede ser atenuado por la administración del co-tratamiento con dos antioxidantes (ácido eleágico y ácido clorogénico), sugiriendo que dicho daño es vía formación de ERO.

Sorprendentemente en un estudio *in vitro* en fracciones sinaptosomales, se observó que el ascorbato en presencia de FeSO₄ puede incrementar la formación del radical hidroxilo e incrementar la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas evidenciada por la

pérdida de grupos tioles e incorporación de grupos carbonilo, sugiriendo así que el FeSO_4 tiene la capacidad de reaccionar con antioxidantes endógenos para generar mayor daño oxidativo (Chakraborty et al., 2001).

Diversos estudios han evaluado el efecto protector de los quelantes de hierro, los cuales son moléculas que forman complejos con los iones de metales pesados, evitando que dichos metales realicen sus efectos tóxicos. El VK-28 es un quelante del hierro sintético que atraviesa la barrera hematoencefálica, y se ha demostrado que en co-tratamiento con hierro inhibe la formación de malondialdehído *in vitro*, además de atenuar los efectos en el metabolismo dopaminérgico inducidos por el modelo *in vivo* de toxicidad por 6-hidroxydopamina en ratas cuando es administrado como pre-tratamiento. Estos resultados sugieren que el hierro está implicado en daño oxidativo y muerte neuronal de algunas enfermedades neurodegenerativas (Shachar et al., 2004).

En resumen, el FeSO_4 , a través de su disociación, puede donar sus átomos de Fe^{2+} y por medio de la reacción de Fenton, y juega un papel importante en la generación de ERO, permitiendo reproducir eventos típicos de estrés oxidante.

2.4.2 Modelos excitotóxicos

La excitotoxicidad neuronal involucra una elevación fisiológica de las concentraciones intracelulares de calcio en respuesta a sobre-exposición de las células a las acciones de los aminoácidos excitadores, tales como el glutamato y el aspartato.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC; los receptores glutamatérgicos ionotrópicos se han relacionado mayoritariamente con los procesos de excitotoxicidad, aunque los receptores metabotrópicos pueden también estar involucrados. En particular, el receptor sensible al N-metil-D-aspartato (NMDAr) es un complejo de receptor/canal permeable al Ca^{2+} ; cuando el receptor es estimulado por agonistas endógenos

o exógenos, el flujo del ión dentro de la neurona puede potenciar vías metabólicas letales que involucran enzimas proteolíticas tales como proteasas, endonucleasas y fosfolipasas (Pérez-De La Cruz & Santamaría, 2007b).

En consecuencia, el incremento intracelular del Ca^{2+} produce alteraciones en la mitocondria que afectan su actividad, y por ende disminuye la producción de ATP y la generación de radicales libres, además de producirse un aumento en la liberación del glutamato y propagar así el daño celular a través de una retroalimentación positiva. De esta manera, la célula es guiada a una muerte apoptótica o necrótica (Pérez-De La Cruz & Santamaría, 2000b).

Dado que los receptores glutamatérgicos, y en particular los receptores ionotrópicos, son un punto de partida para los procesos excitotóxicos se han utilizado; diversos agonistas endógenos, exógenos o sintéticos se han utilizado para activar a estos receptores y recrear estos eventos excitotóxicos. El ácido quinolínico, ácido kaínico, ácido iboténico y el NMDA son moléculas capaces de encender las vías típicamente excitotóxicas que llevarán a la muerte celular.

2.4.2.1 *Ácido quinolínico (QUIN)*

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico (QUIN) (Figura 18) es un metabolito endógeno que se forma en la vía de catabolismo del L-triptófano, denominada vía de la kinurenina. El QUIN es un conocido agonista sobre receptores glutamatérgicos sensibles al NMDA (NMDAr), los cuales están distribuidos en hipocampo, estriado y corteza cerebral (Stone & Perkins, 1981). Al QUIN se le han atribuido diferentes efectos como el daño excitotóxico (Whetsell et al., 1989), el daño oxidativo (Santamaría et al., 2001), alteraciones energéticas (Bordelon et al., 1997), alteraciones conductuales (Sanberg et al., 1989), alteraciones morfológicas (Schwarcz et al., 1983) e inflamación (Heyes et al., 1990).

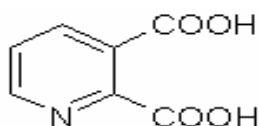


Figura 18. Estructura del QUIN

2.4.2.2 Vía de la kinurenina

Descrita en 1947, la vía de la kinurenina se reconoce como la principal ruta de catabolismo del L-triptófano en mamíferos. Su primordial función es la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) (Beadle et al., 1947). Esta vía metabólica se ha descrito en hígado y cerebro de humanos, primates no humanos, roedores y otros mamíferos, y se sabe que desempeña un papel importante en funciones fisiológicas, como la conducta y la termorregulación (Figura 19) (Pérez-De La Cruz et al., 2007c). A la vía de la kinurenina se le ha implicado en diversos desórdenes, tales como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la demencia tipo Alzheimer (Stone, 2001).

- Metabolismo de la vía de la kinurenina

En cerebro, el anillo indólico del L-tritofano es cortado oxidativamente por la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO); esta enzima requiere de anión superóxido, por lo cual necesita de la presencia de sistemas generadores de este radical (Stone, 2001). En seguida, ocurre la degradación de N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN) por acción de la formidasa; la L-KYN funciona como sustrato de varias enzimas para generar otros metabolitos de la vía como el ácido kinurénico (KYNA), reacción llevada a cabo por la kinureninas aminotransferasas (KAT's). Posteriormente, la kinurenina hidroxilasa, una enzima localizada en la membrana mitocondrial externa, lleva a cabo la hidroxilación de la kinurenina a 3-hidroxikinurenina. La 3-hidroxikinurenina se convierte a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA) por acción de la enzima kinureninasa; sin embargo,

estas 2 últimas enzimas tienen muy baja actividad en el cerebro, por lo cual la formación del 3-HA puede ocurrir por la hidroxilación de enzimas microsomales no específicas (Pérez-De La Cruz et al., 2007b).

La enzima ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa (3-HAO) abre el anillo del 3-HA y lo transforma en 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, un intermediario inestable el cual es instantáneamente convertido en QUIN. Finalmente, el QUIN es metabolizado a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) por la enzima ácido quinolínico fosforribosil transferasa (QPRT) (Pérez-De La Cruz et al., 2007c).

A muchos metabolitos de la vía se le han encontrado propiedades neuroactivas; tal es el caso del ácido kinurénico (KYNA), la 3-hidroxikinurenina (3-HK) y el QUIN (Stone, 2001). En 1978, Lapin describió convulsiones en ratones que fueron sometidos a una inyección intracerebroventricular de QUIN; posteriormente, dichas convulsiones se asociaron con lesiones excitotóxicas en el cerebro (Schwarcz et al., 1983). Ambos patrones de excitación y neurotoxicidad producidos por el QUIN son mediados por activación de los NMDAr, sugiriendo que el QUIN endógeno puede estar participando en procesos fisiológicos y en eventos patológicos (Pérez-De La Cruz et al., 2007c).

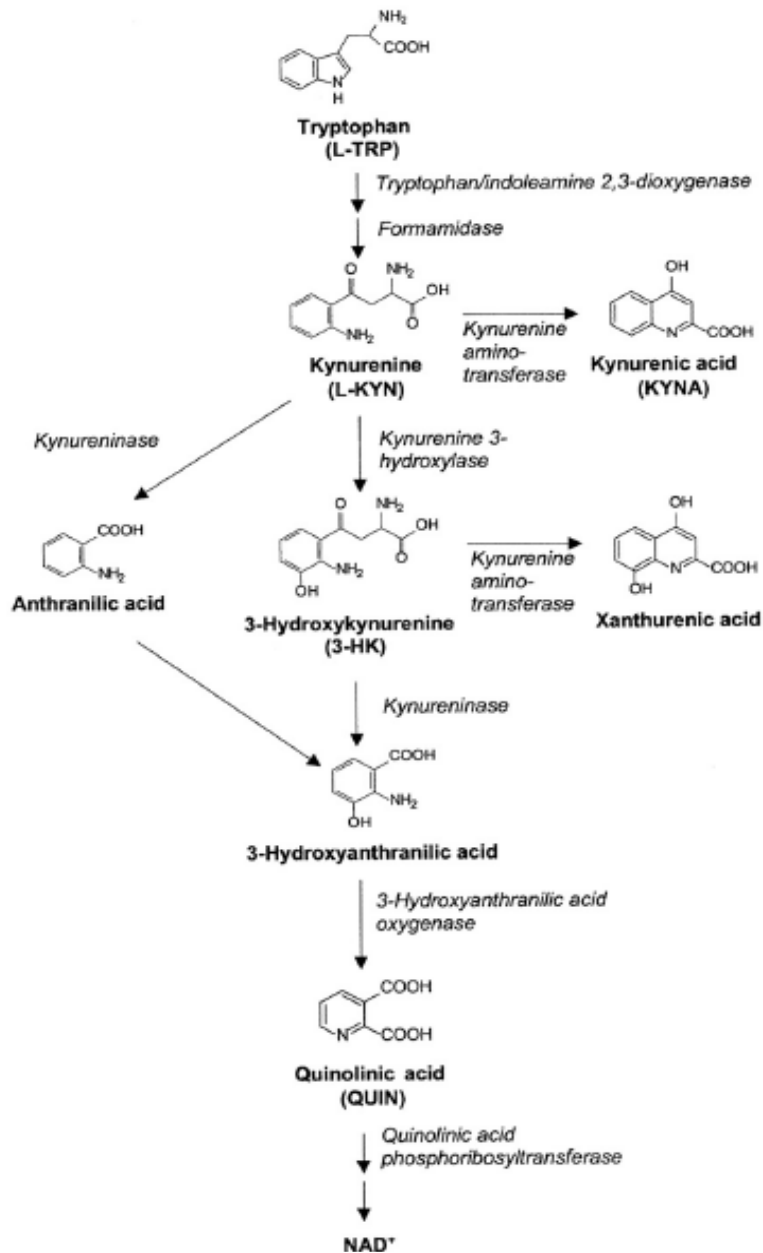


Figura 19. Vía de la kinurenina (Tomado de Sas et al., 2007).

2.4.2.3 QUIN y daño excitotóxico

El QUIN produce daño excitotóxico a través de su capacidad de activar selectivamente a los receptores glutamatérgicos ionotrópicos para NMDA, específicamente a los subtipos NR2A y NR2B (Carvalho et al., 1996). Dicha activación está asociada a un incremento intracelular de calcio en las neuronas blanco (Figura 20).

El incremento de calcio intracelular induce una serie de eventos de daño neuronal como la activación de fosfolipasas, proteín cinasas, endonucleasas y proteasas que posteriormente median los procesos de excitotoxicidad. Whetsell y colaboradores (1989) demostraron que exposiciones prolongadas de concentraciones submicromolares de QUIN en estructuras corticoestriatales conducen a la muerte neuronal.

En 1993, Santamaría y Ríos determinaron que el daño inducido por la administración de QUIN (240 nmol/ μ L) en el estriado de ratas es mayoritariamente, pero no completamente inhibido por el pre-tratamiento con MK-801, un antagonista del receptor NMDA, lo cual sugiere que el daño inducido por el QUIN se da parcialmente a través del receptor NMDA.

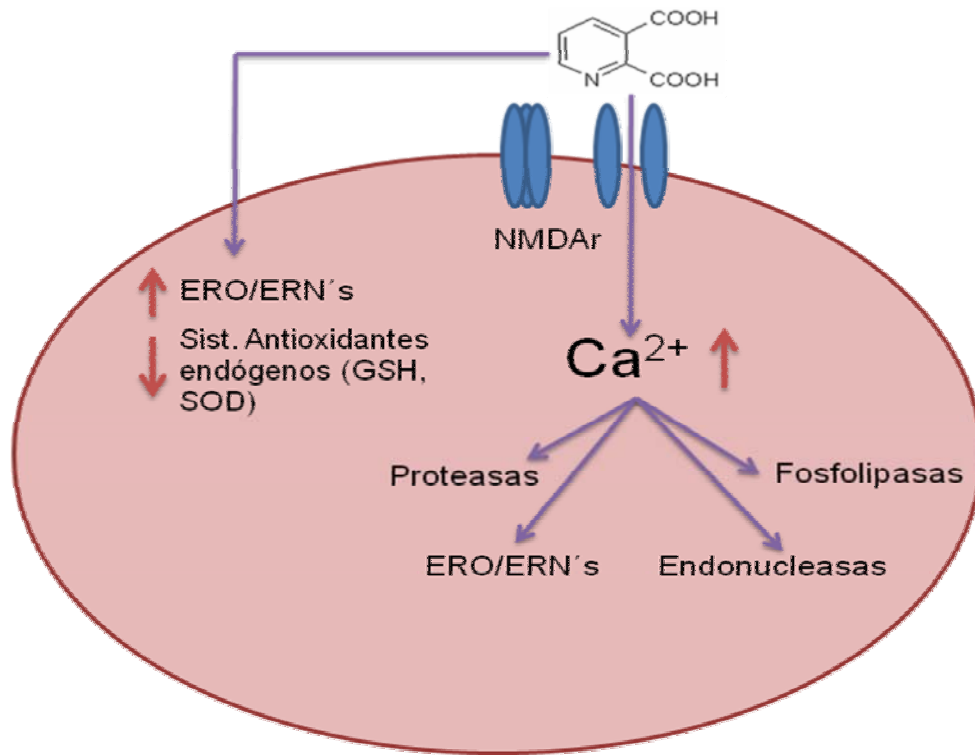


Figura 20. Mecanismo de acción del QUIN.

2.4.2.4 QUIN y daño oxidativo

La neurotoxicidad generada por el QUIN está primordialmente vinculada a su acción excitotóxica; sin embargo en una gran variedad de investigaciones se ha demostrado que la

toxicidad y el daño oxidativo promovido por dicha toxina tiene un componente independiente a la activación de receptores NMDA. Diversas investigaciones han descrito la potente actividad pro-oxidante del QUIN en diferentes preparaciones del tejido nervioso, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ríos y Santamaría (1991) observaron en homogenados de cerebro de rata que el QUIN aumenta la peroxidación de lípidos hasta en un 50 % de manera concentración-dependiente.

De igual manera, Santamaría y colaboradores (2001) evaluaron la formación de ERO y la peroxidación de lípidos en sinaptosomas de estriado, hipocampo y corteza entorrinal, demostrando que el estriado y el hipocampo son las regiones más afectadas por el QUIN y que el daño puede ser prevenido por la administración de GSH reducido. Además, demostraron que el QUIN induce la formación del radical hidroxilo *in vivo* en el estriado de ratas por un mecanismo que parece ser independiente de receptores NMDA.

Diferentes atrapadores de ERO, como la melatonina y el glutatión reducido, e inductores de enzimas, han demostrado su capacidad para prevenir o disminuir el daño oxidativo del QUIN en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Southgate et al., 1998; Santamaría et al., 2005). Un hecho importante que apoya la actividad pro-oxidante del QUIN es su capacidad de modificar los perfiles de algunos antioxidantes endógenos, tales como los niveles de glutatión reducido (GSH) y la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (Cu/Zn-SOD) en un modelo *in vivo* en estriado de ratas (Rodríguez-Martínez et al., 2000). Leipnitz y colaboradores probaron en homogenados de corteza cerebral que el QUIN disminuye el total de la capacidad antioxidante no-enzimática del tejido en una manera concentración-dependiente, y además demostraron que la combinación de QUIN y Fe^{2+} reduce los niveles de GSH, lo cual sugiere que el radical hidroxilo puede estarse formando bajo estas condiciones experimentales.

El tratamiento con un inhibidor de la iNOS (aminoguanidina) atenúa las lesiones

estriatales y el daño oxidativo mediado por QUIN en ratas, indicando que la activación de esta enzima puede estar involucrada en su toxicidad al generar NO^\bullet (Ryu et al., 2004), evento que puede ocurrir simultáneamente con la disminución de la actividad de la Cu/Zn-SOD - enzima que destoxifica a la célula del $\text{O}_2^{\bullet-}$, permitiendo de esta manera la formación de especies más reactivas y nocivas para la célula, como el OONO^- . En apoyo a este supuesto, González-Cortés y colaboradores (2008) comprobaron que la administración de un catalizador de la descomposición del OONO^- (porfirinato de Fe (III), Fe (TPPS)) reduce el daño causado por una inyección intraestriatal de QUIN en ratas, lo cual prueba que el OONO^- es un mediador involucrado en la neurotoxicidad del QUIN.

2.4.2.5 QUIN y alteraciones energéticas

Algunos reportes han evidenciado el efecto del QUIN en alteraciones del metabolismo energético, y se considera que este efecto puede estar asociado a la capacidad pro-oxidante y excitotóxica de la neurotoxina, por lo cual se sugiere que este evento puede ser un efecto secundario del QUIN.

Una de las primeras investigaciones realizadas a este respecto fue la de Bordelon y colaboradores (1997), quienes evaluaron los cambios en la actividad de la cadena respiratoria y la tasa de consumo de oxígeno en ratas administradas intraestriatalmente con QUIN. Se encontró que 6 horas después de la inyección se presentó una reducción en el consumo de oxígeno, y 12 horas después, la reducción del consumo de oxígeno incrementó en un 45 %. También disminuyeron los niveles de ATP, NAD^+ , aspartato y glutamato (30-60%).

Ribeiro y colaboradores (2006) observaron que una inyección intraestriatal de QUIN inhibe significativamente los complejos II (50%), III (46%) y II-III (35%) de la cadena

respiratoria, así como la producción de $^{14}\text{CO}_2$ (27%) a las 12 horas posteriores de la inyección. El pre-tratamiento con diversas moléculas como MK-801, α -tocoferol, piruvato, creatina y un inhibidor de la iNOS (L-NAME) es capaz de reducir el daño evocado por el QUIN, pero el MK-801 y la creatina atenuaron totalmente los efectos de QUIN. Por su parte, el L-NAME y el α -tocoferol sólo lo atenuaron parcialmente, sugiriendo que el daño inducido por el QUIN es mayoritariamente a través de su actividad excitotóxica.

Un estudio *in vitro* realizado en terminaciones sinápticas de corteza cerebral de rata demostró que el QUIN a una concentración 100 μM produce incrementó en la recaptura de glucosa (55%), disminuye la generación de $^{14}\text{CO}_2$ (60%) y la actividad del complejo II de la cadena respiratoria (35%); sin embargo, no altera a los demás complejos de la cadena respiratoria, ni la actividad de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, o la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Interesantemente el pre-tratamiento con MK-801 sólo previene la recaptura de glucosa. Por su parte, la inhibición del complejo II se previno con el pre-tratamiento con SOD-CAT, lo cual sugiere que el daño estimulado por el QUIN es mediado por ERO. En apoyo a esta hipótesis, existen reportes de que la actividad del complejo II es la más vulnerable de la cadena respiratoria al ataque de los radicales libres (Schuck et al., 2007).

2.4.3 Modelos de déficit energético

La mitocondria es el organelo responsable del suplemento de energía para la célula. El cerebro es el órgano que usa la mayor parte de la energía del cuerpo humano, tomando en cuenta que el cerebro ocupa el 20% total de oxígeno y únicamente ocupa el 2% de la masa total del cuerpo. La mitocondria juega un papel muy importante en diversos procesos celulares, tales como la homeostasis de calcio, señalización celular, regulación del ciclo celular, apoptosis, producción de radicales libres, etc. (Sas et al., 2007).

La disfunción mitocondrial y el daño oxidativo juegan un papel muy importante en la patogénesis de diversos desórdenes como la enfermedad de Parkinson y de Huntington, la demencia tipo Alzheimer, la esclerosis múltiple, etc., por lo cual las alteraciones en la mitocondria son de gran importancia para el esclarecimiento de dichas patologías.

La alta tasa metabólica y la baja capacidad de almacenar sustratos ricos en energía hacen que el SNC sea particularmente vulnerable a las variaciones en las fuentes energéticas. Defectos o alteraciones en la capacidad de la células para mantener la tasa normal de energía o la necesidad de adaptarse rápidamente a un incremento en el requerimiento de energía representan un riesgo potencial en la pérdida de la viabilidad neuronal (Less, 1993).

Alteraciones en la disponibilidad de oxígeno o glucosa producen un desbalance en las concentraciones iónicas, lo cual afecta el potencial de membrana, llevando a la despolarización de la célula, evento que las ATPasas membranales no son capaces de restaurar. El ión Ca^{2+} incrementa drásticamente a través de la apertura de complejos receptor/canal dependientes de voltaje (NMDAr), guiando a una excitotoxicidad secundaria (Pérez-De La Cruz & Santamaría, 2007b).

En relación a la reproducción de las alteraciones metabólicas observadas en diferentes neuropatías, se han desarrollado a nivel experimental diversos modelos animales que simulan algunos de los eventos encontrados en estas enfermedades. El malonato, MPP^+ , rotenona y el ácido 3-nitropropiónico son algunas de las toxinas mitocondriales empleadas, las cuales producen una reducción de ATP, un aumento de lactato, generación de ERO y muerte neuronal (Bonsi et al., 2006).

2.4.3.1 Ácido 3-nitropropiónico (3-NP)

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es una micotoxina generada a partir de su precursor, el metabolito secundario 3-nitropropanol (Figura 21), el cual se aisló a partir de hongos del género *Arthrinium sp.* y su descubrimiento se dio a partir de intoxicaciones masivas generadas por la alimentación con plantas contaminadas con estas especies de hongos. Un problema ocurrido en 13 provincias del norte de China, como consecuencia de la ingesta de la caña de azúcar contaminada con el hongo, demostró que los pacientes sufrían de vómito, distonía, convulsiones, y espasmos, y observaron muerte neuronal de los ganglios basales (Peraica et al., 1999). De igual manera, en el oeste de EUA se observó que animales intoxicados con el hongo exhibieron anomalías motoras, tales como la falta de coordinación motora y debilidad, posteriormente desarrollando parálisis (Ludolph et al., 1991). Dichos sucesos permitieron identificar al 3-NP como una molécula capaz de recrear eventos presentes en diferentes neuropatías.

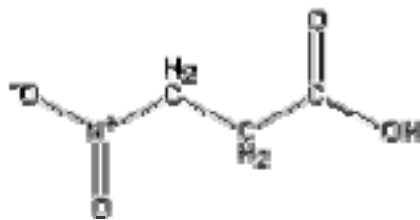


Figura 21. Estructura del 3-NP.

El 3-NP causa neurotoxicidad específica mayoritariamente en el estriado, aunque otras regiones como el hipocampo, tálamo y corteza cerebral también se ven afectadas (Borlongan et al., 1997). Su principal mecanismo de acción es inhibiendo irreversiblemente a la enzima succinato deshidrogenasa, llevando así a la reducción de la síntesis de ATP y consecuentemente a la muerte neuronal; además de que el estrés oxidativo juega un papel central en el daño neuronal inducido por 3-NP, e involucra excitotoxicidad y generación de radicales libres (Túnez et al., 2004).

2.4.3.2 3-NP y alteraciones energéticas

El principal mecanismo de acción tóxica del 3-NP, en relación a las alteraciones energéticas, es a través de la inhibición irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), la cual cataliza la oxidación del succinato a fumarato y forma parte de la cadena respiratoria mitocondrial (complejo II) y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 22) (Brouillet et al., 1999).

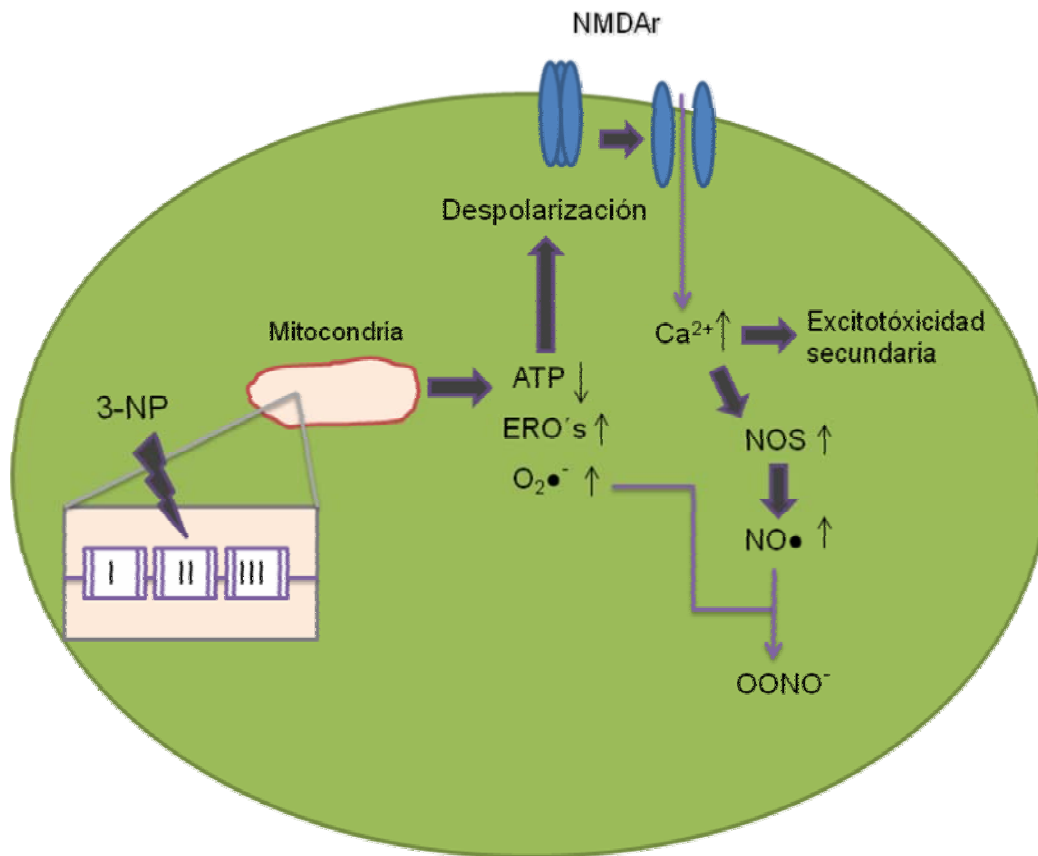


Figura 22. Mecanismo de acción del 3-NP.

Estudios cinéticos de la inactivación de la SDH por el 3-NP *in vitro* demostraron que su acción es muy rápida y que puede estar influenciada por diversos factores como la concentración del sustrato, el estado redox de sus componentes, la actividad enzimática, etc. (Brouillet et al., 1999). De tal manera que al inhibir a la SDH, los efectos primarios del 3-NP son una disminución en el metabolismo energético, lo cual nos guía a un déficit de ATP, un

aumento en las concentraciones de lactato, la despolarización de la membrana y eventualmente la muerte celular.

La deficiencia de ATP provoca que la actividad de los transportadores activos se alteren; tal es el caso de la bomba ATPasa Na^+/K^+ , lo cual lleva a la alteración de los gradientes iónicos y a la subsecuente despolarización de membrana celular. Dicha despolarización abre los receptores para NMDA-dependientes de voltaje, lo cual permite la entrada de Ca^{2+} al interior celular, y este evento guía a la célula a una excitotoxicidad secundaria y a la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , incluyendo a la nNOS, permitiendo así la generación de ERO y finalmente la neurodegeneración (Less, 1993).

En apoyo a lo anteriormente mencionado, en el 2009 Liot y colaboradores demostraron en cultivos de neuronas corticales que el 3-NP, además de alterar el metabolismo energético, induce 2 señales distintas en la mitocondria: la primera es el efecto directo sobre la bioenergética mitocondrial; sin embargo, no altera la morfología mitocondrial ni la sobrevivencia neuronal. La segunda señal es seguida de una exposición más larga a dicha toxina, la cual se caracteriza por la activación de NMDAr, causando un segundo incremento de ERO y una importante fragmentación mitocondrial. Este segundo evento guía a la muerte neuronal. Además observaron que al poner un inhibidor de los NMDAr (AP5), la fragmentación mitocondrial es parcial, pero no completamente inhibida por dicho antagonista.

2.4.3.3 3-NP y daño oxidativo

El 3-NP, a través de la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria, juega un papel importante en el desacople del transporte de electrones, aumentando la probabilidad de generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, el cual puede a su vez reaccionar con otras ERO, y de esta manera formar otras especies más reactivas, llevando a la célula a eventos de estrés oxidativo/nitrosativo y consecuentemente a la muerte neuronal.

Diversas investigaciones se han enfocado a elucidar los mecanismos por los cuales el 3-NP causa daño oxidativo; entre estos destacan la inducción de enzimas, la alteración de los sistemas endógenos antioxidantes, la formación de especies reactivas y consecuentemente, eventos de lipoperoxidación.

Se ha observado que en ratas sometidas a un tratamiento sistémico de 3-NP, se incrementa la producción de peroxinitrito, evidenciado por la presencia del marcador 3-nitrotirosina, además del 8-oxo-dG, marcador de daño oxidativo a ADN en estriado. Además, se encontró que la administración de un inhibidor de la NOSn protege significativamente al estriado de dichas lesiones, sugiriendo que la acción tóxica del NO^\bullet ocurre a través la reacción no enzimática de éste con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar el OONO^- (Schulz et al., 1997).

Binienda et al. (1998) elaboró un reporte del efecto del 3-NP en el tiempo (30, 60, 90 y 120 min) sobre los sistemas antioxidantes endógenos en diferentes regiones del cerebro de ratas (núcleo caudado, corteza frontal e hipocampo). La actividad de la CAT se observó incrementada significativamente solamente en el hipocampo a los 90 min posteriores de la administración de la toxina. La actividad de la Gpx disminuyó hasta los 120 min posteriores de la inyección del 3-NP, también en hipocampo. La SOD dependiente de Cu/Zn se vió aumentada (120 min) en la corteza frontal y por su parte, la SOD dependiente de Mn se incrementó a los 60 y 90 min en corteza frontal y núcleo caudado, respectivamente. También determinaron los niveles de GSH, los cuales no se alteraron a ningún tiempo y región analizados.

Se ha realizado un gran número de investigaciones *in vivo* e *in vitro* orientadas a determinar si los efectos inducidos por el 3-NP pueden ser prevenidos o atenuados por la administración de diferentes componentes antioxidantes como son la nicotina, S-alícisteina y la melatonina. El 3-NP provoca un aumento en la peroxidación de lípidos, formación de grupos carbonilo, actividad de la SOD (Mn y Cu/Zn-dependientes) e hiperactividad en ratas.

La administración de dichos componentes previene o atenúa varios de los marcadores de daño oxidativo, sugiriendo que el efecto tóxico del 3-NP es debido en parte a la generación de ERO/ERN, guiando a eventos de estrés oxidativo y nitrosativo (Túnez et al., 2004; Pérez-De La Cruz et al., 2006; Herrera-Mundo et al., 2006).

3. Planteamiento general

En consideración a lo anteriormente mencionado y a la evidente falta de estudios sobre la capacidad antioxidante y neuroprotectora de la α -mangostina como tratamiento en diferentes modelos neurotóxicos, en el presente trabajo evaluamos el efecto de esta molécula antioxidante sobre diversos marcadores de daño oxidativo inducidos por la administración de tres diferentes agentes tóxicos en terminales nerviosas aisladas, con la finalidad de conocer su capacidad antioxidante y poder postular a esta molécula como un candidato importante para el diseño de terapias antioxidantes a nivel experimental y en el eventual manejo de alteraciones neurológicas.

4. Justificación

Las alteraciones en el metabolismo celular, la generación de especies reactivas, la excitotoxicidad y el déficit energético en el SNC son eventos que se encuentran presentes en diversas enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, resulta de gran interés estudiar la actividad de la α -mangostina frente a diversos modelos que recrean estos eventos para evaluar su capacidad antioxidante y potencialmente neuroprotectora en diversos modelos de toxicidad.

5. Hipótesis

Dadas a las propiedades antioxidantes ampliamente reportadas, de la α -mangostina, este agente disminuirá el daño oxidativo producido por diferentes moléculas tóxicas que inducen modelos de daño neuronal oxidativo; reflejándose su efecto en la disminución de la peroxidación de lípidos, la recuperación de la funcionalidad mitocondrial, la preservación de los niveles de GSH y la protección en la actividad de enzimas antioxidantes (Gpx y GST) en fracciones sinaptosomales aisladas de cerebro de rata.

6. Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante de la α -mangostina como tratamiento frente a tres diferentes modelos de daño neuronal en sinaptosomas:

- (1) un modelo excitotóxico producido por el QUIN,
- (2) un modelo de déficit energético inducido por el 3-NP, y
- (3) un modelo típicamente pro-oxidante (FeSO_4).

6.1 *Objetivos Particulares*

- ✓ Determinar si la α -mangostina disminuye la peroxidación de lípidos en los 3 modelos probados.
- ✓ Evaluar si la α -mangostina preserva la funcionalidad mitocondrial en los modelos.
- ✓ Determinar si la α -mangostina ejerce un efecto protector evocando al sistema glutatión (GSH, Gpx y GST).

7. Materiales y Métodos

7.1 Reactivos y animales

El QUIN, 3-NP, el sulfato ferroso, el malondialdehído y el 3-(4,5-dimetiltiazol-2) 2,5-bromuro difeniltetrazolio (MTT) se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). La α -mangostina se obtuvo del Departamento de Biología y Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM. Los demás reactivos se obtuvieron de casas comerciales conocidas. El agua desionizada utilizada en todos los experimentos se obtuvo de un sistema purificador Direct-Q system (Millipore, MA, USA). Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua desionizada, excepto la α -mangostina, la cual se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO).

Para la realización de todos los experimentos, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (280–320 g), las cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y se agruparon 5 ratas en una cada caja de acrílico, en total 2 cajas. Todos los animales se alimentaron con un producto comercial (Purina Chow) y agua *ad libitum*, además de que se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y luz (12:12 ciclo luz:obscuridad).

7.2 Extracción y purificación de la α -Mangostina

La extracción y purificación de la α -Mangostina se hizo en el Departamento de Biología y Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM. Los experimentos para su extracción y purificación fueron realizados por los investigadores Octavio González Cuahutencos, Isabel Rivero-Cruz, Rachel Mata y José Pedraza-Chaverri.

A partir de 1 Kg del pericarpio de *G. mangostana*, se extrajo la α -mangostina por maceración con CH_2Cl_2 -MeOH (1:1;41) a temperatura ambiente por tres semanas. Después

de la filtración y evaporación del solvente bajo condiciones de presión reducida, se obtuvieron 161.3 g de un extracto orgánico crudo. Posteriormente, el extracto se sometió a cromatografía sobre una columna de sílica gel y se separó con CH₂Cl₂/Hexano para obtenerse 7 fracciones primarias (F1-F7). La α -mangostina se cristalizó de la fracción F7 como el mayor componente (31.5 g), y se realizaron diferentes pruebas de verificación y pureza de la mangostina, las cuales fueron consistentes con datos publicados (Ee et al., 2006; Ji et al., 2007).

7.3 Obtención de la fracciones sinaptosomales

Las fracciones sinaptosomales P2 se obtuvieron de cerebro completo (sin cerebelo), mediante una técnica previamente descrita (Pérez-De La Cruz et al., 2006). Se decapitaron las ratas, se obtuvo el cerebro y se pesó; a los cerebros se les agregaron 10 volúmenes (v/w) de glucosa 0.32 M y se homogenizaron. Posteriormente, se centrifugaron a 1073 xg durante 10 minutos a 4°C y se obtuvo el sobrenadante, el cual se volvió a centrifugar a 17,172 xg por 15 minutos a 4°C. Después, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el mismo volumen que se añadió de glucosa, pero en este caso se le añadió HEPES (NaCl 0.1 M, NaH₂PO₄ 0.001 M, NaHCO₃ 0.005 M, CaCl₂ 0.001 M y HEPES 0.01 M) a pH 7.4. Por último, las fracciones sinaptosomales se guardaron a -70°C para su posterior uso.

7.4 Diseño experimental

Para todos los experimentos se realizaron tratamientos por separado de QUIN+ α -mangostina, 3-NP+ α -mangostina y FeSO₄+ α -mangostina y sus respectivos controles. Tanto las toxinas como la mangostina se pusieron al mismo tiempo previo a la incubación y todas las muestras se llevaron a un volumen final de 500 μ L. Se realizaron dos soluciones madre

de la α -mangostina (1 mM y 10 mM), para disponer las concentraciones de mangostina requeridas (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño de los tratamientos.

Concentración de la α -mangostina (μ M)	Vol. de sinaptosomas (μ L)	Vol. de ácido quinolínico [100 μ M] (μ L)	Vol. de ácido 3-nitropropionico [1 mM] (μ L)	Vol. de FeSO ₄ [5 μ M] (μ L)	Vol. de la α -mangostina (μ L)	Vol. de HEPES (μ L)
Control	250	----	----	----	----	250
0	250	10	----	----	----	240
0	250	----	10	----	----	240
0	250	----	----	10	----	240
10*	250	10	10	10	5	235
25*	250	10	10	10	12.5	227.5
50*	250	10	10	10	25	215
100**	250	10	10	10	5	235
250**	250	10	10	10	12.5	227.5
500**	250	10	10	10	25	215

* A partir de la solución 1 mM de α -Mangostina.

** A partir de la solución 10 mM de α -Mangostina.

Se realizó una curva concentración-respuesta de la α -mangostina [10 – 500 μ M], y el QUIN, 3-NP y FeSO₄ se administraron a concentraciones tóxicas *in vitro* (100 μ M, 1 mM y 5 μ M, respectivamente), las cuales se han descrito previamente (Silva-Adaya et al., 2008; Pavlica et al., 2005). Todos los preparados se manejaron en hielo y por duplicado; posteriormente se incubaron a 37°C por 1 hora en un baño con agitación constante, e inmediatamente se usaron.

7.5 Determinación de la peroxidación de lípidos *in vitro*

La peroxidación de lípidos se midió en las fracciones sinaptosomales por medio del ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA), de acuerdo a reportes previos (Pérez-De La Cruz et al., 2006). Este método cuantifica las sustancias que reaccionan con el TBA, ya que éste forma una condensación con los productos de la peroxidación de lípidos, y genera un producto de coloración rosada que está directamente relacionado con la cantidad de productos de la peroxidación.

Las fracciones sinaptosomales se expusieron previamente a los diferentes tratamientos y al término de éstos se tomaron alícuotas de 250 μL y se les agregó 500 μL del reactivo TBA (0.375 gr. de ácido tiobarbúrico + 15 gr. de ácido tricloroacético + 2.5 mL. de ácido clorhídrico en un volumen final de 100 mL.), para luego incubarse por 20 minutos a 94°C en baño maría. Al término de la incubación, las muestras adquirieron un color rosado y se dejaron enfriar directamente en hielo por 5 minutos; posteriormente se centrifugaron a 3,000 xg por 15 minutos. Por último, la densidad óptica de las muestras se cuantificó a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro Genesys 8 ThermoSpectronic. Los resultados se expresaron como nanomoles de sustancias reactivas al TBA por miligramo de proteína.

7.6 *Estimación de la funcionalidad mitocondrial*

La funcionalidad mitocondrial se evaluó por medio del ensayo de reducción del MTT, siguiendo la descripción de estudios previos (Pérez-De La Cruz et al., 2006). Este método es empleado usualmente como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, ya que la formación de sales de formazan ocurre por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de células viables. Se tomaron 250 μL de las fracciones sinaptosomales que previamente se expusieron a los diferentes tratamientos, y se les agregaron 10 μL del reactivo de MTT (5 mg/mL) para volverse a incubar a 37°C por 20 minutos. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 15,300 xg durante 3 minutos, y al término se desechó el sobrenadante, y la pastilla se resuspendió con 500 μL de isopropanol ácido. Por último, se cuantificó la producción de sales de formazan en un espectrofotómetro Genesys 8 ThermoSpectronic a 570 nm de longitud de onda. Los resultados se expresaron en porcentajes de reducción de MTT con respecto al control.

7.7 Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH)

Los niveles de glutatión se midieron a través de la detección fluorométrica posterior a la incubación con O-ftaldialdehído (OPA), de acuerdo al reporte de Hissin y Hilf (1976). Al término de los diferentes tratamientos, se tomaron alícuotas de 250 μ L de las fracciones sinaptosomales y se les agregaron 3.5 mL de buffer de fosfatos–EDTA (fosfato de sodio 0.1 M y EDTA 0.005 M, pH 8). Se mezclaron y se quitaron 500 μ L, los cuales se guardaron a -70°C para posteriormente cuantificar proteína. Después se le añadió 1 mL de ácido fosfórico (HPO_3) al 25 % y se centrifugaron a 3,000 xg a 4°C durante 15 min, al término de los cuales se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se le añadió 4.5 mL del buffer de fosfatos–EDTA. De esta mezcla se tomaron 100 μ L y se le añadió 1.8 mL del buffer de fosfatos–EDTA y 100 μ L del reactivo OPA (1 mg/mL en etanol). Se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos protegidos de la luz.

Se preparó una curva estándar de GSH con un rango de concentraciones de 0 a 0.015 μ g/mL. Todos los puntos de la curva se trataron de la misma manera que las muestras. Finalmente, la fluorescencia de las muestras y la curva se determinó en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-50B, usando las longitudes de onda de excitación y emisión de 350 y 420 nm, respectivamente. Los resultados se expresaron en μ g de GSH por mg de proteína.

7.8 Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (Gpx)

La actividad de la GPx se midió por el método de Lawrence y Burk (1976), en el cual la GPx cataliza la reducción del H_2O_2 acoplado a la oxidación del GSH, y éste a su vez es reducido por acción de la GR, utilizando como co-factor al NADPH. La disminución de la concentración de NADPH se detectó a una longitud de 340 nm (Figura 20).

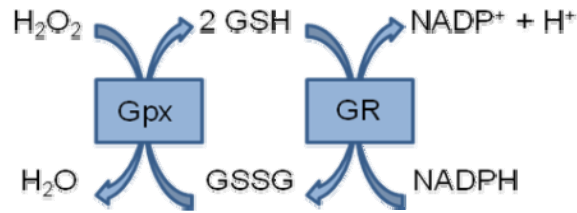


Figura 20. Reacción utilizada para medir de la actividad de la Gpx.

Al término de los tratamientos, las muestras se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron por 5 min a 3,000 xg. Posteriormente, en una celda de cuarzo se mezclaron 100 μ L del sobrenadante de la muestra y 800 μ L de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM, Azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y U de GR/mL en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7). Se analizó un tubo inespecífico adicional con 100 μ L del amortiguador de fosfatos; tanto el tubo como las muestras se dejaron incubar por 3 min a temperatura ambiente y se les adicionó 100 μ l de la solución de H₂O₂ (30 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7). Se agitó y se leyó la absorbancia a 340 nm mediante una curva de calibración de cinética simple medida cada 30 seg por 3 min. La actividad de la GPx se expresó como unidades de actividad/mg proteína. Una unidad de actividad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por min.

$$\text{U/mg prot} = \frac{([\Delta A_{340}/\text{min}]_{\text{muest}} - [\Delta A_{340}/\text{min}]_{\text{in esp}}) / (6.22 \cdot 100)}{\text{mg prot /mL sobrenadante}}$$

donde $[\Delta A_{340}/\text{min}]$ representa los cambios en la absorbancia por minuto de la muestra y del tubo inespecífico, respectivamente, y $6.22 \cdot 100$ representa el coeficiente de absorptividad μ mol del NADPH a 340 nm.

7.9 Estimación de la actividad de la glutatión S-transferasa (GST)

La actividad de la GST se midió por el método de Habig y Jakoby (1981), el cual cuantifica la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobenceno a 340 nm, cuando se

conjugan GSH y 1-cloro 2,4-dinitrobenzono (CNDB) (Figura 21).

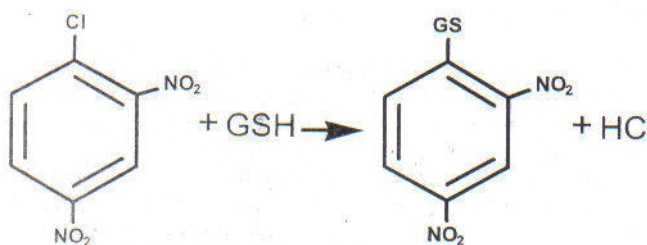


Figura 21. Reacción utilizada para medir la actividad de la GST.

Al término de los tratamientos, las muestras se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron por 5 min a 3,000 xg. Posteriormente, en una celda de cuarzo se mezclaron 200 µL del sobrenadante de la muestra, 730 µL del amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7), 20 µL de GSH 100 mM y 50 µL del CNDB 20 mM en DMSO. Se agitó y se leyó la absorbancia a 340 nm mediante una curva de calibración de cinética simple medida cada 30 seg por 3 min. Se calibró con 930 µL de amortiguador de fosfatos, GSH y CDNB. La actividad de la GST se expresó como unidades de actividad/mg proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 µmol de CDNB con GSH por minuto a pH 6.5 y a 25°C.

$$U\text{ GST/mL} = \frac{[(\Delta A_{340}\text{Muestra} - \Delta A_{340}\text{Blanco})/9.6] * 0.1\text{mL}}{\text{mg prot /mL sobrenadante}}$$

donde $[\Delta A_{340}/\text{min}]$ representa los cambios en la absorbancia por minuto de la muestra y del blanco, respectivamente, y 9.60 representa el coeficiente de extinción mmol a 340 nm.

7.10 Cuantificación de proteínas

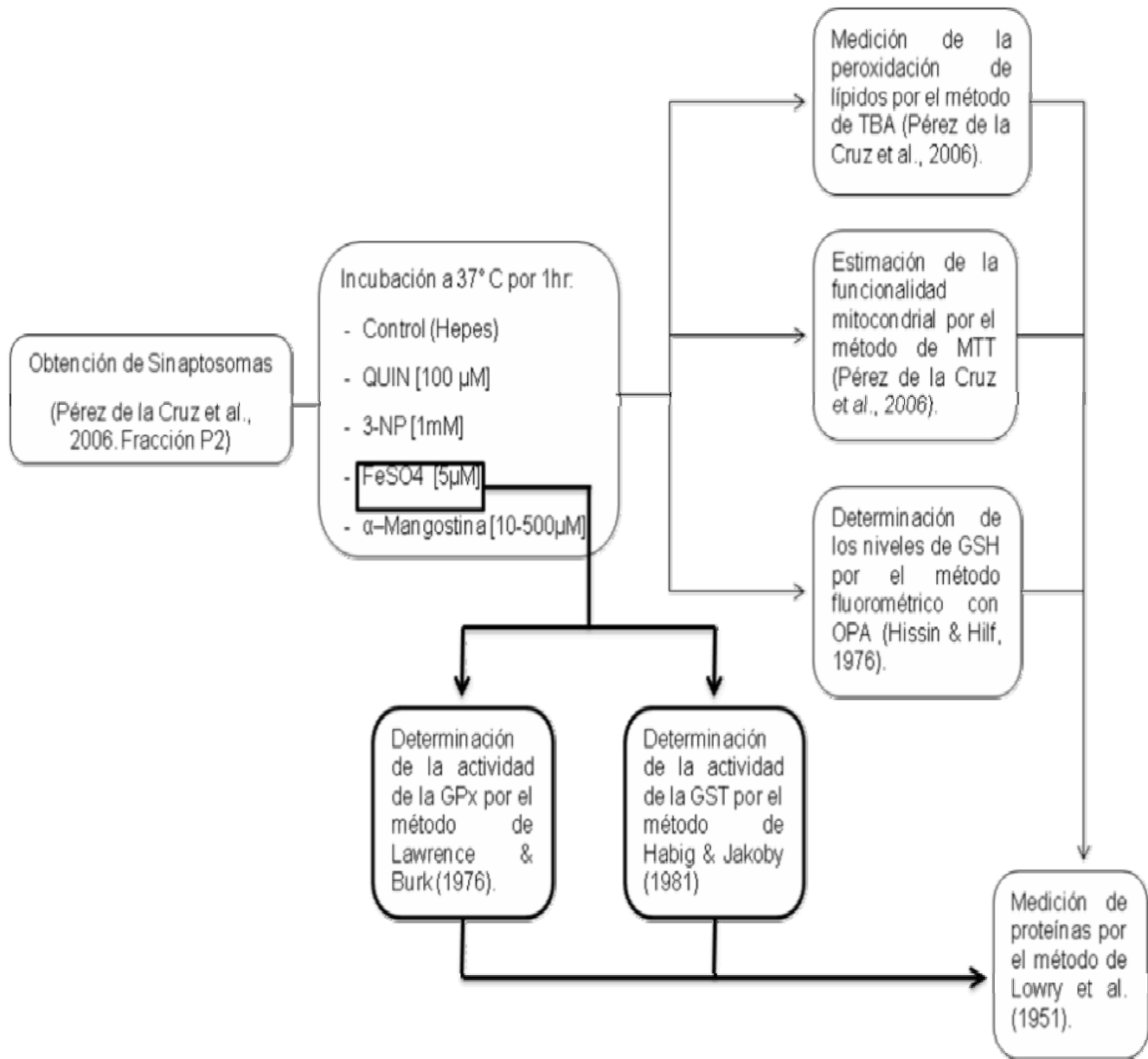
Para la cuantificación de proteínas se empleo el método de Lowry y colaboradores

(1951). Este método se basa en la reactividad del nitrógeno contenido en los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre bajo condiciones alcalinas, y en la reducción del reactivo Folín a un color azul intenso por la oxidación de los residuos fenólicos de tirosina. Se realizó una curva estándar utilizando albúmina de suero de bovino (ASB) a concentraciones de 0 a 50 μg de proteína. A las muestras que fueron sometidas a los tratamientos se les hizo una dilución 1:100 y se tomaron 200 μL de la dilución para luego llevarles a 1mL con la solución C (50 mL de solución A: Na_2CO_3 al 2% + NaOH al 0.4% + Tartrato de sodio al 0.02% + 1 mL de solución B: CuSO_4 al 0.5%). La mezcla se deja reposar por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se añade 100 μL de la solución D (dilución 1:1 del reactivo de Folín 2.0 N) con agitación simultánea. Esta mezcla se deja incubando por 30 min a temperatura ambiente. Por último la densidad óptica de las muestras y la curva se cuantificó a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro Genesys 8 ThermoSpectronic. Los resultados se expresaron como mg/mL de muestra.

7.11 *Análisis Estadístico*

Todos los resultados se expresaron en valores promedio \pm error estándar de la media (E.E.M.) Se les aplicó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias, utilizando el software Prism 4.02 (GraphPad, San Diego, CA, EU). Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.12 Diagrama de flujo metodológico



8. Resultados

8.1 Efecto de la α -mangostina sobre la peroxidación de lípidos inducida por QUIN, 3-NP y $FeSO_4$.

En la figura 22 se presenta la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN sobre las fracciones sinaptosomales, la cual aumenta en un 32% con respecto al grupo control. Por su parte, la administración de la α -mangostina disminuyó la peroxidación inducida por la toxina incluso desde la concentración más baja utilizada 10 μ M, la cual baja la peroxidación a un 3% por arriba del control, y la concentración más alta aminoró la peroxidación hasta en un 13% por debajo del control.

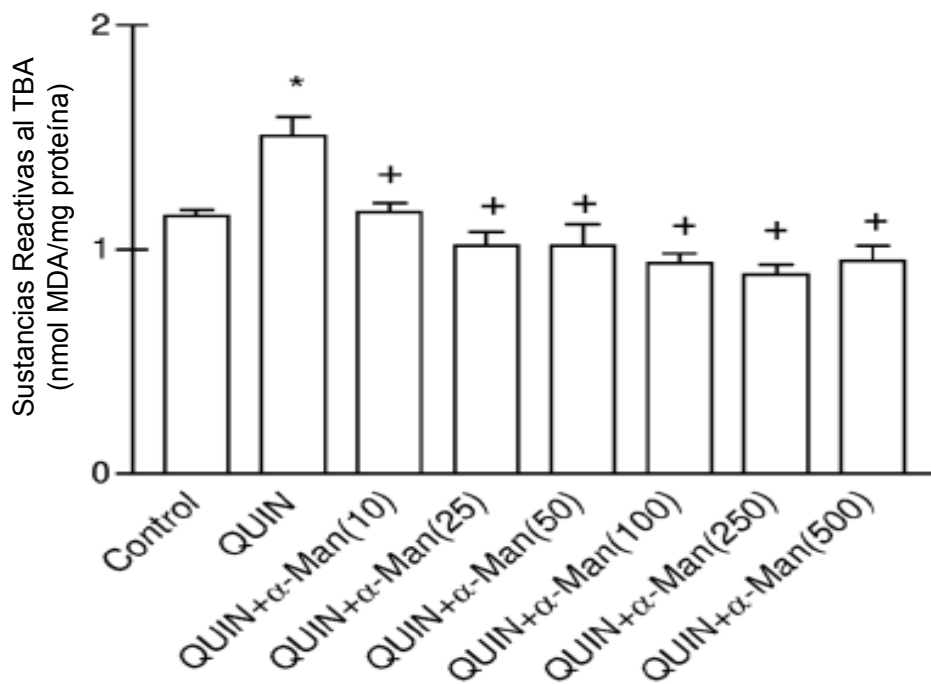


Figura 22. Efecto de la α -mangostina sobre la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN [100 μ M] después de 1 hora de incubación a 37°C. *P<0.05 vs. Control; +P<0.05 vs QUIN. Los datos se presentan como promedios \pm E.E.M.; n= 5 experimentos por grupo. TBA= ácido tiobarbitúrico, MDA= malondialdehído, QUIN= ácido quinolínico, α -Man= α -mangostina.

En la figura 23 se presenta el efecto del 3-NP sobre la peroxidación de lípidos, el cual incrementó dicho marcador en un 52% con respecto al control. La α -mangostina inhibió la peroxidación a un 5% por arriba del control en la concentración de 10 μ M, mientras que a [500 μ M], la peroxidación se inhibió en un 8% por debajo del grupo control.

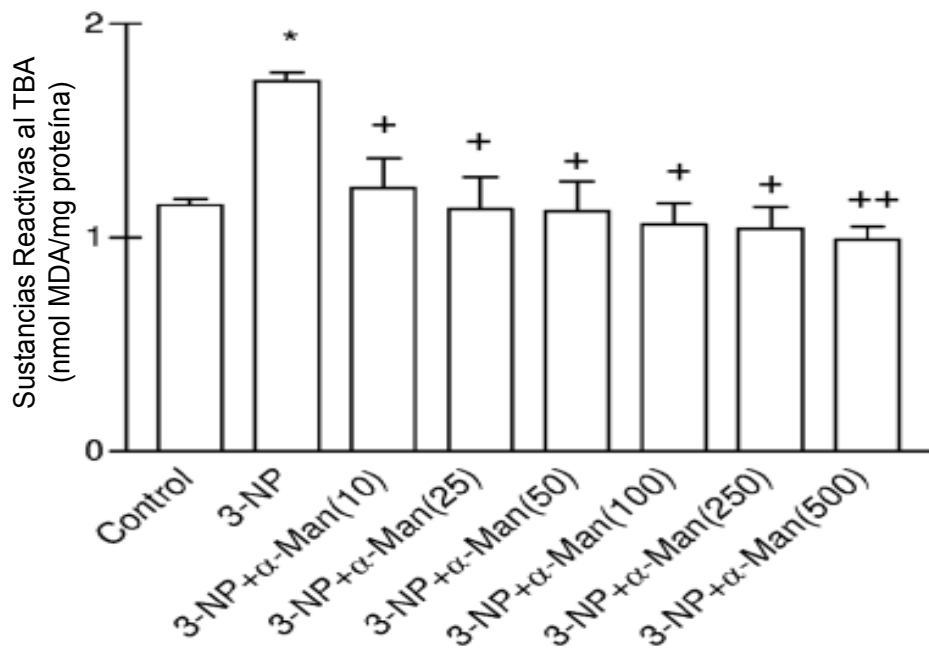


Figura 23. Efecto de la α -mangostina sobre la peroxidación de lípidos evocada por el 3-NP (1mM) después de 1 hora de incubación a 37°C. *P<0.05 vs Control; +P<0.05 vs. 3-NP; ++P<0.01 vs 3-NP. Los datos se presentan como promedios \pm E.E.M.; n= 5 experimentos por grupo. TBA= ácido tiobarbitúrico, MDA= malondialdehído, 3-NP= ácido 3-nitropropiónico, α -Man= α -mangostina.

En la figura 24 se observa el efecto peroxidativo del FeSO₄, el cual aumenta drásticamente el daño oxidativo (116% por arriba del control). Por su parte, la α -mangostina [10 μ M] atenuó la peroxidación a un 66% y la concentración 500 μ M lo hace a un 48%, ambas por arriba del control. Todas las concentraciones probadas de la mangostina reducen

la acción del sulfato ferroso; sin embargo, ninguna de las concentraciones disminuyó completamente la acción del mismo.

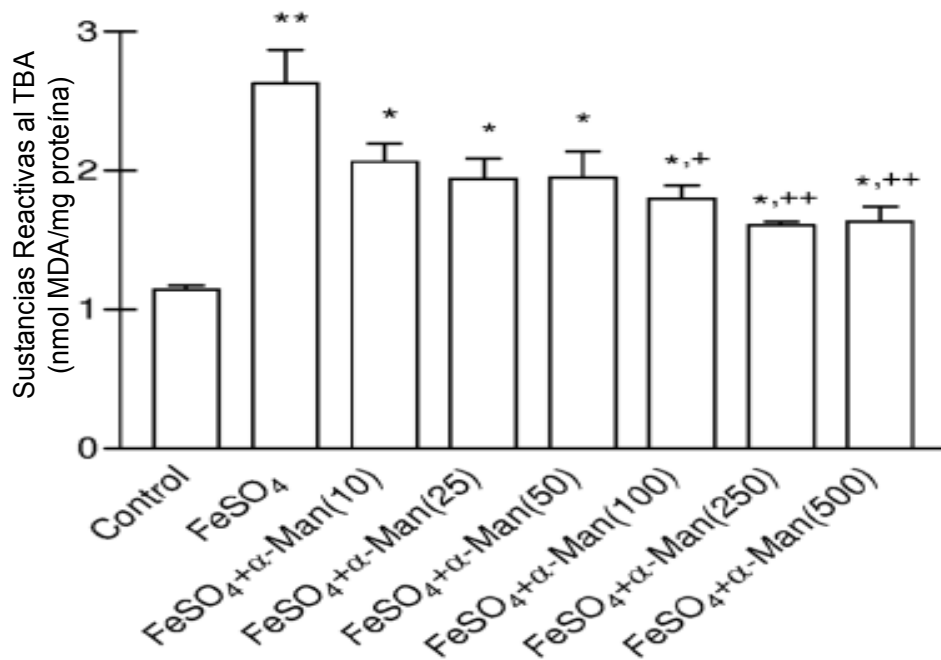


Figura 24. Efecto de la α -mangostina sobre la peroxidación de lípidos evocada por el FeSO₄ (5 μ M) después de 1 hora de incubación a 37°C. *P<0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; +P<0.05 vs FeSO₄; ++ P<0.01 vs FeSO₄. Los datos se presentan como promedios \pm E.E.M.; n= 5 experimentos por grupo. TBA= ácido tiobarbitúrico, MDA= malondialdehído, FeSO₄= sulfato ferroso, α -Man= α -mangostina.

8.2 Efecto de la α -mangostina sobre la disfunción mitocondrial inducida por QUIN, 3-NP y FeSO₄.

En la Figura 25 se presenta la disfunción mitocondrial inducida por el QUIN y 3-NP, tanto el QUIN como el 3-NP producen una disminución significativa (42% y 30%, respectivamente, ambas por abajo del control) sobre la capacidad reductora mitocondrial comparado con el control. El control representa el 100% de la capacidad reductora de la mitocondria. La

administración de la α -mangostina + QUIN a concentraciones 10 μ M y 500 μ M resultó en un 14% y 6% de disminución de la disfunción mitocondrial producida por esta toxina, ambas por debajo del control. Por su parte, la administración de la xantona + 3-NP revierte el efecto de esta neurotoxina a un 1% y 5% por debajo del control, utilizando las concentraciones más baja y alta, respectivamente.

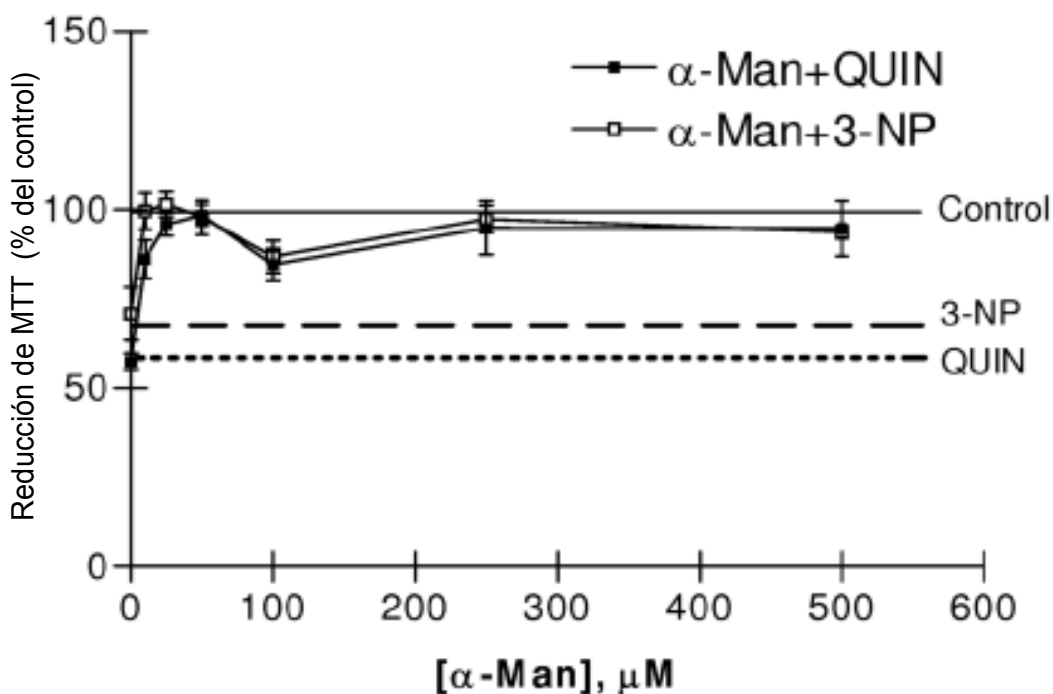


Figura 25. Efecto de la α -mangostina sobre la disfunción mitocondrial inducida por el QUIN [100 μ M] y 3-NP [1 mM] después de 1 hora de incubación a 37°C. Los datos se presentan como promedios \pm E.E.M.; n= 5 experimentos por grupo. MTT= 3-(4,5-dimetiltiazol-2) 2,5-bromuro difeniltetrazolio, QUIN= ácido quinolínico, 3-NP= ácido 3-nitropropiónico, α -Man= α -mangostina.

Los datos obtenidos en los experimentos de reducción de MTT con FeSO_4 solo y FeSO_4 + mangostina resultaron en valores muy elevados (considerados artificiales), ya que todos los valores se encontraban muy por arriba del 100% correspondiente al control. Este hecho se puede deber probablemente al fuerte efecto que ejerce el FeSO_4 como molécula

pro-oxidante, y por lo tanto, la técnica de reducción de MTT resulta inespecífica para este experimento (datos no presentados), orientándose a la detección colorimétrica de marcadores de daño oxidativo.

8.3 Efecto de la α -mangostina sobre los niveles de glutatión (GSH) inducido por QUIN, 3-NP y FeSO_4 .

Los niveles de GSH inducidos por el 3-NP disminuyen significativamente en un 41% con respecto al grupo control (Figura 26). Por su parte, la administración de la α -mangostina recupera los niveles de GSH disminuidos por la toxina, incluso desde la concentración más baja utilizada 10 μM , a un 1% y a un 12% en la concentración más alta 500 μM , ambas por arriba del control.

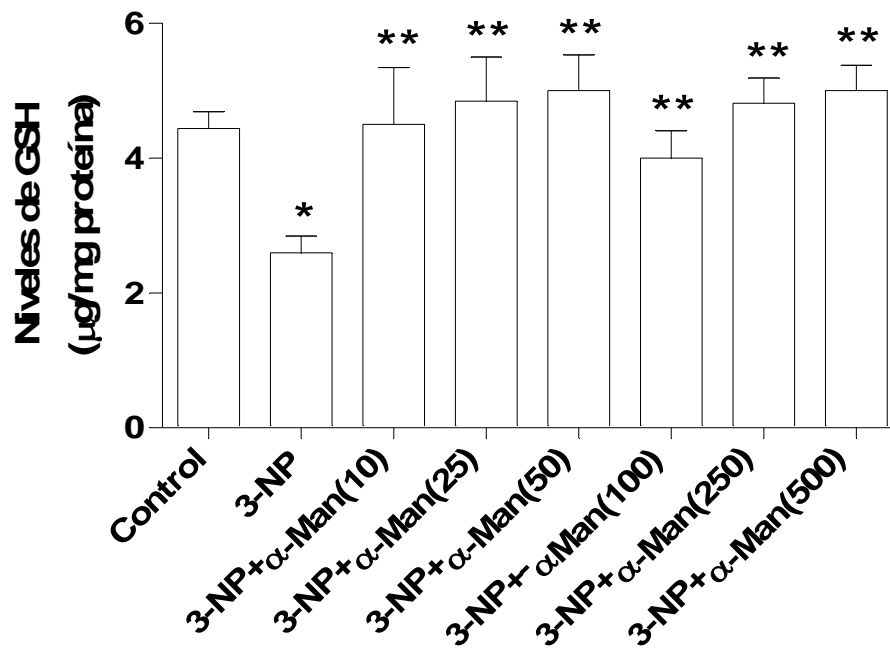


Figura 26. Efecto de la α -mangostina sobre los niveles de GSH inducido por el 3-NP [1 mM] después de 1 hora de incubación a 37°C. *P<0.05 vs Control; **P<0.05 vs 3-NP. Los datos se presentan como $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína \pm E.E.M.; n=2 experimentos por grupo. GSH= glutatión reducido, 3-NP= ácido 3-nitropropiónico, α -Mang= α -mangostina.

En la Figura 27 se observa la drástica disminución de los niveles de GSH inducida por el FeSO_4 en las fracciones sinaptosomales, disminuyendo en un 60% con respecto al grupo control. Esta vez se requirió de una concentración más alta de la α -mangostina (25 μM) para poder recuperar los niveles de GSH inducidos por esta toxina a un 6% por arriba del control; por su parte, la concentración de 500 μM de la mangostina recuperó a un 16% los niveles de GSH por debajo del control.

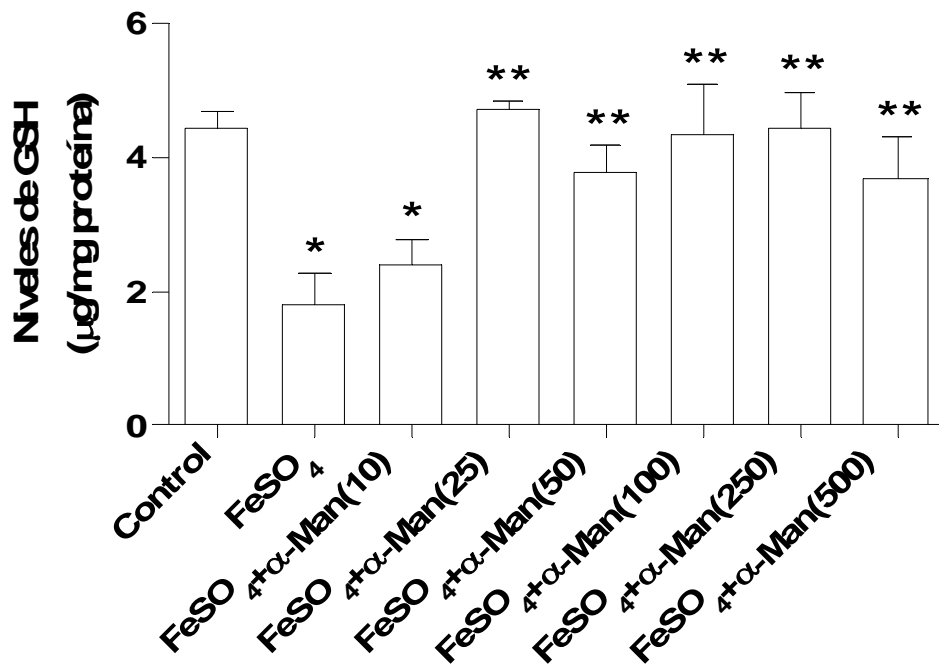


Figura 27. Efecto de la α -mangostina sobre los niveles de GSH inducido por el FeSO_4 [5 μM] después de 1 hora de incubación a 37°C. * $P < 0.05$ vs Control; ** $P < 0.05$ vs FeSO_4 . Los datos se presentan como $\mu\text{g/mg}$ proteína \pm E.E.M.; $n=2$ experimentos por grupo. GSH= glutati3n reducido, FeSO_4 = sulfato ferroso, α -Mang= α -mangostina.

Los experimentos realizados sobre los niveles de GSH con QUIN [100 μM] resultaron en valores similares al grupo control, y por lo tanto, no se encontr3 una diferencia significativa entre los grupos control, QUIN y QUIN + α -mangostina. Aunque existen varias referencias que evidencian la disminuci3n de los niveles de GSH inducido por el QUIN, nuestros

resultados pueden deberse al tiempo y tipo de preparación utilizados para estos experimentos (datos no presentados), dado que la concentración de GSH en terminales aisladas puede ser menor que en otras preparaciones biológicas.

8.4 Efecto de la α -mangostina sobre la actividad enzimática basal de la glutatión peroxidasa e inducida por $FeSO_4$.

En la Figura 28 se presenta el efecto de la α -mangostina *per se* sobre la actividad de la GPx sin la adición de ninguna toxina. Se observó un incremento en la actividad enzimática; a partir de la concentración 25 μ M aumentó un 209% este efecto con respecto al grupo control. Dicho aumento se mantuvo en valores similares en las siguientes concentraciones crecientes de la α -mangostina.

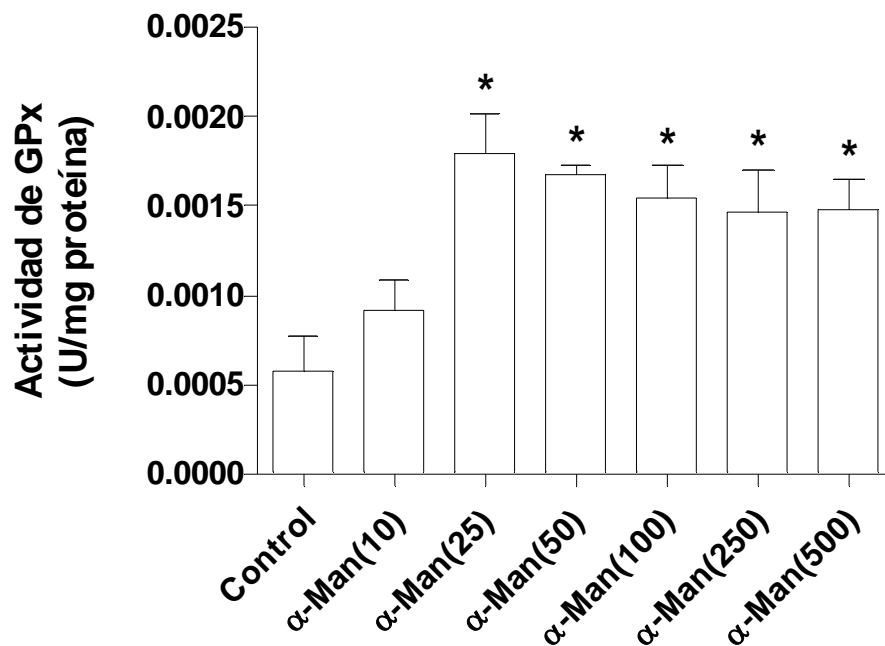


Figura 28. Efecto de la α -mangostina sobre la actividad basal de la Gpx después de 1 hora de incubación a 37°C. *P<0.05 vs Control. Los datos se presentan como U Gpx/mg proteína \pm E.E.M.; n=2 experimentos por grupo. Gpx= glutatión peroxidasa, α -Mang= α -mangostina.

En la Figura 29 se presenta el efecto del FeSO_4 sobre la actividad de la Gpx, el cual incrementa drásticamente la actividad de esta enzima un 245% por arriba del control. Por su parte, la administración del FeSO_4 en adición con la α -mangostina en todas las concentraciones probadas incrementó dicha actividad; la concentración más baja de la mangostina (10 μM) lo hizo un 264%, y la concentración 500 μM aumentó un 199%, ambas con respecto al grupo control.

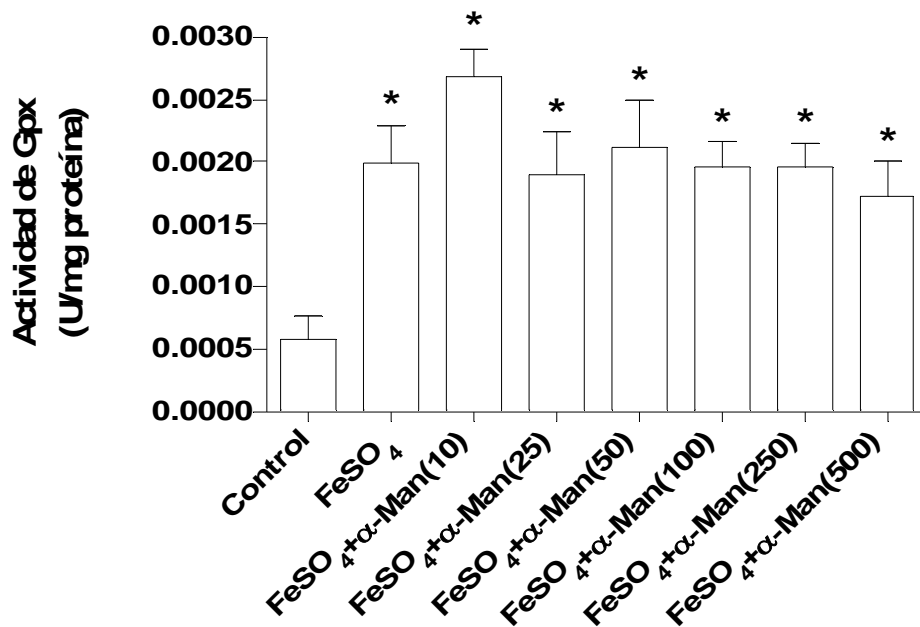


Figura 29. Efecto de la α -mangostina sobre la actividad de la Gpx inducido por el FeSO_4 [5 μM] después de 1 hora de incubación a 37°C. * $P < 0.05$ vs Control. Los datos se presentan como U Gpx/mg proteína \pm E.E.M.; n=2 experimentos por grupo. Gpx= glutatión peroxidasa, FeSO_4 = sulfato ferroso α -Mang= α -mangostina.

8.5 Efecto de la α -mangostina sobre la actividad enzimática basal de la Glutación-S-transferasa e inducida FeSO_4 .

En la figura 30 se presenta el efecto de la α -mangostina *per se* sobre la actividad de la GST sin la adición de ninguna toxina. Como se puede observar en la gráfica, aunque se nota

una tendencia a la disminución de la actividad de dicha enzima, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos, y solamente en la concentración de 500 μM se encontró una disminución del 37% con respecto al grupo control. Estos resultados sugieren un posible efecto nocivo por parte de la α -mangostina a concentraciones altas, lo cual se refleja en una disminución en la actividad de esta enzima.

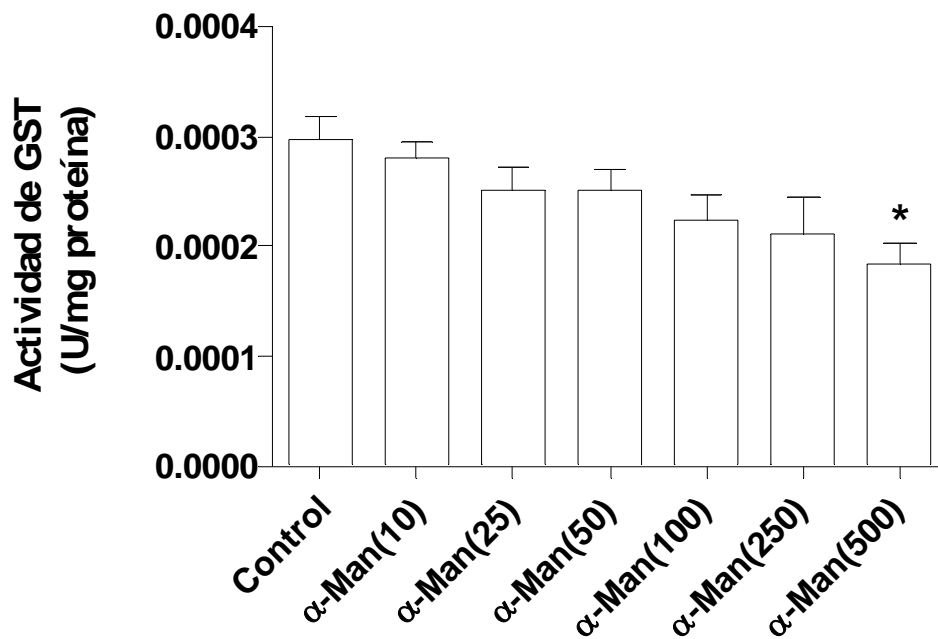


Figura 30. Efecto de la α -mangostina sobre la actividad basal de la GST después de 1 hora de incubación a 37°C. * $P < 0.05$ vs Control. Los datos se presentan como U GST/mg proteína \pm E.E.M.; $n=2$ experimentos por grupo. GST= glutatión S-transferasa, α -Mang= α -mangostina.

El efecto de la administración del FeSO_4 en la actividad de la GST no indujo ningún cambio significativo con respecto al control (Figura 31). De igual manera la administración de la α -mangostina solo indujo una disminución (30% por debajo del control) en la concentración más alta utilizada sobre la actividad de esta enzima. Los experimentos realizados con la GST

proporcionan fuerte evidencia de que esta enzima no está participando en nuestro modelo tóxico.

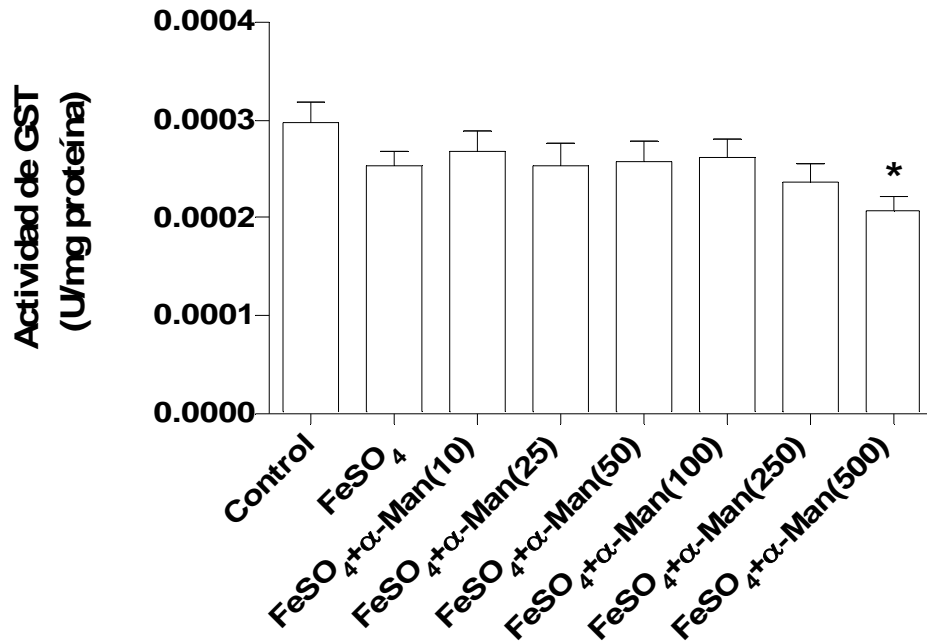


Figura 31. Efecto de la α -mangostina sobre la actividad de la GST inducido por el FeSO_4 después de 1 hora de incubación a 37°C . * $P < 0.05$ vs Control. Los datos se presentan como U GST/mg proteína \pm E.E.M.; $n=2$ experimentos por grupo. GST= glutatión S-transferasa, FeSO_4 = sulfato ferroso, α -Mang= α -mangostina.

9. Discusión

El estrés oxidativo/nitrosativo, la excitotoxicidad y el déficit energético son eventos que se encuentran presentes en diversas enfermedades neurodegenerativas. Existe una considerable cantidad de reportes que relacionan a dichos eventos con la neurodegeneración presente en diversas patologías. Los experimentos realizados en este trabajo recrean parcialmente estos eventos tóxicos al administrar FeSO_4 (5 μM), QUIN (100 μM) y 3-NP (1 mM) como modelos de daño neuronal. La α -mangostina, al ser administrada como tratamiento protector en los diferentes experimentos logró revertir/atenuar algunos de los efectos del daño oxidativo evocado por las neurotoxinas.

Existe una gran variedad de reportes tanto *in vivo* como *in vitro* que evidencian el aumento de la peroxidación lipídica por la administración de las tres neurotoxinas en diferentes preparaciones cerebrales. Este daño oxidativo que ejercen dichas moléculas sobre el SNC pone en riesgo la viabilidad celular del mismo (Chakraborty et al., 2001; Rodríguez-Martínez et al., 2000; Leipnitz et al., 2005; Túnez et al., 2004; Pérez-De La Cruz et al., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo, tal y como se esperaban, muestran un incremento en la lipoperoxidación en los tres modelos de neurotoxicidad debido a su actividad pro-oxidante. El FeSO_4 por su parte, incrementó drásticamente (116% por arriba del grupo control) la peroxidación lipídica en comparación con QUIN y 3-NP, los cuales presentaron efectos más moderados (32% y 52%, respectivamente); sin embargo, los efectos de estas toxinas lograron ser revertidos en diferente medida con la administración de la mangostina, sugiriendo que su toxicidad puede ser atenuada. Estos resultados son similares a los anteriormente reportados por Pavlica y colaboradores (2005), lo cual sugiere que el FeSO_4 está ejerciendo su efecto pro-oxidante a través de su disociación e incursión del hierro en la reacción de Fenton, y generando de esta manera radicales libres,

particularmente el $\cdot\text{OH}$, el cual se ha propuesto como el principal radical en iniciar la peroxidación de lípidos.

La administración de la α -mangostina en los tres modelos logró disminuir la lipoperoxidación; tanto con QUIN como con 3-NP lo hizo incluso a condiciones por debajo del control, mientras que con el FeSO_4 , todas las concentraciones de la mangostina disminuyeron la lipoperoxidación, aunque ninguna logró hacerlo por debajo de las condiciones basales. Esto sugiere que el mecanismo de acción del sulfato ferroso es mucho más potente al generar radicales libres, que el del QUIN y el 3-NP, y el efecto de la α -mangostina contra este insulto tóxico no es tan potente como para disminuir totalmente la peroxidación de lípidos.

La reducción de MTT se toma como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, por tal motivo se le ha relacionado con la viabilidad celular. En dos de nuestros modelos (QUIN y 3-NP), la funcionalidad mitocondrial se redujo significativamente en un 42% y 30% por debajo del control, respectivamente, sugiriendo que los mecanismos de acción (excitotoxicidad, déficit energético y producción de ERO) de dichas toxinas afectan directamente la integridad mitocondrial, lo cual desencadena eventos que guían a la muerte celular. La administración de la α -mangostina atenúo el daño inducido por estas dos toxinas a niveles muy cercanos al grupo control, sugiriendo que el daño en la funcionalidad mitocondrial y la lipoperoxidación son dos eventos que pueden estar estrechamente relacionados. Además, la mangostina tiene la habilidad de preservar la capacidad reductora de la célula. El hecho de que la α -mangostina restableciera los niveles de MTT y MDA frente a los modelos tóxicos sugiere además que la célula se encuentra en un estado de “resistencia”, intentando sobrevivir al insulto tóxico.

Los experimentos realizados de reducción de MTT con FeSO_4 sólo y $\text{FeSO}_4 + \alpha$ -mangostina resultaron en valores alrededor del 100% de la capacidad reductora. Estos

resultados fueron corroborados en una investigación realizada en el 2005, en la cual al evaluar la funcionalidad mitocondrial por el mismo método con FeSO_4 no se observó un cambio significativo en la reducción de MTT, y se requirió de concentraciones altamente tóxicas (1 mM) para poder observar una disminución de dicho marcador (Pavlica et al., 2005). De igual manera, otros autores han obtenido resultados similares al determinar el efecto del hierro en la viabilidad celular medida por el ensayo de MTT, quienes concluyeron que se requieren de concentraciones exageradas para poder lograr una disminución significativa en la viabilidad celular (Nara et al., 1999; Nuñez et al., 2004). Este hecho puede deberse a el potente efecto del sulfato ferroso, lo cual hace que este método sea inespecífico o poco sensitivo para poder determinar el daño inducido por esta toxina.

El sistema glutatión es uno de los principales sistemas destoxificadores de la célula; en el SNC juega un papel muy importante al mantener los niveles basales de ERO al reaccionar con estos de manera enzimática o no enzimática, y al reaccionar con diferentes xenobióticos (Dringen, 2000). Nosotros analizamos 3 marcadores de dicho sistema para poder establecer si la α -mangostina juega un papel al modular algún parámetro de dicho sistema.

El GSH es el principal antioxidante no enzimático, por lo cual es de vital importancia para que la célula mantenga en equilibrio los niveles de esta molécula. Diversos reportes han observado una disminución en los niveles de esta molécula en diferentes eventos de neurodegeneración, tales como el estrés oxidativo/nitrosativo, la isquemia cerebral, el envejecimiento y la progresión de diversas patologías como la demencia tipo Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Aoyama et al., 2008; Yousuf et al., 2010; Aoyama et al., 2006; Dringen, 2000).

La información reportada anteriormente sobre los niveles de GSH inducidos por QUIN, sostienen que esta toxina disminuye significativamente dichos niveles, y que lo hace por un

mecanismo típicamente de estrés oxidativo (Santamaría et al., 1999; Rodríguez-Martínez et al., 2000; Swathy et al., 2010). Sin embargo, en el 2005, Leipnitz y colaboradores realizaron experimentos en una preparación rica en organelos celulares de corteza cerebral de rata, la cual es similar a los sinaptosomas, probando las concentraciones 10, 100 y 500 μM de QUIN, y no observaron ningún cambio significativo en los niveles de GSH. También determinaron que al agregar una combinación de Fe II (2 μM) y QUIN, los niveles de GSH sí disminuyen, lo cual sugiere que el radical hidroxilo puede estarse formando a causa del Fe II en combinación con el QUIN bajo estas condiciones experimentales. Los datos obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo, para determinar los niveles de GSH inducidos por QUIN y QUIN + α -mangostina, resultaron en valores semejantes al grupo control y no se observó ninguna diferencia significativa entre estos grupos. Dichos resultados concuerdan con el trabajo de Leipnitz (2005), y pueden deberse en parte al tipo de preparación utilizada.

Por otra parte, el 3-NP y el FeSO_4 disminuyeron significativamente (41% y 60%, respectivamente) los niveles de GSH con respecto al grupo control; sin embargo, el FeSO_4 logró aminorar mayoritariamente dichos niveles, lo cual indica que estas dos toxinas son capaces de alterar el perfil de este antioxidante endógeno, y puede deberse en parte al mecanismo de acción pro-oxidante de ambas moléculas.

La administración de la α -mangostina en ambos modelos restauró los niveles de GSH a valores similares al grupo control. Con el 3-NP logró hacerlo incluso desde la concentración más baja (10 μM), y con el FeSO_4 lo hizo a partir de la concentración 25 μM , evidenciando el potente efecto de este último al necesitar una mayor concentración por parte de la mangostina. Existen pocos reportes que investiguen el efecto de la α -mangostina sobre diferentes antioxidantes endógenos. En el 2007, Devi Sampath y colaboradores determinaron, en un modelo de estrés oxidativo al miocardio, que la α -mangostina incrementa los niveles de GSH a niveles cercanos al grupo control, lo cual corrobora

nuestros resultados al recuperar los niveles de GSH frente a diferentes modelos de daño y generación de ERO, evidenciando su efecto antioxidante.

Los resultados obtenidos de GSH son semejantes a otras investigaciones que indican que el 3-NP y el FeSO₄ disminuyen sus niveles en modelos *in vivo* e *in vitro*, y que este efecto puede ser revertido por la administración de antioxidantes (Binienda et al., 1998; Kumar et al., 2010; Pavlica et al., 2005).

Al GSH se le han descrito una considerable variedad de funciones biológicas importantes; una de éstas es la de reaccionar de manera no enzimática con especies como son el O₂^{•-}, [•]OH, NO[•] y el OONO⁻ (Clancy et al., 1994; Winterbourn & Metpdiewa, 1994), además de que tiene la capacidad de unir y transportar metales en el interior celular (Fernández & García, 2008). Dichas funciones pueden estar participando en nuestro modelo, aunque se necesitan más experimentos en apoyo a esta hipótesis.

La Gpx es otro componente del sistema glutatión y es la principal enzima en la vía de degradación del H₂O₂ a H₂O, para lo cual utiliza como donador de electrones al GSH. Esta enzima protege a los lípidos de membrana y a macromoléculas del daño oxidativo producido por los diferentes peróxidos (Dringen et al., 2005).

No existe ningún reporte que ponga en evidencia el efecto de la α -mangostina *per se* sobre la actividad de la Gpx; sin embargo, en el reporte antes mencionado de Devi Sampath y col. (2007), los autores encontraron que la administración de una catacolamina sintética (isoproterenol, ISO) en ratas indujo una disminución de la actividad de la Gpx, y el pre-tratamiento con α -mangostina preservó la actividad de esta enzima en niveles comparables al grupo control. En nuestro estudio, la administración de la α -mangostina *per se* sorprendentemente incrementó 2 veces la actividad de la Gpx a partir de la concentración de 25 μ M, y mantuvo un efecto similar en las concentraciones crecientes de la xantona. Este hecho puede estar directamente relacionado con la disminución en la lipoperoxidación basal

en homogenados de cerebro de rata reportada por Márquez-Valadez y colaboradores en 2009, sugiriendo que el incremento en la actividad de la Gpx puede estar favoreciendo a la célula para detoxificarla de las especies reactivas.

Por otra parte, los reportes que se tienen del efecto del hierro sobre la actividad de la GPx en SNC son muy pocos, probablemente por el tipo de preparación y células utilizadas en cada modelo. En un modelo de daño oxidativo inducido por Fe/Ascorbato en sinaptosomas, la actividad de la GPx no se altera; sin embargo, en el 2004, en un estudio acerca de la acumulación progresiva de hierro en cultivo de células neuronales, la actividad de esta enzima se incrementa de manera concentración-dependiente (Nuñez et al., 2004).

Nuestros resultados corroboran los obtenidos por el grupo de Nuñez y colaboradores, ya que al administrar el FeSO_4 aumentó drásticamente la actividad de esta enzima, por lo cual no se logró determinar el efecto de la α -mangostina sobre la actividad de la Gpx a ninguna concentración probada con FeSO_4 . Tal efecto del sulfato ferroso puede deberse en parte, a una respuesta adaptativa de la célula contra el estrés oxidativo inducido por el hierro.

El incremento en la actividad de la Gpx puede deberse también a la posible generación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por acción del FeSO_4 , el cual se reduce a H_2O_2 por acción de la SOD, y éste a su vez es reducido por acción de la Gpx. Este hecho fue anteriormente reportado por Nara y colaboradores (1999), quienes encontraron que al administrar FeCl_2 a células PC12 disminuyó la viabilidad celular e incrementó la PL, mientras que al administrar moléculas atrapadoras de radicales como MCLA y TEMPO (atrapadores de $\text{O}_2^{\bullet-}$), manitol (atrapador de $\bullet\text{OH}$) y DABCO (atrapador de $^1\text{O}_2$), solamente el MCLA y TEMPO lograron atenuar estos efectos, sugiriendo que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede estar jugando un papel importante en la toxicidad del hierro, aunque el mecanismo por el cual se genera este radical no está bien esclarecido.

Aunque no existen reportes que evidencien la eficiencia catalítica de la GPx, existen

varias enzimas que tienen una gran eficiencia catalítica, por lo cual tiene la capacidad de funcionar mejor con una menor cantidad de sustrato. Este hecho probablemente puede estar sucediendo en nuestros experimentos con la GPx, y por ello se observa una gran actividad enzimática, aunque se requieren más experimentos para poder sustentar esta hipótesis.

La GST es otra enzima que forma parte del sistema glutatión; su actividad cataliza la conjugación del GSH con una variedad de compuestos electrofílicos (Aoyama et al., 2008). De igual manera que con la GPx, las investigaciones relacionadas con el efecto de la α -mangostina *per se* sobre la actividad de la GST son nulos; sin embargo, hay reportes que evidencian una disminución en la actividad de la enzima en un modelo de estrés oxidativo al miocardio, y una recuperación en la actividad de dicha enzima a causa del pre-tratamiento con la mangostina (Devi Sampath et al., 2007).

Núñez y colaboradores (2004) investigaron el efecto del hierro sobre el contenido de GSH y enzimas detoxificadoras como la GST, encontrando que el hierro incrementa la actividad de esta enzima a concentraciones arriba de 10 μ M, y que a concentraciones de 1 a 5 μ M de Fe no se presenta un cambio significativo en la actividad de la enzima.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que en nuestro modelo y con la preparación utilizada, la GST no juega un papel importante debido a que en los experimentos realizados (α -mangostina y α -mangostina + Fe) no se observó un cambio significativo en su actividad y solamente en la concentración 500 μ M de la xantona se encontró una disminución significativa, sugiriendo un posible efecto nocivo por parte de la α -mangostina a esta concentración probada. El hecho de que la actividad de GST no mostrara cambios en su actividad con FeSO₄ puede deberse a que probablemente se requieran concentraciones más altas de hierro y tiempos más largos de tratamiento para poder alterar la actividad de esta enzima, probablemente por proteólisis.

Tal y como lo reporta la literatura, al realizar una comparación de nuestros 3 modelos

de daño neuronal, podemos decir que estas toxinas ejercen su daño por diferentes mecanismos (excitotóxico, déficit energético y pro-oxidante); sin embargo, los 3 mecanismos a diferente nivel desencadenan una respuesta de estrés oxidativo. Por otra parte, se sabe que el FeSO₄ actualmente es administrado por vía oral como tratamiento para personas anémicas, y que en este caso disminuye su potencial oxidativo debido a que es inmediatamente unido a proteínas transportadoras.

Por su parte, a la α -mangostina se le han atribuido una gran variedad de propiedades medicinales, entre las que destacan la anti-tumoral, anti-inflamatoria y anti-oxidante. En nuestro estudio es de vital importancia la actividad antioxidante que ejerció esta molécula frente a nuestros 3 modelos de daño oxidativo al reducir la lipoperoxidación, re-establecer la funcionalidad mitocondrial, y preservar los niveles de GSH, evidenciando de esta manera que el estrés oxidativo y nitrosativo juega un papel muy importante en dichos modelos.

El tratamiento con α -mangostina fue capaz de rescatar a los sinaptosomas de diversas alteraciones metabólicas, sugiriendo así su uso para evitar eventos de neurodegeneración. Es importante tener en cuenta que la preparación utilizada es una primera aproximación de lo que puede suceder a nivel sináptico; y sería de gran relevancia realizar investigaciones con diferentes preparaciones, tales como rebanadas, células e incluso en organismos enteros, los cuales involucran una mayor cantidad de factores, los cuales podrían estar participando en el mecanismo antioxidante de la α -mangostina. Por ello, es necesario que se realicen más estudios para poder elucidar el o los mecanismos moleculares por los cuales podría estar ejerciendo su efecto. Finalmente, esta xantona promete ser una herramienta útil e importante para diferentes retos farmacológicos en los modelos de daño neuronal.

10. Conclusiones

- Las fracciones sinaptosomales sometidas a 1 hora de incubación con las diferentes toxinas utilizadas como modelos de daño oxidativo muestran un alto grado de daño oxidativo producido por estas moléculas.
- La administración de la α -mangostina protege de la lipoperoxidación inducida por los 3 modelos probados de manera concentración-dependiente. Para el QUIN y el 3-NP disminuye la lipoperoxidación a niveles incluso por debajo del control, y con el FeSO_4 también reduce la lipoperoxidación sin llegar a niveles del control.
- El QUIN y el 3-NP disminuyen significativamente la funcionalidad mitocondrial de los sinaptosomas; por su parte la α -mangostina logró recuperar la capacidad reductora mitocondrial contra estas dos neurotoxinas.
- Los niveles de GSH disminuyen significativamente con la administración de las toxinas 3-NP y FeSO_4 , y la α -mangostina restableció los niveles de GSH en ambos modelos; sin embargo, para el 3-NP lo hizo incluso desde la concentración más baja utilizada (10 μM), mientras que para el FeSO_4 requirió de una concentración más alta (25 μM) para restablecer los niveles de GSH.
- La α -mangostina *per se* incrementa la actividad de la Gpx a partir de la concentración de 25 μM y mantiene este efecto con las concentraciones crecientes de la misma; la administración del FeSO_4 y FeSO_4 + α -mangostina de igual manera incrementaron la actividad de la Gpx, sugiriendo una posible respuesta adaptativa al estrés oxidativo/nitrosativo por parte de la célula.
- La enzima GST no juega un papel en nuestro modelo y condiciones probadas; posiblemente se requieran de otras concentraciones de hierro y tiempos mayores de incubación para poder observar algún efecto en la actividad de esta enzima.

11. Perspectivas

La investigación realizada es una primera aproximación al posible efecto neuroprotector de la α -mangostina, frente a 3 diferentes modelos que recrean eventos de daño neuronal por mecanismos distintos. Asimismo, este trabajo revela los posibles mecanismos mediante los cuales la α -mangostina estaría produciendo su efecto protector. Por ello es de gran importancia continuar haciendo estudios con esta molécula para terminar de elucidar el o los mecanismos a nivel bioquímico, molecular y celular, por los cuales actúa. Así, la α -mangostina se va convirtiendo en una herramienta útil e importante en el diseño de terapias antioxidantes a nivel experimental, en un campo tan relevante como lo es el manejo de alteraciones neurológicas.

12. Bibliografía

- Aoyama K., Suh S. A., Hamby A., Liu J., Chan W., Chen Y., Swanson R. "Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse" *Nat Neurosci*, **2006**, 9: 119-126.
- Aoyama K., Watabe M., Nakaki T. "Regulation of neuronal glutathione synthesis." *J Pharmacol Sci.*, **2008**, 108: 227-238.
- Beadle G. W., Mitchell H. K., Nyc J. F. "Kynurenine as an intermediate in the formation of Nicotinic acid from tryptophane by neurospora." *Proc Natl Acad Sci.*, **1947**, 33: 155-158.
- Binienda S., Simmons C., Hussain S., Slikker W., Syed F. A. "Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain" *Neurosci Lett.*, **1998**, 251: 173-176.
- Bonsi P., Cuomo D.; Martella G., Sciamanna G., Tolu M., Calabresi P., Bernardi G., Pisani A. "Mitochondrial toxins in basal ganglia disorders: from animal models to therapeutic strategies." *Curr Neuropharmacol.*, **2006**, 4: 69-75.
- Bordelon Y. M., Chesselet M. F., Nelson, D., Welsh F., Erecinska M. "Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum." *J Neurochem.*, **1997**, 69: 1629-1693.
- Borlongan C., Koutouzis T. K., Sanberg P. "3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease." *Neurosci Biobehav Rev.*, **1997**, 21: 289-293.
- Brouillet E., Condé F., Beal M. F., Hantraye P. "Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals" *Prog Neurobiol.*, **1999**, 59: 427-468.
- Carvalho L. P., Bochet P., Rossier J., "The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits" *Neurochem Int.*, **1996**, 28: 445-452
- Chairungrilerd N., Furukawa K., Ohta T., Nozoe S., Ohizumi Y. "Histaminergic and serotonergic receptor blocking substances from the medicinal plant *Garcinia mangostana*" *Planta Med.*, **1996**, 62: 471-472.
- Chakraborty H., Ray S. N., Chakrabarti S. "Lipid peroxidation associated protein damage in rat brain crude synaptosomal fraction mediated by iron and ascorbate" *Neurochem Int.*, **2001**, 39: 311-317.
- Chen L. G., Yang L. L., Wang C. C. "Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*." *Food Chem Toxicol.*, **2008**, 46: 688-693.
- Chomnawang M. T., Surassmo S., Nukoolkarn V. S., Gritsanapan W. "Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria." *J Ethnopharmacol*, **2005**, 101: 330-333.
- Chomnawang M. T., Surassmo S., Nukoolkarn V. S., Gritsanapan W. "Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*." *Fitoterapia*, **2007**, 78: 401-408.
- Chopra R. N., Nayar S. L., Chopra I. C. "Glossary of Indian Medicinal Plants." *The National Institute of Science Communication and Information Resources*, Nueva Delhi, India, **1956**, 122-123.
- Clancy R. M., Levartovsky D., Leszczynska-Piziak J., Yegudin J. "Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: Evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary" *Proc Natl Acad Sci.*, **1994**, 91: 3680-3684.
- Commandeur J. N., Stijntjes G. J., Vermeulen N. P. "Enzymes and Transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates" *Pharmacol rev.*, **1995**, 47(2): 271-330.

- Devi Sampath P. & Vijayaraghavan K. "Cardioprotective effect of α -Mangostin, a xanthone derivative from Mangosteen on tissue defense system against Isoproterenol-induced myocardial infarction in rats" *J Biochem Mol Toxicol.*, **2007**, 21: 336-339.
- Devi Sampath P. & Vijayaraghavan K. "Ameliorative prospective of alpha-mangostin, a xanthone derivative from *Garcinia mangostana* against β -adrenergic catecholamine-induced myocardial toxicity and anomalous cardiac TNF- α and COX-2 expressions in rats" *Exp Toxicol Pathol.*, **2008**, .
- Double K. L., Maywald M., Schmittel M., Riederer P., Gerlach M. "In vitro studies of ferretin iron release and neurotoxicity" *J Neurochem.*, **1998**, .
- Dringen R. "Metabolism and functions of glutathione in brain" *Prog Neurobiol.*, **2000**, 69: 649-671.
- Dringen R., Pawlowski P. G., Hirrlinger J. "Peroxide Detoxification by brain cells" *J Neurosci Res.*, **2005**, 79: 157-165.
- Du C. T., Francis F. J. "Anthocyanins of Mangosteen, *Garcinia mangostana*." *J Food Sci.*, **1977**, 42: 1667-1668.
- Du J., Gebicki J. M. "Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals" *Int J Biochem Cell Biol.*, **2004**, 36: 2334-2343.
- Ee G. C., Daud S., Taufiq-Yap YH., Ismail N. H., Rahman M. "Xanthones from *Garcinia mangostana* (*Guttiferae*)." *Nat Prod Res.*, **2006**, 20: 1067-1073.
- Fan C. & Su J. "Antioxidative mechanism of isolated components from methanol extract of fruit hulls of *G. Mangostana* L." *J Chin Agric Chem Soc.*, **1997**, 35: 540-551.
- Fernández C. J. & García R. C. "Glutati6n." *Radicales libres y estr6s oxidativo. Aplicaciones m6dicas*. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno **2008**, pp. 253-267.
- Forman H. J., Maiorino M., Ursini F. "Signaling Functions of Reactive Oxygen Species." *Biochemistry*, **2010**, 49: 835-842.
- Garcia V. V., Magpantay T. O., Escobin L. D. "Antioxidant potential of selected Philippine vegetables and fruits." *Philipp Agric Scient.*, **2005**, 88: 78-83.
- Garrity A. R., Morton G. A., Morton J. C. "Nutraceutical mangosteen composition." United States Patent, US, **2004**, 6,730,333 B1.
- Garnett M., Sturton D. "*Garcinia mangostana* in the treatment of amoebic dysentery." *Chin Med J.*, **1932**, XLVI: 969-973.
- Geiszt M. "NADPH oxidases: New kids on the block." *Cardiovasc Res.*, **2006**, 71: 289-299.
- González-Cortés C., Salinas-Lara C., Gómez-López M., Tena-Suck M., Pérez-De La Cruz V., Rembao-Bojórquez D., Pedraza-Chaverri J., Gómez-Ruiz C., Galván-Arzate S., Syed F. Santamaría A. "Iron porphyrinate Fe(TPPS) reduces brain cell damage in rats intrastriatally lesioned by quinolinate." *Neurotoxicol Teratol.*, **2008**,
- Gopalakrishnan G., Banumathi B., Suresh G. "Evaluation of the antifungal activity of natural xanthones from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives." *J Nat Prod.*, **1997**, 60: 519-524.
- Guzmán-Beltrán S., Orozco-Ibarra M., González-Cuahutencos O., Victoria-Mares S., Merchand-Reyes G., Medina-Campos O., Pedraza-Chaverri J. "Neuroprotective effect and reactive oxygen species scavenging capacity of Mangosteen pericarp extract in cultured neurons". *Curr Top Nutraceutical Res.*, **2008**, 6: 149-158.
- Habig W. H. & Jakoby H. B. "Glutathione S-Transferases (rat and human)" *Methods in enzymol.*, Academic Press, Inc. EUA, **1981**, 77: 218-235.
- Halliwell B. & Chirico S. "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance" *Am J Clin Nutr.*, **1993**, 57: 15S-25S.
- Halliwell B., J. M. "Free radicals in biology and medicine" Oxford University press, **1999**.

- Hansberg T. W. "El dióxígeno y sus especies reactivas." Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno **2008**, pp. 25-46.
- Harrison F. E. & May J. M. "Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2" *Free Radic Biol Med*, **2009**, 46: 719-730.
- Haruenkit R., Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Sajewicz M., Kowalska T., Delgado E., Rocha N.E., Gallegos J.A., Trakhtenberg S., Gorinstein S. "Comparative study of health properties and nutritional value of durian, mangosteen and snake fruit: Experiments in vitro and in vivo." *J Agric Food Chem.*, **2007**, 55: 5842-5849.
- Herrera-Mundo M. N., Silva-Adaya D., Maldonado P., Galván-Arzate S., Andrés-Martínez L., Pérez-De La Cruz V., Pedraza-Chaverri J., Santamaría A. "S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction" *Neurosci Res.*, **2006**, 56: 39-44.
- Heyes M. P., Lackner A. "Increased cerebrospinal fluid quinolinic acid, kynurenic acid and L-kynurenine in acute septicemia." *J Neurochem.*, **1990**, 55: 338-341.
- Hissin P. J. & Hilf R. "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues." *Anal Biochem.*, **1976**, 74: 214-226.
- Huang Y. L., Chen C. C., Chen Y. J., Huang R. L., Shieh B. J. "Three xanthenes and a benzophenone from *Garcinia mangostana*." *J Nat Prod.*, **2001**, 64: 903-906.
- Iinuma M., Tosa H., Tanaka T., Asai F., Kobayashi Y., Shimano R., Miyauchi K. I. "Antibacterial activity of xanthenes from *Guttiferae* plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Pharm Pharmacol.*, **1996**, 48: 861-865.
- Ji X, Avula B, Khan IA. "Quantitative and qualitative determination of six xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS." *J Pharm Biomed Anal.*, **2007**, 43: 1270-1276.
- Jung H. A., Su B. N., Keller W. J. Mehta R. G., Kinghorn D. "Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen)." *J Agric Food Chem.*, **2006**, 54: 2077-2082.
- Kehrer J. P. "The Haber- Weiss reaction and mechanisms of toxicity" *Toxicology*, **2000**, 149: 43-50.
- Kumar P., Kalonia H., Kumar A. "Protective effect of sesamol against 3-nitropropionic acid-induced cognitive dysfunction and altered glutathione redox balance in rats" *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **2010**, 1-6.
- Lapin I. P. "Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites" *Pharmacol Res Commun.*, **1978**, 10: 81-84.
- Lawrence R. A. & Burk R. F. "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver." *Biochem Biophys Res Commun.*, **1976**, 71: 952-958.
- Leipnitz G., Schumacher C., Scussiato K., Dalcin K. B., Wannmacher C. M. D., Wyse A., Dutra-Filho C., Wajner M., Latini A. "Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats" *Int. J. Dev Neurosci.*, **2005**, 23: 695-701.
- Leong L. P. & Shui G. "An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets." *Food Chem.*, **2002**, 79: 69-75.
- Less G. J. "The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia." *J Neurol Sci.*, **1993**, 114: 119-122.
- Liot G., Bossy B., Lubitz S., Kushnareva Y., Bossy-Wetzel E. "Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway" *Cell Death Differ.*, **2009**, 16: 899-909.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. "Protein measurement with the Folin-Phenol reagents." *J Biol Chem.*, **1951**, 193: 265-275.

- Ludolph, A.C., He F., Spencer P. S., Hammerstad J., Sabri M. "3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin." *Can J Neurol Sci.*, **1991**, 18: 492-498.
- Mahabusarakam W., Wiriyachitra P., Phongpaichit S. "Antimicrobial activities of chemical constituents from *Garcinia mangostana* Linn." *J Sci Soc Thailand.*, **1986**, 12: 239-242.
- Mahabusarakam W., Proudfoot J., Taylor W., Croft K. "Inhibition of Lipoprotein Oxidation by Prenylated Xanthenes Derived from Mangostin" *Free Radic Res.*, **2000**, 33:643-659.
- Márquez-Valadez B., Lugo-Huitrón R., Valdivia-Cerda V., Miranda-Ramírez R., Pérez-De La Cruz, González-Cuahutencos O., Rivero-Cruz I., Mata R., Sanatmaría A., Pedraza-Chaverrí J. "The Natural xanthone α -mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue" *Nutr Neurosci.*, **2009**, 12: 35-42.
- Matsumoto K., Akao Y., Kobayashi E., Ohguchi K., Ito T., Tanaka T., Iinuma M., Nozawa Y. "Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines." *J Nat Prod.*, **2003**, 66: 1124-1127.
- Matsumoto K., Akao Y., Ohguchi K., Ito T., Tanaka T., Iinuma M., Nozawa Y. "Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells." *Bioorg Med Chem.*, **2005**, 13: 6064-6069.
- Medeiros M. H. G. "Daño al ADN." Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno **2008**, pp. 119-134.
- Moongkarndi P., Kosem N., Lauratana O., Jongsomboonkusol S., Pongpan N. "Antiproliferative activity of Thai medicinal plants extracts on human breast adenocarcinoma cell line." *Fitoterapia*, **2004**, 75: 375-377.
- Moro M. A., Almeida A., Bolaños J. P., Lizasoain I. "Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke." *Free Radic Biol Med.*, **2005**, 39: 1291-1304.
- Morton J. "In: Fruits of warm climates, Mangosteen." *Creative Resource Systems Inc.*, Miami, USA., **1987**, 301-304.
- Nagy S., Shaw P. E. "Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses." *The Avi Publishing Company, Inc.* Florida, USA **1980**, pp. 407-414.
- Nakagawa Y., Iinuma M., Naoe T., Nozawa Y., Akao Y. "Characterized mechanism of α -mangostin-induced cell death: Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells." *Bioorg Med Chem.*, **2007**, 15: 5620-5628.
- Nakatani K., Atsumi M., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Nakahata N., Ohizumi Y. "Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant." *Biol Pharm Bull.*, **2002**, 25: 1137-1141.
- Nakatani K., Yamakuni T., Kondo N., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Inoue H., Ohizumi Y. " γ -Mangostin inhibits inhibitor-kappaB kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells." *Mol Pharmacol.*, **2004**, 66: 667-674.
- Nara K., Konno D., Uchida J., Kiuchi Y., Oguchi K. "Protective effect of nitric oxide against iron-induced neuronal damage" *J Neurotrans.*, **1999**, 106: 835-848.
- Núñez M. T., Gallardo V., Muñoz P., Tapia V., Esparza A., Salazar J., Speisky H. "Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells" *Free Radic Biol Med.*, **2004**, 37: 953-960.
- Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S., Chowwanapoonpohn S. "Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels." *Food Chem.*, **2007**, 103: 839-846.
- Pavlica S. & Gebhardt R. "Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PCL12 cells." *Free Radic Res.*, **2005**, 39:1377-1390.

- Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., Pérez-Rojas J. M. "Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*)" *Food Chem Toxicol.*, **2008**, 46: 3227-3239.
- Pedraza-Chaverri J., Reyes-Fermín L., Nolasco-Amaya E. G., Orozco-Ibarra M., Medina-Campos O. N., González-Cuahutencos O., Rivero-Cruz I., Mata R. "ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of α -mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons." *Exp Toxicol Pathol.*, **2009**, 61: 491-501.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. "Toxic effects of mycotoxins in humans." *Bull World Health Organ.*, **1999**, 77: 754-766.
- Pérez-De La Cruz V., González-Cortés C., Pedraza-Chaverri J., Maldonado P., Andrés-Martínez L., Santamaría A. "Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes." *Brain Res Bull.*, **2006**, 68: 379-383.
- Pérez-De La Cruz V. "Posible contribución del peroxinitrito en la neurotoxicidad por ácido quinolínico, un modelo experimental de la enfermedad de Huntington" *UNAM*, Tesis de Maestría, **2007a**, 1-107.
- Pérez-De La Cruz V., Santamaría A. "Integrative hypothesis for Huntington's disease: A brief review of experimental evidence." *Physiol Res.*, **2007b**, 56: 513-526.
- Pérez-De La Cruz V., Konigsberg M., Santamaría A. "Kynurenine pathway and disease: an overview." *CNS Neurol Disord Drug Targets.*, **2007c**, 6:398-410.
- Pérez-Severiano F., Escalante B., Ríos C. "Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity." *Neurochem Res.*, **1998**, 23: 1297-1302.
- Pinto M. M. M., Sousa M. E., Nascimento M. S. J. "Xanthone Derivatives: New Insights in Biological Activities" *Curr Med Chem.*, **2005**, 12: 2517-2538.
- Putnam C. D., Arvai A. S., Bourne Y., Tainer J. A. "Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism" *J Mol Biol.*, **2000**, 296: 295-309.
- Ribeiro C., Grando V., Dutra-Filho C., Wannmacher C., Wajner M. "Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats." *J Neurochem.*, **2006**, 99: 1531-1542.
- Ríos C. & Santamaría A. "Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates" *Neurochem Res.*, **1991**, 16: 1139-1143.
- Rodríguez-Martínez E., Camacho A., Maldonado P. D., Pedraza-Chaverri J., Santamaría D., Galván-Arzate S., Santamaría A. "Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum" *Brain Res.*, **2000**, 858: 436-439.
- Ryu J. K.; Kim S. U.; McLarnon J. G. "Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by piruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease." *Exp Neurol.*, **2004**, 187: 150:159.
- Sakagami Y., Iinuma M., Piyasena K. G. N. P., Dharmaratne H. R. W. "Antibacterial activity α -mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics." *Phytomedicine*, **2005**, 12: 203-208.
- Sas K., Robotka H., Toldi J., Vécsei L. "Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders" *J Neurol Sci.*, **2007**, 257: 221-239.
- Saldaña Y. B. "Potencial antioxidante de los α -tocoferoles." *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno, **2008**, pp. 291-301.
- Salvi A., Carrupt P. A., Tillement J. P., Testa B. "Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding."

Biochem Pharmacol., **2001**, 61: 1237-1242.

- Sampath P. D. & Vijayaragavan K. "Cardioprotective effect of α -mangostin, a xanthone derivate from Mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats." *J Biochem Mol Toxicol.*, **2007**, 21: 336-339.
- Sampath P. D. & Vijayaragavan K. "Ameliorative prospective of alpha-mangostin, a xanthone derivative from *Garcinia mangostana* against b-adrenergic catecholamine induced myocardial toxicity and anomalous cardiac TNF- α and COX-2 expressions in rats." *Experimental and Toxicologic Pathology*, **2008**, 60: 357- 364.
- Sanberg P. R., Calderon S. F., Giordano M., Tew J. M., Norman A. B. "The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor abnormalities." *Exp Neurol.*, **1989**, 105:45-53.
- Santamaría A. & Ríos C. "Mk-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum." *Neurosci Lett.*, **1993**, 159: 51-54.
- Santamaría A., Jiémez-Capdeville M. E., Camacho A., Rodríguez-Martínez E., Flores A., Galván-Arzate S. "In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum" *Neuroreport.*, **2001**, 12: 2693-2696.
- Santamaría A., Vázquez-Román B., Pérez-De La Cruz V., González-Cortés C., Trejo-Solís M. C., Galván-Arzate S., Jara-Prado A., Guevara-Fonseca J., Syed F. Ali. "Selenium reduces the proapoptotic signaling associated to NF- κ B pathway and stimulates glutathione peroxidase activity during excitotoxic damage produced by quinolinate in rat corpus striatum." *Synapse*, **2005**, 58: 258-266.
- Santamaría A. & Jiménez M. E. "Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview." *Free radicals and neurotoxicity*. **2005**, 4:1-19.
- Santamaría A. "Daño oxidativo y enfermedades neurodegenerativas." *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno **2008**, pp. 359-375.
- Santamaría D., Espinoza-González V., Ríos C., Santamaría A. "Nw-Nitro-L-Arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices" *Neurochem Res.*, **1999**, 24: 843-848.
- Sas K., Robotka H., Toldi J., Vécsei L. "Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders." *J Neurol Sci.*, **2007**, 257: 221-239.
- Schuck P., Tonin A., Ferreira G., Borba R., Latini A., Balestro F., Santos M., Milton C., Wannmacher D., Wyse A., Wajner M. "In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats" *Neurosci Res.*, **2007**, 57: 277-288.
- Schulz J., Matthews R. T., Klockgether T., Dichgans J., Flint-Beal M. "The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animals models of neurodegenerative disease" *Mol Cell Biochem.*, **1997**, 174: 193-197.
- Schwarcz R. & Köhler C. "Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid" *Neurosci Lett.*, **1983**, 38: 85-90.
- Shachar D. B., Kahana N., Kampel V., Warshawsky A., Youdim M. B. H. "Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats." *Neuropharmacology*, **2004**, 46:254-236.
- Shankaranarayanan D., Kameswaran L., Nazimudeen S. K. "Effect of Mangostin, a xanthone from *Garcinia mangostana* Linn in immunopathological & inflammatory reactions." *Indian J Exp Biol.*, **1979**, 18: 843-846.
- Silva-Adaya D., Pérez-De La Cruz V., Herrera-Mundo N. "Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine" *J Neurochem.*, **2008**, 105: 677-689.

- Southgate G. S., Daya S., Potgieter B. "Melatonin plays a role in quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat hippocampus" *J Chem Neuroanat.*, **1998**, 14: 151-156.
- Stohs S. J. & Bagchi D. "Oxidative Mechanisms in the toxicity of metal ions" *Free Radic Biol Med.*, **1995**, 18:321-336.
- Stone T. W., Perkins M. N. "Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS". *Eur J Pharmacol.*, **1981**, 72: 411-412.
- Stone T. W., "Endogenous neurotoxins from tryptophan" *Toxicon*, **2001**, 39: 61-73.
- Suksamrarn S., Suwannapoch N., Phakhodee W., Thanuhiranlert J., Ratananukul P., Chimnoi N., Suksamrarn A. "Antimycobacterial Activity of Prenylated Xanthenes from the Fruits of *Garcinia mangostana*." *Chem Pharm Bull.*, **2003**, 51: 857-859.
- Suksamrarn S., Komutiban O., Ratananukul P., Chimnoi N., Lartpornmatulee N., Suksamrarn A. "Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*" *Chem Pharm Bull.*, **2006**, 54: 301-305.
- Sultanbawa M. U. S. "Xanthonoids of Tropical Plants." *Tetrahedron Rep.*, **1980**, 36: 1465-1506.
- Sundaram B. M., Gopalakrishnan C., Subramanian S., Shankaranarayanan D., Kameswaran L. "Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*." *Planta Med.*, **1983**, 48: 58-60.
- Swathy S. S. & Indira M. "The Ayurvedic drug, Ksheerabala, ameliorates quinolinic acid-induced oxidative stress in rat brain" *Int J Ayurveda Res.*, **2010**, 1: 4-9.
- Tachakittirungrod S., Okonogi S., Chowwanapoonpohn S. "Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract." *Food Chem.*, **2007**, 103: 381-388.
- Túnez I., Montilla P., Muñoz M. C., Drucker-Colín R. "Effect of nicotine on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes" *Eur J Pharmacol.*, **2004**, 504: 169-175.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Mol Cell Biochem.*, **2004**, 266:37-56.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol.*, **2007**, 39: 44-84.
- Viera L. M. M. & Kijjoa A. "Naturally-Ocurring Xanthenes: Recent Developments" *Curr Med Chem.*, **2005**, 12: 2413-2446.
- Voravuthikunchai S. P. & Kitpipit L. "Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clin Microbiol Infec.*, **2005**, 11: 510-512.
- Wan A. S. C. "*Garcinia Mangostana*: High resolution NMR studies of mangostin." *Planta Méd.*, **1973**, 24: 297-300.
- Weecharangsan W., Opanasopit P., Sukma M., Ngawhirunpat T., Sotanaphun U., Siripong P. "Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn)." *Med Prin Pract.*, **2006**, 15: 281-287.
- Whetsell W. O., Schawrcz R. "Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system" *Neurosci Lett.*, **1989**, 97: 271-275.
- Whittaker J. W. "Metal uptake by manganese superoxide dismutase" *Biochim Biophys Acta.*, **2010**, 1804: 298-307.
- Williams P., Ongsakul M., Proudfoot J., Croft K., Beilin L. "Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein." *Free Radic Res.*, **1995**, 23:175-184.
- Winterbourn C. C. & Metpdiewa D. "The reaction of Superoxide with Reduced Glutathione" *Arch Biochem Biophys.*, **1994**, 314(2): 284-290.
- Xie C., Lovell M. A., Markesbery W. R. "Glutathione Transferase protects neuronal cultures

- against four Hydroxynonenal toxicity" *Free Radic Biol Med.*, **1998**, 25(8): 979-988.
- Yamakuni T., Aoki K., Nakatani K., Kondo N., Oku H., Ishiguro K., Ohizumi Y. "Garcinone B reduces prostaglandin E2 release and NF-kappaB-mediated transcription in C6 rat glioma cells." *Neurosci Lett.*, **2006**, 394: 206–210.
- Yates P. & Stout G. H. "The Structure of Mangostin." *J Am Chem Soc.*, **1958**, 80:1691-1700.
- Yoshikawa M., Harada E., Miki A., Tsukamoto K., Si Qian L., Yamahara J., Murakami N. "Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in Vietnam." *Yakugaku Zasshi*, **1994**, 114: 129–133.
- Zentella M. & Piña E. "Daño a proteínas." *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno, **2008**, pp. 97-118.
- Zenteno S. T. & Saldaña B. Y. "Daño a lípidos." *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editor Konigsberg Fainstein M. Ed. Manual Moderno, **2008**, pp. 135-146.