



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El pretratamiento con el antioxidante bifuncional curcumina induce Nrf2 y una respuesta citoprotectora contra el daño oxidante por hemina: papel de hemo-oxigenasa-1 y glutatión

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Susana González Reyes

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri  
Facultad de Química (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Clorinda Arias Alvarez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)  
Dr. Wilhelm Hansberg Torres  
Instituto de Fisiología Celular (UNAM)

CD.MX., 2014



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.

## RESUMEN

La curcumina es un difenol con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. El uso de antioxidantes de origen natural se ha presentado como una alternativa para combatir enfermedades relacionadas con daño oxidante. La curcumina presenta baja toxicidad pero su uso en la práctica clínica es limitado por su rápido metabolismo en el organismo. La curcumina es un antioxidante bifuncional, puede actuar de manera directa al atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS) y de forma indirecta al inducir enzimas antioxidantes. La descripción y comprensión de los mecanismos de acción de la curcumina, principalmente en su actividad antioxidante podrían ayudar en el uso informado de las condiciones para la prevención del daño oxidante en los organismos.

En este proyecto se propone investigar el efecto de la curcumina ante el estrés oxidante generado con la hemina y si el sistema antioxidante celular es inducido en este proceso en neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC).

Las NGC se incubaron con diferentes concentraciones de curcumina por 24 h y se mostró que de 5 a 30  $\mu\text{M}$  no se afecta la viabilidad celular. La curcumina causó un aumento en el contenido de hemo oxigenasa-1 (HO-1), una enzima importante en la protección celular, y también de los niveles de glutatión (GSH) dependiente de la concentración y del tiempo. La hemina disminuyó alrededor del 50% la viabilidad celular y aumentó en 55% la producción de ROS.

Cuando las NGC se incubaron con curcumina 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  antes de exponerlas por 1 h con la hemina se observó la prevención de la muerte celular (45, 47 y 49%, respectivamente) y de la producción de ROS (63, 59 y 59 %, respectivamente).

El uso de inhibidores del sistema hemo oxigenasa (HO) con mesoporfirina de estaño (SnMP) y de la  $\gamma$ -glutamil cisteína ligasa con la butionina sulfoximina (BSO) evitó la protección por curcumina en la viabilidad celular.

Las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD) aumentaron (1.4, 2.3 y 5.2 veces, respectivamente) en las NGC incubadas por 24 h con curcumina 15  $\mu\text{M}$  y se mantuvieron con la pre-incubación de curcumina antes de la hemina. El factor de transcripción Nrf2 se trasladó al núcleo y se activó después de la incubación por 24 h con curcumina. La mezcla curcumina-hemina mantuvo activo a Nrf2.

Los resultados sugieren que la curcumina, como antioxidante indirecto, confiere protección a las NGC ante el estrés oxidante provocado por hemina al estimular las actividades de los sistemas antioxidantes enzimático (HO-1, GR, GST y SOD) y no enzimático (contenido de GSH), además que el factor de transcripción Nrf2 tiene una función importante en este mecanismo.

## ABREVIATURAS

ROS: especies reactivas de oxígeno

NGC: neuronas granulares de cerebelo

HO-1: hemo oxigenasa 1

CO: monóxido de carbono

GSH: glutatión

GSSG: disulfuro de glutatión

Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-|2-il)]-2,5-difenil-tetrazolio

FDA: diacetato de fluoresceína

Carboxi-DCF: 5-(and 6-) carboxi-2,7-diclorofluoresceína

SnMP: mesoporfirina de estaño

BSO: butionina sulfoximina

NBT: nitroazul de tetrazolio

2-VP: 2-vinilpiridina

DTNB: 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico)

GR: glutatión reductasa

GST: glutatión S-transferasa

SOD: superóxido dismutasa

## Tabla de contenido

### **ANTECEDENTES**

---

ESTRÉS OXIDANTE Y DEFENSA CELULAR	1
HEMINA	3
SISTEMA HEMO OXIGENASA	4
GLUTATIÓN	8
CURCUMINA	10
NRF2	15
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	17

### **OBJETIVOS**

---

GENERAL	18
PARTICULAR	18

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

TÉCNICAS FLUORESCENTES DE ATRAPAMIENTO DE ESPECIES REACTIVAS	19
CULTIVOS PRIMARIOS DE NGC	21
VIABILIDAD CELULAR	22
TRATAMIENTO DE NGC CON CURCUMINA ANTES DE HEMINA	23
EXPRESIÓN DE HO-1	24
CONTENIDO DE GSH	25
ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	27
INMUNOCITOQUÍMICA PARA NRF2	27
EXTRACCIÓN DE NÚCLEOS Y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NRF2	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29

### **RESULTADOS**

---

CAPACIDAD ATRAPADORA DE ESPECIES REACTIVAS POR CURCUMINA	29
MODELO OXIDANTE CON HEMINA	30
EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR	33
EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE NGC	
HO-1	38
GSH	41
GR, GST, SOD	43
EFECTO DE CURCUMINA SOBRE NRF2	44

### **DISCUSIÓN**

---

### **CONCLUSIÓN**

---

### **PERSPECTIVAS**

---

### **REFERENCIAS**

---

## ANTECEDENTES

### **Estrés oxidante y defensa celular.**

Los antioxidantes son moléculas que interaccionan y neutralizan moléculas reactivas y radicales libres, previendo el daño oxidante. Los antioxidantes pueden ser definidos como cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuyen o detienen la oxidación del sustrato significativamente (Azzi *et al.*, 2004; Rochette *et al.*, 2013).

El término estrés oxidante se refiere a una situación de desequilibrio, con un aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes. Este concepto no es sinónimo de daño, debido a que diversos fenómenos fisiológicos requieren un alto nivel de oxígeno y esto conlleva a un estado de estrés temporal o adaptativo que es un proceso reversible, mientras que el daño oxidante es irreversible (Konigsberg, 2008).

El metabolismo normal genera radicales y otras especies que son más reactivas que el oxígeno diatómico (ROS, por sus siglas en inglés) y son parte de varios procesos fisiológicos incluidos rutas de transducción de señales (ej. los relacionados con algunos factores de crecimiento, citocinas y señalización de calcio). Cuando el estrés oxidante excede la capacidad celular de terminar o neutralizar las ROS aparece el daño oxidante que afecta a la célula o la membrana de los organelos directamente (a través de lipoperoxidación). Las ROS también pueden reaccionar con metales, nitrógeno o carbono para formar intermediarios que reaccionan con proteínas (reacciones de nitración, carbonilación y nitrosilación) (Barone *et al.*, 2014).

El cerebro es extremadamente sensible al estrés oxidante debido a sus elevados niveles de ácidos grasos, el alto requerimiento de oxígeno, el bajo sistema antioxidante y el alto contenido de hierro (Markesbery, 1997). Las ROS incluyen tanto radicales libres, moléculas que tienen al menos un electrón desapareado, así como formas no radicales. Los organismos producen varios tipos de ROS, por ejemplo en la cadena de transporte de electrones (Franklin, 2011). Las ROS, incluidos el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los radicales anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) y

peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas (Barone *et al.*, 2014).

Los organismos aerobios se defienden de las ROS a través de mecanismos de detoxificación tanto enzimáticos como no enzimáticos. La defensa enzimática involucra enzimas antioxidantes [ej. superóxido dismutasas (SOD), catalasas y peroxidasas] y los antioxidantes no enzimáticos que son moléculas de bajo peso molecular, como la vitamina E, la vitamina C, el glutatión (GSH), la ubiquinona, el  $\beta$ -caroteno, etc. (Kalyanaraman, 2013). Existe además otra clasificación de antioxidantes que comprende los términos directo e indirecto. El antioxidante directo se refiere a la capacidad *per se* de la molécula para atrapar ROS. El antioxidante indirecto es la molécula que tiene la habilidad de inducir la expresión de genes (por ejemplo vía los elementos de respuesta antioxidante (ARE) presentes en la región promotora de un gran número de enzimas de detoxificación, también llamadas de fase 2). Los ARE y el factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2) son esenciales para la inducción o la expresión constitutiva de las enzimas antioxidantes (Azzi *et al.*, 2004; )

Los antioxidantes bifuncionales muestran la habilidad de ser directos e indirectos, los polifenoles se encuentran en esta definición. Las propiedades oxidantes de compuestos polifenólicos como por ejemplo la curcumina o las catequinas pueden ser tanto antioxidantes como prooxidantes basadas en la estructura particular de cada polifenol y del contexto redox celular que pueda incluir un aumento en las cantidades de moléculas atrapadora de oxidantes o por disminuir los niveles de proteínas y lípidos oxidados (Kim *et al.*, 2014).

La respuesta al estrés celular puede involucrar la activación de rutas de supervivencia bajo el control de genes protectores (también llamados vitagenes) que producen moléculas con características antioxidantes y antiapoptóticas, por ejemplo, proteínas de choque térmico (HSP), GSH y bilirrubina (Calabrese *et al.*, 2010).

Un concepto extendido recientemente es el de hormesis, que se define como la respuesta que depende de la dosis en la que se observa una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas. La respuesta adaptativa no solo aumenta la supervivencia por

conferir resistencia al estrés ambiental, sino que también representa una vía para regular la asignación de recursos biológicos para asegurar la estabilidad celular y del organismo (Calabrese *et al.*, 2010).

Cuando el organismo es incapaz de contrarrestar el estrés oxidante se da un daño celular. Las moléculas pro-oxidantes, que por su estructura son capaces de desestabilizar al sustrato por ejemplo la membrana plasmática. La hemina es una neurotoxina y se abundará sobre su importancia en combatir el daño oxidante.

### **Hemina**

La hemoglobina tiene cuatro grupos hemo que consisten de un anillo de porfirina con el Fe en el centro. Después de una hemorragia intracerebral, los eritrocitos del hematoma se lisan y se libera la hemoglobina la cual se degrada a hemina ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La concentración de hemoglobina en la sangre es de aproximadamente 2.5 mM, lo cual llega a producir 10 mM de hemina (Robinson *et al.*, 2009). En exceso la hemina es una neurotoxina potente que cataliza directamente la reacción en cadena de la formación de radicales libres (Chen-Roetling *et al.*, 2014).

La hemina por su naturaleza lipofílica y su carga neta positiva puede unirse a la membrana plasmática de las células y de esa manera no requiere de transportadores y chaperonas específicas. Una condición importante para evitar que la hemina genere daño dentro de la célula consiste en que se una con la albumina para facilitar la fagocitación por los macrófagos (Robinson *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la hemina puede entrar a la célula mediante la unión a la proteína hemopexina, que es una glicoproteína con 60 kDa de peso, la cual tiene una gran afinidad por los grupo hemo y se une a la hemina en una relación equimolar, esta ruta es la mejor caracterizada (Muller-Eberhard, 1988; Tolosano & Altruda, 2002). El complejo de la hemina-hemopexina se une a los receptores de las lipoproteínas de baja densidad, con lo que se induce la endocitosis del complejo y del receptor. La hemina es entonces liberada en el citoplasma mientras que la hemopexina es retenida en las vesículas endocíticas y es llevada al espacio extracelular (Robinson *et al.*, 2009). Un mecanismo alternativo de

entrada para la hemina, es por la vía del transportador de grupos hemo (HCP1) el cual fue inicialmente encontrado en el transporte de hemina en las células intestinales (Shayeghi *et al.*, 2005). Recientemente se estudió que los cultivos primarios de NGC expresan el HCP1 y de esta forma se contribuye con la acumulación de la hemina en el interior de la célula (Dang *et al.*, 2011a).

En disolución acuosa, la hemina cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  con una cinética similar a la de la catalasa, lo que indica el potencial poder de hemina para degradar al  $H_2O_2$ . También tiene actividad de peroxidasa con la presencia de agentes reductores (Robinson *et al.*, 2009). Dentro de la célula la hemina es degradada por el sistema hemo oxigenasa (HO). La hemina interacciona con GSH y de este compuesto obtiene los electrones necesarios para llevar a cabo la reacción de descomposición por el sistema HO, algunos radicales como  $O_2^{\cdot-}$  y singulete de oxígeno son subproductos de la misma (Kremer, 1989).

El rompimiento de la hemina por las enzimas del sistema HO, liberan Fe el cual puede aumentar el estrés oxidante, principalmente por la reacción de Fenton, si no es rápidamente secuestrado o exportado. El Fe no unido puede ser almacenado en la ferritina, la cual cuando se satura y es degradada a hemosiderina eventualmente en los lisosomas, la cual es inerte en el sentido redox (Halliwell, 2007).

El papel del sistema HO en la toxicidad de la hemina se abordará en el siguiente punto.

### **Sistema hemo oxigenasa (HO)**

Este es uno de los sistemas citoprotectores principales, conservado evolutivamente cuya regulación representa un evento temprano en la respuesta adaptativa al estrés pues además de degradar al grupo hemo evitando la toxicidad, tiene otras funciones celulares muy relevantes (Poon *et al.*, 2004, Barone *et al.*, 2014).

En los humanos y los roedores existen dos isoenzimas de HO, hemo oxigenasa-1 (HO-1) con un peso aproximado de 32 kDa y hemo oxigenasa-2 (HO-2) con 36 kDa. Ambas son codificadas por dos genes diferentes y se ha descrito un tercer gen que codifica para la

isoenzima HO-3 aunque algunos lo consideran como un pseudogen sin función codificante que, sin embargo, puede tener una función reguladora y con ello tener efecto biológico (Gozzelino *et al.*, 2010; Pink *et al.*, 2011).

La HO-1, también conocida como HSP 32, es inducida por diversos estímulos, incluidos el estrés oxidante y nitrante, isquemia, choque térmico, lipopolisacárido bacteriano, hemina y varios fármacos que se usan actualmente en la clínica, como los antiinflamatorios no esteroideos, estatinas, ciclosporina A y antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Maines & Panahian 2001; Martin *et al.*, 2004). La HO-2 es la isoforma constitutiva aunque responde a los glucocorticoides adrenales, algunos factores de crecimiento y óxido nítrico (NO) (Maines, 1997).

En condiciones basales, la HO-1 está regulada finamente a nivel génico a través del represor transcripcional Bach 1. En condiciones pro-oxidantes, la HO-1 tiene una sobrerregulación tanto a niveles de gen como de proteína. El gen de la HO-1 posee dos regiones enhancer río arriba, E1 y E2 que contienen múltiples elementos de respuesta al estrés, conocidos también como elementos de respuesta antioxidante (ARE). Los ARE comparten secuencias consenso (GCnnnGTA) con los elementos de reconocimiento a Maf (MARE). Para la inducción de HO-1 la interacción de MARE con los heterodímeros de las proteínas Maf (MafK, MafG, MafF), con Nrf2 o con el activador de proteína 1, Fig 1. (Maines, 2005; Barone *et al.*, 2014).

El sistema HO cataliza la reacción de descomposición del grupo hemo, una molécula prooxidante, promoviendo la formación equimolar de monóxido de carbono (CO) (antiapoptótico), hierro (Fe) (prooxidante) y biliverdina (antioxidante). Esta última es rápidamente convertida en bilirrubina (antioxidante) por la biliverdina reductasa (Choi & Alam, 1996).

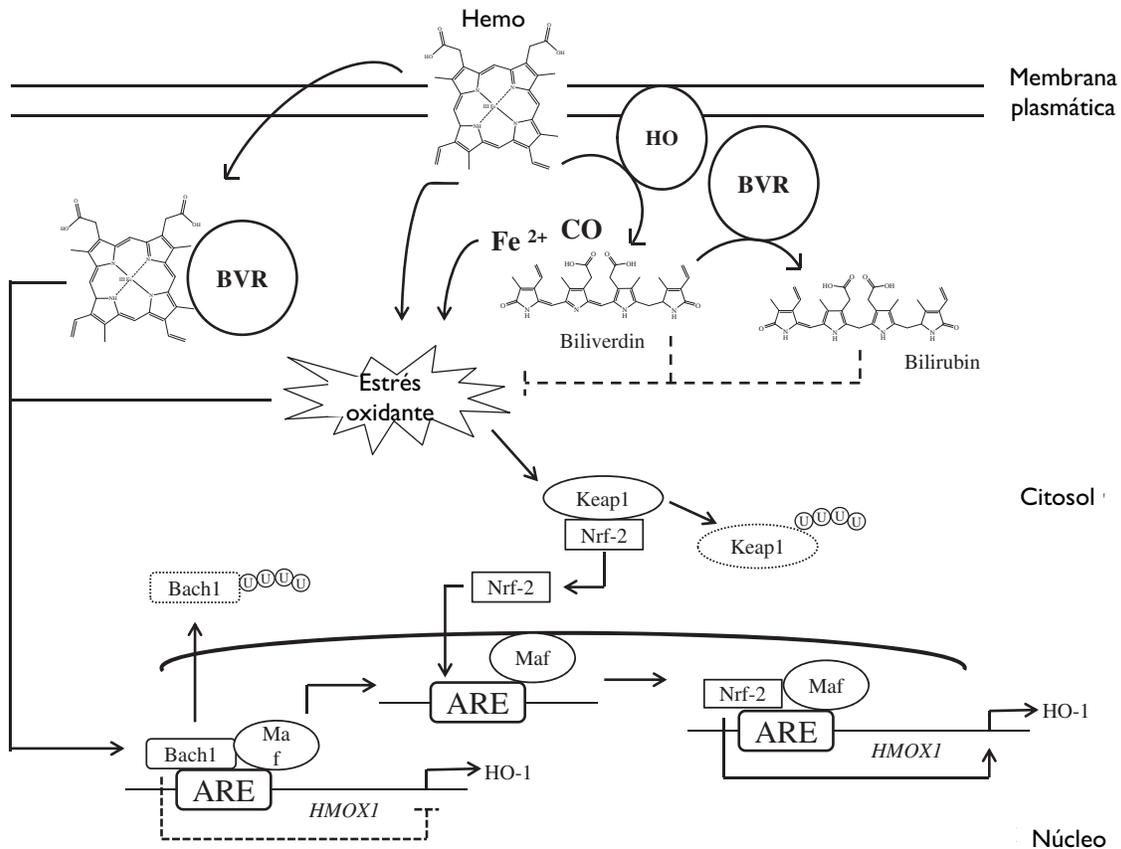


Fig 1. Sistema HO, productos de la reacción de degradación e interacción con el factor Nrf2 y Bach 1. (Barone *et al.*, 2014). El grupo hemo entra a la célula y por la actividad de HO se generan CO, biliverdina-bilirrubina y Fe. Este último puede generar estrés oxidante que permitirá que Nrf2 se separe de Keap 1 y sea trasladado al núcleo, donde se une a las secuencias ARE para llevar a cabo la expresión de genes de enzimas antioxidantes, en este caso HO-1.

Aunque la HO-1 y la HO-2 comparten la misma actividad, estas isoformas tienen diferentes papeles en la protección de los tejidos contra el daño. La hipótesis más convincente es que la inducción controlada de HO-1 está presente en la respuesta celular inicial en el daño. Por otra parte, la HO-2 es expresada constitutivamente y se involucra principalmente en el mantenimiento de la homeostasis del grupo hemo y en el censo de los niveles intracelulares de compuestos gaseosos tales como oxígeno, NO y CO (Maines, 2005).

## ***Subproductos del sistema HO***

### *Monóxido de carbono (CO)*

En algunos modelos experimentales el CO ejerce citoprotección, algunos de ellos son: la potenciación a largo plazo del hipotálamo, la liberación de neuropéptidos, la relajación gastrointestinal no adrenérgica, el tono de los vasos, la función renal y en procesos inflamatorios (Barone *et al.*, 2014). El CO producido en el hipotálamo de rata después de la actividad de HO tuvo actividad antiinflamatoria que se evidenció con la atenuación de la liberación de la interleucina 1- $\beta$  inducida por KCl (Mancuso *et al.*, 1998).

También se ha visto que el CO produce efectos tóxicos en ciertos órganos incluido el cerebro. La naturaleza dual de CO depende de varios factores como son el tipo celular, la cantidad de CO formado o liberado a la célula así como la ruta de señalización tejido-específico (Barone *et al.*, 2014).

### *Hierro (Fe)*

El Fe es el cofactor de varias enzimas y es capaz de modular funciones específicas en el cerebro al aumentar el recambio y liberación de la dopamina y otros neurotransmisores (Chiueh, 2001). Al mismo tiempo, el Fe<sup>2+</sup> liberado por la actividad de HO puede catalizar la producción de ROS a través de la reacción de Fenton y actuar de esta manera como un citotóxico pro-oxidante. Por otra parte, el Fe<sup>2+</sup> puede inducir diferentes rutas metabólicas como son la sobrerregulación de la bomba de Fe y la de la cadena de ferritina H con el efecto final de neutralizar la actividad pro-oxidante del Fe (Gozzelino *et al.*, 2010).

### *Biliverdina-bilirrubina*

La biliverdina es probablemente el producto de la actividad de HO menos estudiada debido esencialmente a su alto catabolismo una vez formada dentro de la célula. La biliverdina es reducida inmediatamente a bilirrubina, por lo que su relevancia fisiológica no es clara.

La bilirrubina es un tetrapirrol lineal caracterizado por ser lipofílico, tiene un papel antioxidante y propiedades antinitrosativas que han sido ampliamente estudiadas (Dore

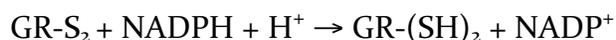
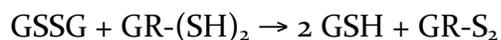
*et al.*, 1999; Mancuso *et al.*, 2003). No obstante su compartamiento antioxidante, si la bilirrubina se produce en exceso, como en la anemia hemolítica o en la sepsis, la bilirrubina no conjugada se vuelve neurotóxica por múltiples mecanismos que involucran la disrupción de la estructura de la membrana celular, la reducción del potencial de membrana y la activación de la cascada apoptótica (Brito *et al.*, 2004).

## **Glutación (GSH)**

El GSH es uno de los antioxidantes solubles más abundantes encontrados en el cerebro y se ha establecido que hay una disminución de este compuesto con la presencia de estrés oxidante (Mytilineou *et al.*, 2002). El GSH es un tiol tripéptido que se encuentra en altas concentraciones en todas las células. Se sintetiza enzimáticamente en el citosol a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. La  $\gamma$ -glutamil cisteína ligasa ( $\gamma$ -GCL) lleva a cabo el primer paso en la biosíntesis y constituye un paso limitante, dependiente de ATP y de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . El segundo paso en la síntesis de GSH está catalizado por la enzima glutación sintetasa (Konigsberg, 2008).

Dentro de las funciones biológicas que tiene el GSH se encuentran la detoxificación de electrófilos de Michael y metales, el mantenimiento del estatus de los tioles (relación GSH/GSSG), reservorio de cisteína y su función antioxidante (Fernández-Checa *et al.*, 1998, Konigsberg, 2008).

Durante la detoxificación de peróxidos el GSH es oxidado a GSSG. Esta reacción es catalizada por la glutación peroxidasa (aunque su contribución en el cerebro no es marcada). La glutación reductasa (GR) es la enzima que cataliza la conversión de GSSG a GSH por medio de las siguientes reacciones:



En donde GR-(SH)<sub>2</sub> y GR-S<sub>2</sub> corresponden a las formas reducidas (ditiol) y oxidadas (disulfuro) de la GR, respectivamente. Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH (Schulz *et al.*, 2000). La glutatión S-transferasa (GST) forma los glutatión S-conjugados durante la detoxificación de peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos (Dolphin *et al.*, 1989).

El GSH tiene un papel importante en el sistema nervioso central. La reducción en el contenido de GSH en diferentes áreas del cerebro humano se ha encontrado en algunas enfermedades como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, epilepsia y en modelos murinos en la enfermedad de Huntington (Dringen & Hirrlinger, 2003; Ramassamy *et al.*, 2000; Jenner, 1994). Hasta el momento no se sabe si la disminución en el contenido de GSH en el cerebro con alguna patología es debido a la síntesis insuficiente o al elevado consumo del GSH. La desregulación en el metabolismo así como la exportación de GSSG de las células del cerebro durante el estrés oxidante puede contribuir a la reducción en los niveles de GSH en una enfermedad cerebral (Dringen & Hirrlinger, 2003).

Los niveles de GSH en el cerebro son menores que en otros órganos y disminuyen con la edad. Los niveles basales de GSH en las neuronas son notablemente menores que en los astrocitos, microglia y oligodendrocitos, lo que indica que hay diferentes mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis de GSH entre neuronas y células gliales (Aoyama *et al.*, 2012).

En un modelo de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC) se observó la importancia del mantenimiento de los niveles de GSH mitocondrial para evitar la muerte celular. Se bloqueó la síntesis de GSH, lo que no aumentaba la producción de ROS, pero tanto la disminución de los niveles mitocondriales y los niveles citoplasmáticos de GSH aumentaban los niveles de ROS e inducían una rápida pérdida de la función mitocondrial con la subsecuente muerte por necrosis sin una marca de proceso de muerte por apoptosis (Wüllner *et al.*, 1999).

## Curcumina

Dentro de la clasificación de los antioxidantes la curcumina presenta una bifuncionalidad, ser un agente directo e indirecto. A continuación se abordarán aspectos importantes de la curcumina.

El rizoma seco de la planta *Curcuma longa*, también llamada turmérico, pertenece a la familia de las Zingiberaceae y es ampliamente cultivado en el sudeste de Asia. El turmérico es usado desde hace varios siglos en la cocina, en la medicina, como cosmético y colorante. En occidente este compuesto se usa como colorante, saborizante y conservador alimentario aceptado por la Food and Drug Administration (Aggarwal *et al.*, 2007). El turmérico contiene del 60-70% de carbohidratos, 8.6% de proteína, 5% de grasas, 2-7% de fibra, 3-5% de curcuminoides (50-70% de curcumina) y alrededor del 5% de aceites esenciales y resinas (Trujillo *et al.*, 2013).

### *Características físico-químicas*

La curcumina es un compuesto naranja-amarillo. La curcumina es un difenol de bajo peso molecular (368.37 g/mol), conocido como diferuloilmetano y su nombre de acuerdo a la IUPAC es [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona]. Es el constituyente más activo del turmérico. La curcumina es insoluble en agua, los solventes usados para solubilizarla son acetona, dimetilsulfóxido y etanol. La curcumina grado comercial contiene alrededor de 80% de este compuesto (Sharma *et al.*, 2005).

Químicamente, la curcumina es una molécula de diferuloil metano, esto es, tiene dos residuos de ácido ferúlico unidos por un metileno. La curcumina entra en tautomerismo ceto-enol (Fig. 2). El tautomerismo le confiere a este compuesto propiedades químicas adicionales. La forma enol permite que esa sección de la molécula pueda tanto aceptar como donar hidrógenos, además que la hace un quelante de metales cargados positivamente, los que a menudo se encuentran en el sitio activo de las proteínas blanco. El tautomerismo ceto-enol de la curcumina permite que actúe como un aceptor de

Michael en los reacciones nucleofílicas. Se ha propuesto que la curcumina se une covalentemente a las cisteínas y a las selenocisteínas (Gupta *et al.*, 2011).

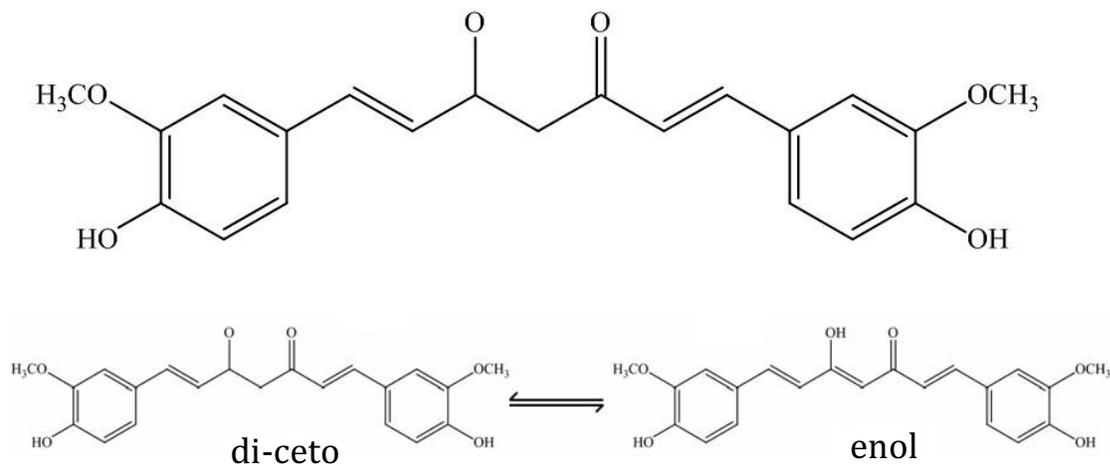


Fig. 2 Estructura de la curcumina y sus formas ceto-enol.

La cantidad de ceto-enol-enolato de la mitad heptadienona en equilibrio tiene un papel importante en las propiedades físico-químicas y la actividad antioxidante de la curcumina. En condiciones ácidas a neutras (ej. pH 3-7) la forma más abundante es la de bis-ceto donde la curcumina actúa como potente donador de protones. Esto es atribuible a la presencia de un átomo de carbono altamente activado en la unión entre los anillos 2-metoxi de la forma bis-ceto de la curcumina. Por otra parte, en condiciones de pH mayor a 8, donde la forma de enolato de la cadena heptadienona predomina, la curcumina actúa entonces como un aceptor de electrones. La presencia de la curcumina en forma enolato es importante para su capacidad atrapadora de radicales (Lee *et al.*, 2013).

En condiciones de cultivo celular, la curcumina es más estable en el medio con 10% de suero fetal y en sangre humana. Menos del 20% de la curcumina se descompone en 1 h y después de la incubación por 8 h alrededor del 50% de la curcumina aún permanece como tal. El producto mayoritario de degradación de la curcumina es una biciclo-pentadiona con dos átomos de oxígeno insertados en la cadena heptadienona que conecta con los anillos fenólicos (Griesser *et al.*, 2011) y los productos minoritarios son la

vainillina, el ácido férulico y el feruloil metano (Wang *et al.*, 1997). Aunque el mecanismo de transformación de la curcumina no está dilucidado completamente, se reconoce que la transformación autooxidativa es una de las rutas de peroxidasa y oxigenasa mediada en la degradación de la curcumina (Gordon & Schneider, 2012).

La curcumina es un atrapador de ROS y de especies reactivas de nitrógeno (Kunchandy & Rao, 1990; Sreejayan & Rao, 1997; Jovanovic *et al.*, 2001; Barzegar & Moosavi-Movahedi 2011). Inhibe la producción de NO• al regular negativamente la expresión génica de la óxido nítrico sintasa. La curcumina inhibe las enzimas de la fase I, el sistema que consiste de las isoformas de la citocromo P450, la P450 reductasa y la citocromo b5, y protege así de los efectos tóxicos de algunos químicos y carcinógenos (Sa & Das, 2008).

### *Propiedades clínicas*

La baja biodisponibilidad de la curcumina es el mayor inconveniente en el uso terapéutico de este compuesto. Durante años se han realizado varios esfuerzos para mejorar la baja absorción y los niveles en el suero, la alta tasa de metabolización y la rápida eliminación del sistema. En un gran número de estudios se ha demostrado que las concentraciones en plasma de curcumina administrada vía oral o intraperitoneal son muy bajas, en el orden de nanomolar (Lee *et al.*, 2013).

La curcumina se ha considerado como un compuesto poco tóxico y ya se ha evaluado su capacidad de proteger en diversos modelos de daño, por ejemplo: propiedades anti-inflamatorias (Sikora *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2007; Sandur *et al.*, 2007), así como en la prevención de la tumorogénesis y la mutagénesis al bloquear la formación de aductos carcinógeno-DNA (Ravindran *et al.*, 2009), además de inhibir la angiogenesis (Huang *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998; Mukundan *et al.*, 1993). El estudio de la curcumina para prevenir el cáncer ha ido en aumento y se considera que las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes son importantes para inhibir el crecimiento de los tumores. También hay un gran auge en la investigación de las propiedades neuroprotectoras de la curcumina en especial en modelos animales que mimetizan las enfermedades

neurodegenerativas que han aumentado en los últimos años como Alzheimer, Parkinson y Huntington (Lee *et al.*, 2013).

En años recientes se ha puesto en evidencia que la administración de curcumina no es del todo inocua y hay que tener esta información en cuenta para no mal interpretar las propiedades de una molécula muy reactiva y con una gran funcionalidad química. En varios estudios *in vitro* e *in vivo* se demostró que la curcumina genera daño al DNA y mutaciones cromosomales en concentraciones farmacológicas cercanas a las que ejercen un efecto quimioprotector (Urbina-Cano *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2013). Es cada vez más claro que la curcumina exhibe propiedades tanto pro como antioxidantes.

### *Curcumina y enzimas de fase II*

La curcumina es inductor de enzimas de fase II, las cuales tienen un papel protector al eliminar sustancias tóxicas y oxidantes (Fig. 3). La presencia de los grupo hidroxilo en la posición orto de los anillos aromáticos y las beta-diacetonas se requieren para inducir de manera potente a las enzimas de fase II (Dinkova-Kostova & Talalay, 1999). También se denomina sistema enzimático de desintoxicación y antioxidante. Algunos ejemplos de estas enzimas son: NADPH:quinona oxidoreductasa (NQO<sub>1</sub>), GST,  $\gamma$ -GCL y HO-1, entre otras, y sirven como un mecanismo para disminuir el desequilibrio en la homeostasis celular, inducido por los sistemas generadores de estrés oxidante (Sa & Das, 2008).

La HO-1 protege a las células endoteliales y a los astrocitos del daño causado por el estrés oxidante (Motterlini *et al.*, 2000; Scapagnini *et al.*, 2002). Además de que la HO-1 está relacionada con la protección celular tanto *in vivo* como *in vitro* en distintos modelos. Por ejemplo las células  $\beta$ -pancreáticas en ratas diabéticas, en la preservación de órganos trasplantados y en la isquemia-reperfusión de diversos órganos, entre otros (Ryter *et al.*, 2006).

La NQO<sub>1</sub> es una flavoproteína que desecha las quinonas y sus derivados mediante su reducción con dos electrones. Esto permite la protección celular contra el ciclo redox, que pueden llevar a cabo las quinonas. La expresión del gen de NQO<sub>1</sub> es inducida por la presencia de xenobióticos, antioxidantes, metales pesados, luz UV y radiación ionizante

(Jaiswal, 2000). La NQO1 es parte del mecanismo de defensa celular, el cual consiste en la inducción de más de una docena de genes que responden al estrés oxidante o por electrófilos generados por la exposición a diferentes químicos (Nebert & Lu, 1994). Los genes que se inducen de manera coordinada con la NQO1 incluyen la GST, la cual conjuga muchos compuestos electrófilos hidrofóbicos con el GSH (Pickett, 1989).

La inducción coordinada de esos genes citoprotectores ocurre a través de los elementos de regulación en el DNA, localizados en el promotor o en las regiones enhancers, los ARE. Los elementos consenso ARE son parecidos a los elementos de reconocimiento Maf y a ellos se pueden unir varios factores de transcripción de la familia de cremallera básicas de leucinas (bZIP), incluidos Jun, Fos, Maf y Nrf2. De éstos, el factor Nrf2 tiene un papel central en la regulación transcripcional de los genes de las enzimas antioxidantes y de las desintoxicación (Balongun *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2009).

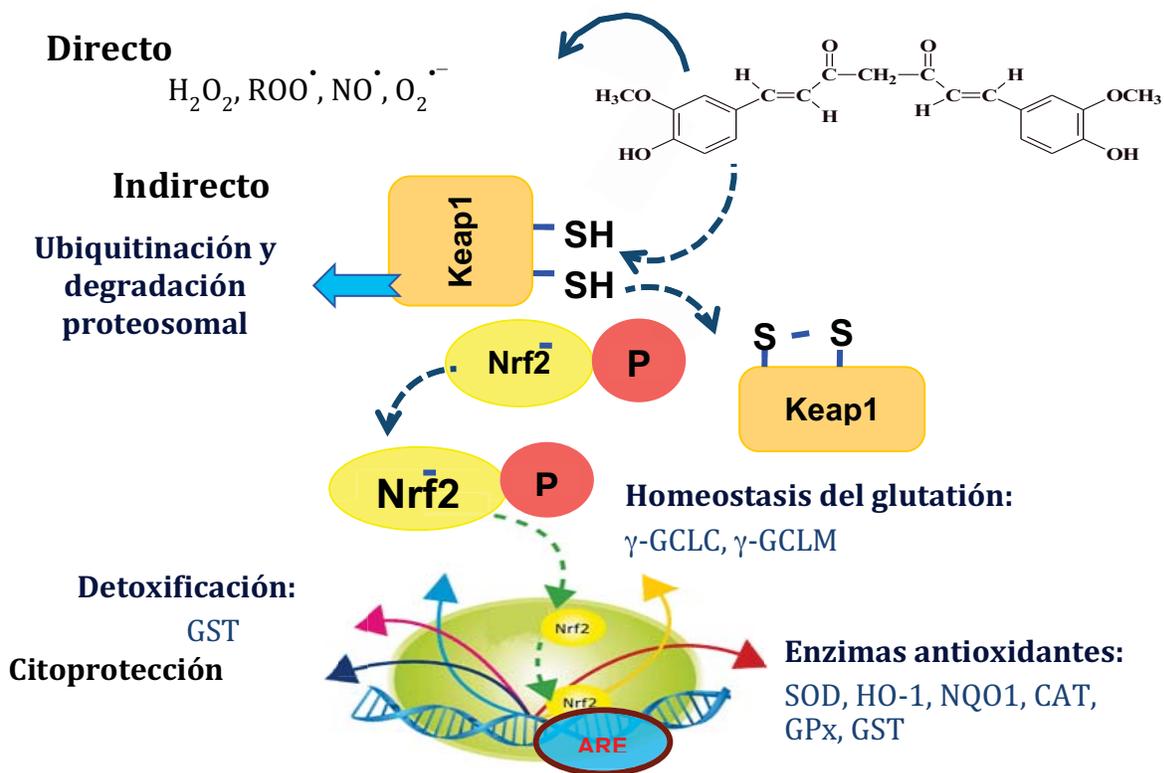


Fig. 3 Esquema de mecanismo de curcumina bifuncional. La curcumina como antioxidante directo tiene la capacidad de atrapar diferentes ROS. En su función de antioxidante directo, interacciona con Keap 1 para liberar a Nrf2 y permitir su migración al núcleo donde se da la expresión de genes de enzimas antioxidantes que conllevan a citoprotección.

## Nrf2

El factor de transcripción Nrf2, en condiciones normales, es mantenido en el citosol por el inhibidor Keap 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, también conocido como INrf2). Los oxidantes y los antioxidantes antagonizan esa interacción, dando como resultado la liberación de Nrf2. Este factor es trasladado al núcleo, donde se une a los ARE y activa una batería de genes citoprotectores. Una vez transcritos los genes, el Nrf2 es transportado fuera del núcleo, uniéndose al INrf2 y activando su degradación proteosomal (Jain & Jaiswal, 2006).

Se ha demostrado que varias cinasas citosólicas incluidas la PKC, las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) participan en la modificación de Nrf2 y tienen un papel en el mecanismo de transducción de señales de antioxidantes y xenobióticos por ARE (Jaiswal, 2004).

Dependiendo del tipo celular y del inductor, la ruta de señalización para la transcripción del Nrf2 y la expresión de la HO-1 es diferente, incluyendo las proliferación y de la supervivencia celular, como son las MAPK- ERK, JNK y p38- y la de PI3K (Andreadi *et al.*, 2006).

Se ha identificado que la curcumina estimula la inducción de la HO-1 en cultivos de células endoteliales, células del epitelio renal, neuronas corticales y astrocitos; así como también en estudios *in vivo* en el riñón de rata (Motterlini *et al.*, 2000; Hill-Kapturczak *et al.*, 2001; Scapagnini *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2000; Scapagnini *et al.*, 2006). En células renales, la expresión de la HO-1 a través de Nrf2 y ARE se da mediante la ruta p38 MAPK (Balongun *et al.*, 2003). La ruta PI3K participa en la inducción de la HO-1 en la línea celular dopaminérgica PC12 en respuesta a la 6-hidroxdopamina (Salinas *et al.*, 2003) o a la hemina (Nakaso *et al.*, 2003). Además se demostró su participación en esa misma línea celular en respuesta al fenol carnosol (Martín *et al.*, 2004).

Pugazhenthhi y col. (2007) encontraron que la inducción de la HO-1 en las células MIN 6 - línea celular de células  $\beta$ -pancreáticas de ratón- con la curcumina y con los compuestos puros dimetoxicurcumina y bis-dimetoxicurcumina está regulada por la ruta PI3k/Akt. Sin embargo, en estudios realizados en la línea celular de cáncer del seno humano, se demostró que la inducción de la HO-1 con los polifenoles curcumina y epigallocatequina 3-galato está regulada por las señales de p38 y NF- $\kappa$ B pero no por la de PI3K (Andreadi *et al.*, 2006).

En varios estudios *in vivo* e *in vitro* se demostró que la curcumina activó la señalización de Nrf2 (Balogun *et al.*, 2003; Scapagnini *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2011). Algunas estrategia que se han seguido para ver la activación de Nrf2 es utilizar animales con un genotipo Nrf2<sup>-/-</sup> en modelos *in vivo* y en modelos *in vitro* poner un RNA de interferencia para poder checar que la carencia de Nrf2 es la que estaba implicada en la citoprotección.

El Nrf2 se ha propuesto como un factor transcripcional que tiene un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular. Cuando la función de Nrf2 se bloquea y con ello la transcripción de genes relacionados con la desintoxicación y la citoprotección, se lleva a la susceptibilidad del organismo a padecer diferentes enfermedades, por ejemplo, inflamación, neurodegeneración, cáncer entre otros (Li *et al.*, 2012).

El Nrf2 es activado por varios agentes quimiopreventivos, entre los que se encuentra la curcumina, y ha sido una estrategia importante de prevención de enfermedades relacionadas con estrés oxidante en modelos animales. Por consiguiente, la activación farmacológica se enfocó hacia mejorar condiciones de daño.

## JUSTIFICACIÓN

La prevención de enfermedades con el uso de compuestos de fuentes naturales ha ido en aumento. La curcumina al igual que otros polifenoles muestran características químicas importantes, como dobles enlaces y grupos hidroxilos que permiten tener actividad antioxidante. Estudios con la curcumina en modelos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que hay protección contra el daño por un mecanismo antioxidante. La hemina es una neurotoxina que se encuentra en cantidades abundantes después de un episodio de hemorragia y puede causar un aumento en la inflamación y daño oxidante. Utilizar una estrategia de prevención con un compuesto que presenta una amplia variedad de funciones como curcumina puede mejorar la sobrevivencia de los organismos. El estudio de mecanismos contra el daño celular dado por curcumina, en un modelo de cultivos primarios de neuronas puede ayudar a largo plazo a encontrar tácticas de prevención de las enfermedades neurodegenerativas.

## HIPÓTESIS

El tratamiento de los cultivos primarios de neuronas con curcumina prevendrá el efecto tóxico de la hemina. La actividad antioxidante bifuncional de curcumina ayudará a preservar el sistema antioxidante endógeno.

## OBJETIVOS

### General

Estudiar el papel funcional de la curcumina en las neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC) expuestas a estrés oxidante.

### Particulares

- a. Establecer un modelo oxidante con la hemina en cultivos neuronales.
- b. Evaluar la función de curcumina en los cultivos expuestos a hemina.
- c. Determinar la expresión de la hemo oxigenasa-1 después del tratamiento con curcumina.
- d. Evaluar la participación del GSH en las NGC expuestas a curcumina y hemina.
- e. Examinar si la actividad de las enzimas antioxidantes GST, GR y SOD cambia con el tratamiento con curcumina, con la hemina y la mezcla curcumina-hemina.
- f. Establecer el efecto de la curcumina sobre el factor de transcripción Nrf2.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### ***Reactivos***

La curcumina de 98.5% de pureza (Cát. # ALX-350-028-M050, Lote # L12586) y los anticuerpos anti-HO-1 se compraron de ENZO Life Sciences (Ann Arbor, MI, USA). La tripsina, la DNAsa, el medio basal Eagle, la L-glutamina, la gentamicina, la poli-L-lisina, la citosina arabinosa, la glucosa, los anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina, MTT, el 2, 2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH), trolox, BSO, los reactivos para electroforesis y la hemina (Cát.# H5533, Lote # 110K1094) se compraron en Sigma-Aldrich Corp., (St. Louis, MO, USA). El inhibidor de tripsina, el azul tripano, el suero fetal bovino y la penicilina/estreptomina se compraron en Gibco Life Technologies Corp. (Grand Island, NY, USA). La SnMP se compró en Frontier Scientific Inc. (Logan, UT, EUA). El dihidroetidio, el carboxi-DCFDA y la FDA se compraron en Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). Los anticuerpos anti-Nrf2 y el anti-antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) se obtuvieron en Abcam (Cambridge, MA, USA). Los estuches TransAM ELISA para Nrf2 (Cát.# 50296) y el de extracción de núcleos (Cát.# 40010) se compraron en Active Motif Inc. (Carlsbad, CA, USA). Todos los demás reactivos fueron grado analítico.

### ***Capacidad atrapadora de curcumina in vitro***

La capacidad atrapadora de ROS por curcumina de alta pureza se cuantificó usando ensayos fluorométricos en un lector de microplacas multi-modo Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Para estos ensayos la curcumina se disolvió en etanol y las diluciones necesarias se hicieron en agua.

### ***Peroxilo***

Este método está basado en lo descrito por Huang *et al.* (2002). El AAPH, fue usado como generador de radical peroxilo, la fluoresceína se usó como la sonda fluorescente y el trolox (un análogo soluble de la vitamina E) como el compuesto de referencia.

La curcumina, el trolox, el vehículo y el amortiguador de fosfatos 75 mM pH 7.4 (todos en un volumen de 25  $\mu$ L) se mezclaron con 25  $\mu$ L de AAPH 153 mM y con 150  $\mu$ L de

fluoresceína 50 nM. La fluorescencia se midió cada minuto por 90 min usando los filtros de excitación a 485 nm y de emisión a 520 nm.

### **Oxígeno singulete**

La producción de singulete por hipoclorito de sodio y  $H_2O_2$  se determinó basándose en el método descrito por Wozniak *et al.* (1991). La mezcla de reacción contenía etanol,  $H_2O_2$  1 mM, NaOCl 3  $\mu$ M y difenilisobenzofurano (DPBF) 1 mM. El volumen total de la reacción (0.3 mL) se incubó por 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz. La producción de singulete se midió por la disminución de la fluorescencia de DPBF a 410 nm de excitación y 455 nm de emisión. El ácido lipoico se utilizó como compuesto de referencia.

### **$H_2O_2$**

La capacidad atrapadora de  $H_2O_2$  se realizó con el reactivo Amplex red (Zhou *et al.*, 1997). Las muestras y el piruvato como compuesto de referencia se incubaron con 25  $\mu$ L de 10  $\mu$ M de  $H_2O_2$  por 20 min y posteriormente con 50  $\mu$ L de la mezcla de reacción con 0.1 mM de Amplex red y 0.2 U/mL de peroxidasa de rábano (HRP). La mezcla total se incubó por 20 min protegida de la luz y la concentración de  $H_2O_2$  se cuantificó usando los filtros de excitación a 530 nm y de emisión a 590 nm. El ensayo se calibró usando estándares de  $H_2O_2$  (0-10  $\mu$ M).

### **Peroxinitrito**

El  $ONOO^-$  se sintetizó previamente al ensayo. La reacción se realizó en un baño de hielo con 5 mL de una solución ácida de  $H_2O_2$  0.7 M (en HCl 0.6 M) y 5 mL de  $KNO_2$  0.6 M durante 1 segundo. La reacción se detuvo añadiendo 5 mL de NaOH 1.2 M frío. El  $H_2O_2$  residual de la mezcla se removió pasando la solución a través de una columna de  $MnO_2$  previamente lavada con NaOH 1.2 M (Medina-Campos *et al.*, 2007). La solución de  $ONOO^-$  se guardó en alícuotas protegidas de la luz a  $-80^\circ C$ . La concentración de  $ONOO^-$  se determinó espectrofotométricamente a 302 nm antes de realizar cada ensayo usando el coeficiente de extinción molar de  $1,670 M^{-1} cm^{-1}$  (Beckman *et al.*, 1994).

Para medir la capacidad atrapadora de ONOO<sup>-</sup> se utilizó amortiguador de fosfatos 75 mM pH 7.4 (como tubo control de 0% de atrapamiento), las muestras de curcumina y la penicilamina (como compuesto de referencia), 25 µL de 33 µM de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 35 µL de 116 µM de DCDHF. La reacción comenzó con la adición de 10 µL de 20.8 µM de ONOO<sup>-</sup>. Estos dos últimos reactivos se mantuvieron en hielo y protegidos de la luz hasta antes de adicionarlos a la mezcla de reacción. Se midió la fluorescencia a 485 nm de excitación y a 528 nm de emisión.

### **Ácido hipocloroso**

Para medir la capacidad atrapadora de esta especie se preparó el HOCl, usando una solución de NaOCl al 1% (v/v) a la que se le ajustó el pH a 6.2, con ácido sulfúrico diluido. La concentración de HOCl se determinó espectrofotométricamente (295 nm) antes de realizar cada ensayo usando el coeficiente de extinción molar de 100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Valentao *et al*, 2002). La mezcla de reacción contenía la muestra o la vitamina C como compuesto de referencia, 30 µL de 100 µM del ácido aminobenzoico, 30 µL de 50 µM de HOCl y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. Las lecturas se tomaron cada 5 min por 15 min con los filtros de excitación a 280 nm y de emisión a 340 nm.

### **Superóxido**

La oxidación fluorogénica de dihidrorodamina 123 a rodamina 123 se usó para medir la capacidad atrapadora de superóxido (Yanagisawa *et al.*, 2009). La curcumina y el tiron como compuesto de referencia se incubaron con 37°C por 30 min con 44 µM de dihidrorodamina, 91 µM de xantina, 0.025 U de xantina oxidasa, 91 µM de EDTA, 36 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La fluorescencia se midió con los filtros de excitación a 480 nm y a 610 nm de emisión.

### ***Cultivos primarios de NGC.***

Este protocolo se aprobó por el comité local de ética de la Facultad de Química (UNAM) (FQ/CICUAL/059/13). Los cultivos de NGC se obtuvieron a partir de ratas Wistar de 7 días de nacidas a las que se les extrajeron los cerebelos y se eliminaron las meninges. Una vez limpios se cortaron con un bisturí hasta obtener un homogenado. Se llevó a cabo la

degradación enzimática con 0.25% de tripsina a 37°C por 10 min; se detuvo la reacción al adicionar una solución con 0.52% de inhibidor de tripsina y 0.08% de DNAsa y se centrifugó para continuar con la disgregación mecánica con malla de nylon. Se realizó una cuantificación de células vivas usando azul de tripano y una cámara de Neubauer. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo (MC), el cual estaba constituido de medio basal Eagle, 2 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 5 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina, 25 mM de KCl. Por último, se sembraron  $14 \times 10^6$  o  $6 \times 10^6$  células en cajas de 24 pozos o 60 x 15 mm, respectivamente, que se trataron previamente con poli-L-lisina (0.25 mg/mL). El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% 24 horas después de la siembra se adicionó citosina arabinosa a una concentración final de 10 µM para inhibir la proliferación de células no neuronales y a las 96 h se agregó glucosa a una concentración final de 5 mM. Los cultivos se observaron en un microscopio Eclipse TS100 Nikon Instruments Inc. (Melville, NY, USA) para verificar el desarrollo neuronal. Bajo estas condiciones de cultivo se presentaron 5-7% de células gliales, dato obtenido de inmunocitoquímica con anticuerpos anti-proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) y anti-proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2), marcadores glial y neuronal respectivamente. Las NGC cultivadas entre 8 y 9 días *in vitro* se utilizaron para los experimentos.

### ***Determinación de la viabilidad celular.***

#### **MTT**

Este método está basado en la reducción de MTT a formazán que se utiliza como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, mediante deshidrogenasas mitocondriales activas, y por tanto, de células viables (Berridge & Tan, 1993). Pasadas 24 h después de que las células se trataron con curcumina, se agregó el MTT (30 µL de una solución de 1 mg/mL), se incubó por 1 h a 37°C, se eliminó el líquido y se agregó isopropanol ácido al 4% para disolver el formazán y se cuantificó espectrofotométricamente a 570 nm. Se hicieron triplicados de cada concentración así

como del control del cultivo con dimetilsulfóxido (solvente de la curcumina) al 0.1%. Los datos obtenidos son el promedio de seis experimentos independientes.

#### FDA

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la cuantificación de fluorescencia de con fluoresceína, la cual se forma a partir de la desesterificación del FDA por células vivas (Yan *et al.*, 1994). Las células se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos, pH 7.4 (PBS) a 37°C para después incubarlas con 12 µM de FDA por 5 min seguido de dos lavados con PBS frío. La intensidad de fluorescencia se determinó en el espectrofluorómetro Synergy HT (a 485 nm de excitación y a 528 nm de emisión). Los resultados se expresaron como porcentaje de intensidad de fluorescencia.

#### ***Determinación del efecto de la hemina en NGC.***

Las NGC se incubaron con diferentes concentraciones de hemina para evaluar cuál era la concentración con la que se podría generar un daño celular y que pudiera funcionar como un modelo oxidante para subsecuentes experimentos. El MC se removió, se añadió amortiguador Ringer y se adicionó hemina, se dejó por 1 h. Pasado ese tiempo se eliminó el tóxico y se colocó de nuevo el MC que había sido removido. Posteriormente se dejaron las células hasta completar las 24 h y se midió la viabilidad celular.

#### ***Detección de ROS.***

Se utilizaron las sondas dihidroetidio y carboxi-DCFDA, de acuerdo a González-Reyes *et al.* (2009). Al entrar a las células, las sondas se oxidan por ROS (principalmente por O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>•</sup>). El dihidroetidio se oxida a etidio en el citosol, el cual es retenido en el núcleo al interactuar con el DNA, emitiendo una fluorescencia roja brillante (Bindokas & Ishida., 1996). La carboxi-DCFDA al ser oxidada se convierte en un compuesto fluorescente 5-(y 6-) carboxi-2,7-diclorofluoresceína (carboxi-DCF), que emite un color verde brillante en el citosol. Después de los tratamientos experimentales, las sondas se añadieron al amortiguador Ringer-Krebs y las células se incubaron durante 20 min, después de lo cual se examinaron con un microscopio de epifluorescencia usando los

cubos de fluoresceína B-2A/C (excitación 450-490 nm) y G-2A (emisión 510-590 nm) marca Nikon para la detección de la carboxi-DCF y el etidio, respectivamente. La intensidad de la fluorescencia de células positivas para etidio o carboxi-DCF se cuantificó en 5 campos diferentes por pozo por condición en tres experimentos independientes mediante el analizador de imágenes NIS Elements (Nikon Instruments Inc.).

#### ***Determinación de la protección por curcumina ante hemina en NGC.***

Para este fin se utilizaron cajas de 24 pozos, se ajustó el volumen en cada pozo y se apartó el MC. Se realizaron dos protocolos para evaluar el efecto de la curcumina con relación al daño por hemina. El primero fue hacer incubaciones cortas (0.5-2 h) en NGC y mantener todo el tiempo la curcumina para observar si su capacidad directa de atrapar ROS es suficiente para evitar el daño oxidante. El segundo protocolo fue a los 8 días, las NGC se pre-incubaron con diferentes concentraciones de curcumina por 24 h, pasado ese tiempo se eliminó el medio y se adicionó a los cultivos 30  $\mu\text{M}$  de hemina por 1 h. Al final se eliminó el tóxico y se reemplazó con el MC antes apartado. Las células se incubaron durante 24 horas más para evaluar la viabilidad celular.

Para determinar la participación del sistema antioxidante HO y de GSH se usaron los inhibidores SnMP (10  $\mu\text{M}$ ) y BSO (25  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Se siguió un protocolo similar de pre-incubación con curcumina por 24 h, los inhibidores se añadieron antes de agregar hemina y permanecieron en los cultivos durante todo el tiempo.

#### ***Determinación del efecto de la curcumina sobre la expresión de la HO-1 en NGC.***

Para determinar el efecto de este compuesto en la expresión de HO-1 se incubaron las NGC a los 9 días con 0, 5, 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$  de curcumina y posteriormente se hicieron cursos temporales a las 0, 4, 8, 16 y 24 h con 15  $\mu\text{M}$  de curcumina, se usaron cajas de 6x15 mm de diámetro con  $6 \times 10^6$  células. Los paquetes celulares se obtuvieron con amortiguador PBS más inhibidor de proteasas y se lisaron por sonicación durante 5 segundos.

Las proteínas totales de los lisados se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albúmina sérica bovina (ASB) como estándar. Se cargaron 30 µg de proteína en cada pozo de un gel desnaturante de poliacríamida al 12%, se realizó la separación por electroforesis a 100 V durante 2 h. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por electroelución en amortiguador de Towbin (20% de metanol) durante 1 h a 400 mA a 40°C.

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en amortiguador TBST y 0.1% de Tween 20 por una hora. Se usaron los anticuerpos policlonales anti-HO-1 (1:5,000) y como control de carga anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina (1:5,000) y se dejaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 5 lavados con TBST de 5 minutos cada uno y se colocaron los anticuerpos secundarios, anti-conejo (anti-HO-1) con una dilución 1:10,000 y el anti-ratón (anti-tubulina; 1:12,000) los cuales estaban acoplados a HRP, permanecieron por una hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Al final se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno.

La detección se hizo por quimioluminiscencia [Millipore]. Se cuantificó la expresión de HO-1 por densitometría. El nivel de inducción de la HO-1 se expresó como el cociente de HO-1/ tubulina y se utilizó el programa ImageJ 1.47 del National Institute of Health.

### ***Determinación del contenido de glutatión.***

**GSH+GSSG.** La determinación es una modificación del método de Tietze descrito en 1969 (Tietze, 1969). El ensayo se realiza en placas de 96 pozos (Rahman *et al.*, 2006) y se basa en la reacción del GSH con el ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) que produce el cromóforo 5-tiobenzoico (TNB) el cual tiene una absorbancia máxima a 412 nm. La velocidad de formación del TNB a esa longitud de onda es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. El disulfuro generado (GS-TNB) es reducido por la GR en presencia de NADPH. Debido a que la GR reduce al GSSG en dos moléculas de GSH, la cantidad de GSH medido en la muestra representa la suma del glutatión reducido

y del oxidado. La concentración de GSH se calcula al usar una curva con concentraciones conocidas de GSH.

Las células se colocan en medio de extracción (amortiguador de fosfatos pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.1% de Tritón X-100 y 0.6% de ácido sulfosalicílico), se sonica 1 min por intervalos de 15 segundos en hielo, luego se congelan y descongelan 2 veces y el lisado se centrifuga a 3,000 g por 10 min para obtener el sobrenadante. Se mezclan 20  $\mu$ L de muestra con 180  $\mu$ L de una solución de 2.5 mM de DTNB: 250 U/mL de GR (1:1) y con 60  $\mu$ L de 0.8 mM de NADPH. Se lee inmediatamente en un lector de placas a 412 nm por 2 min. Se usa una curva estándar de GSH y se normaliza con la cantidad de proteína en la muestra.

**GSSG.** Se emplea el método de Griffith (Griffith, 1980), los extractos celulares son tratados con 2-vinilpiridina (2-VP), que reacciona covalentemente con GSH (pero no con GSSG). El exceso de 2-VP es neutralizado con trietanolamina.

La derivatización se realiza con 50  $\mu$ L de sobrenadante más 1  $\mu$ L de 0.02% de 2-VP. La reacción se deja a temperatura ambiente por 1 h, pasado ese tiempo se agrega trietanolamina al 0.06% por 20 min y se procede a mezclar con la solución de 2.5 mM de DTNB: 250 U/mL de GR (1:1) y con 60  $\mu$ L de 0.8 mM de NADPH. Se lee en placas de 96 pozos a 412 nm por 2 min, se corre a la par una curva estándar de GSSG. Se calculan los delta por minuto, se interpola con la curva estándar y se relaciona con la cantidad de proteína en la muestra (Rahman *et al.*, 2006).

**GSH fluorométrico.** Este método se basa en la interacción de monoclorobimano (mCB) con GSH. El mCB forma un aducto estable, fluorescente y con una gran especificidad (a diferencia de otros bimanos) con el GSH en una reacción catalizada por GST (Fernández-Checa & Kaplowitz, 1990).

La mezcla de reacción se pone en una placa oscura de 96 pozos para fluorescencia: mCB (1 mM), GST (1 U/mL), amortiguador de Krebs-Henseleit pH 7.4 y la muestra (33  $\mu$ L). Se lee en fluorómetro (excitación a 385 nm, emisión a 478 nm) durante 30 minutos (cada 15 minutos) a 37°C, se utiliza una curva estándar de GSH. Se calculan los delta de los 15 minutos, se interpola con la curva estándar y se relaciona con la cantidad de proteína en la muestra. Los resultados son expresados en nmoles de GSH/mg de proteína.

### ***Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.***

**GR.** La mezcla de reacción contiene amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.6, 0.5 mM de EDTA, 1.25 mM de GSSG y 0.1 mM de NADPH. El volumen final del ensayo incluida la fuente de la enzima es de 1 ml. La absorbancia a 340 nm se mide cada minuto durante 3 minutos en un lector de placas. Una unidad de GR está definida como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de NADPH/min.

**GST.** La mezcla de reacción contiene sobrenadante sin diluir, amortiguador de fosfato 0.05 M pH 6.5, 2 mM de GSH, 1 mM de 1-cloro-2, 4-dinitrobenceno (CDNB). La densidad óptica se mide a 340 nm cada minuto durante 3 minutos. Una unidad de GST conjuga 1  $\mu$ mol de CDBN con GSH por minuto a pH 6.5 a 25°C.

**SOD total.** La actividad de la SOD se mide por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley *et al.*, 1984).

La mezcla de reacción contiene, en concentraciones finales 0.122 mM de xantina, 0.122 mM de EDTA, 30.6  $\mu$ M de NBT, 0.006% de ASB y 49 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. En este ensayo se incluye un tubo en el que en lugar de muestra se usa amortiguador, la D.O. de este tubo se considera como la máxima reducción de NBT y los valores de D.O. de los tubos con muestra se comparan con este valor. La reacción se realiza por 15 minutos a temperatura ambiente, se detiene con 0.8 mM de CuCl<sub>2</sub> y se lee a la D.O. a 560 nm. Una unidad de SOD está definida como la cantidad de enzima que inhibe la máxima reducción de NBT al 50%. Los valores se expresan como U/mg de proteína.

### ***Inmunocitoquímica para Nrf2.***

Las NGC se sembraron en cubreobjetos tratados con 0.25 mg/mL de poli-L-lisina por 24 h, colocados en placas de 12 pozos. Después de los tratamientos con curcumina o hemina o la mezcla de ellos los cubreobjetos se lavaron con PBS. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min, con posteriores lavados con PBS frío. Luego se permeabilizaron con tritón al 0.5% por 20 min, se lavaron con PBS y se bloquearon por 30

min con una solución que contenía ASB al 3%, tritón al 0.5% y suero de caballo al 5%. La incubación con los anticuerpos primarios anti-Nrf2 (abcam 31163) fue de 3 h en una cámara húmeda a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y la incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) se dejó toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos y las células se tiñeron con Hoechst 33258 para marcar el núcleo. Las marcas de fluoresceína y de Hoechst se observaron en microscopio con los filtros B-2 A/C (para FITC) y UV-2A (para Hoechst) y se obtuvieron fotografías representativas. Los experimentos se repitieron tres veces.

### ***Extracción de núcleos y actividad transcripcional de Nrf2.***

Después de los tratamientos se extrajeron los núcleos de las NGC con un estuche comercial de Active Motif de acuerdo a las indicaciones del proveedor: Las células se lavaron con amortiguador de PBS que contenía inhibidor de fosfatasas y se recolectaron en tubos de 1.5 ml los cuales se centrifugaron a 3,000 g por 1 min. Se obtuvo el paquete celular que se mantuvo en hielo para subsecuentes pasos. Para obtener la fracción citoplasmática los paquetes celulares se colocaron en amortiguador hipotónico 1X y se incubaron en hielo por 15 minutos. Luego se agregó el detergente y se agitó en vortex durante 10 segundos. La suspensión se centrifugó por 30 segundos a 14,000 g a 4°C. El sobrenadante es la fracción citoplásmica la cual se almacenó a -80°C hasta su uso. Los paquetes celulares obtenidos se resuspendieron en amortiguador de lisis, se agitaron en vortex por 10 segundos y se dejaron en hielo por 30 minutos. La suspensión se agitó en vortex por 30 segundos y se centrifugó a 14,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante es la fracción nuclear que se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para determinar la actividad transcripcional de Nrf2 se utilizó un estuche comercial de Active Motif, que se basa en un ensayo de ELISA. El estuche consiste de una placa de 96 pozos los cuales tienen en sus paredes el oligonucleótido con la secuencia consenso de unión a los sitios ARE (5'-GTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3') de manera que la forma activa de Nrf2 contenida en los extractos nucleares se une a ese oligonucleótido. La

adición de anticuerpos primarios anti-Nrf2 reconoce a la proteína de Nrf2 que quede unida al oligonucleótido. El reconocimiento de este complejo se realiza con la adición de anticuerpos secundarios acoplados a la HRP y la adición de un sustrato. La formación del producto de esta reacción se mide espectrofotométricamente a 450 nm. El protocolo se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se usaron 20 µg de proteínas del extracto nuclear (cuantificadas por el método de Bradford con el reactivo comercial (Sigma), usando ASB como estándar) a los cuales se agregaron el amortiguador de unión junto con la muestra (el estuche incluye un control positivo que son células COS-7 transfectadas con Nrf2). Luego realizó una incubación de 1 h con los anticuerpos anti-Nrf2 y anticuerpo secundario (usando una dilución 1:1000), se realizaron 3 lavados, respectivamente. Se añadió el reactivo desarrollador de color que se dejó por 6 minutos y al final se añadió el reactivo para detener la reacción. La D.O. se determinó en un lector de microplacas multi-modo Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). A la D.O. obtenida de las muestras se le resta el blanco de la reacción y se presentan los datos en valores de D.O..

### ***Análisis estadístico.***

Los datos obtenidos se analizaron con el programa Prism 5 (GraphPad Software, San Diego California, USA). Se realizó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de un análisis de comparación múltiple (Dunnett o Newman-Keuls, según fuera el caso). Se consideró una  $p \leq 0.05$  como diferencia significativa. Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

## **RESULTADOS**

### **Capacidad atrapadora de curcumina sobre ROS.**

La curcumina que se utilizó en este trabajo fue con la más alta pureza encontrada en el mercado (98.5%). La curcumina que se utiliza de manera regular tiene solo un 80% de curcumina y está mezclado con otros curcuminoides que pudieran participar en la

respuesta, puesto que se ha demostrado que los otros curcuminoides también tienen propiedades biológicas similares (Wang & Qiu, 2013).

Los resultados de la capacidad de atrapamiento ante diferentes especies reactivas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Capacidad atrapadora de curcumina (98 % pureza) y compuestos de referencia (IC<sub>50</sub>, µg/mL).

	Curcumina	Referencia	Compuesto
Radical peroxilo (ROO•)	0.32±0.018	0.15±0.009	Trolox
Anión peroxinitrito (ONOO <sup>-</sup> )	2.75±0.14	9.98±1.42	Penicilamina
Anión superóxido (O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> )	3.15±0.32	3.08±0.26	Tiron
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	8.64±0.57	26.81±1.9	Piruvato
Oxígeno singulete ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	9.44±0.38	0.578±0.036	Ácido lipoico
Ácido hipocloroso (HOCl)	109.44±4.4	0.083±0.003	Vitamina C

n=3, media±EEM.

### Modelo oxidante: hemina.

Para la estandarización del modelo oxidante *in vitro* se probaron concentraciones crecientes de la hemina preparada en fresco (disuelta en NaOH 40 mM) y mantenida en oscuridad. A los 9 días las NGC se dejaron por 1 h con la hemina. La viabilidad celular se midió a las 24 h siguientes después de agregar la hemina por dos métodos, uno fluorescente (hidrólisis de FDA; Fig. 4A) y otro espectrofotométrico (reducción de MTT; Fig. 4B). El propósito fue corroborar que no existiera algún tipo de interferencia con el método de MTT, que es el más utilizado, y se realizó la correlación entre los métodos ( $r^2=0.993$ ) (Fig. 4C). Se tomaron fotografías de campo claro representativas del efecto de la concentración de hemina (0, 10, 15, 20, 30 y 50 µM) después de 24 h (Fig. 4D). Con base en la alta correlación de los métodos se usó el ensayo de MTT en los experimentos

posteriores por su facilidad técnica. Se observó que con una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de hemina se mantuvo alrededor del 50 % de células vivas y por ello se usó esta concentración para probar el efecto de curcumina.

Por otra parte, se realizaron ensayos con la hemina sobre la expresión de la HO-1, la cual es una enzima inducida por este compuesto y se observó que la expresión de proteína bajo las condiciones de trabajo no aumentó significativamente (Fig. 5).

Para evaluar si la toxicidad de hemina era mediada por la formación de ROS, las células se trataron con 30  $\mu\text{M}$  de hemina por 1 h y se tomaron fotografías de la fluorescencia generada con los compuesto carboxi dicloro-dihidrofluoresceína (carboxi-DCF) y con el etidio, para posteriormente cuantificar las veces de aumento (Fig. 6).

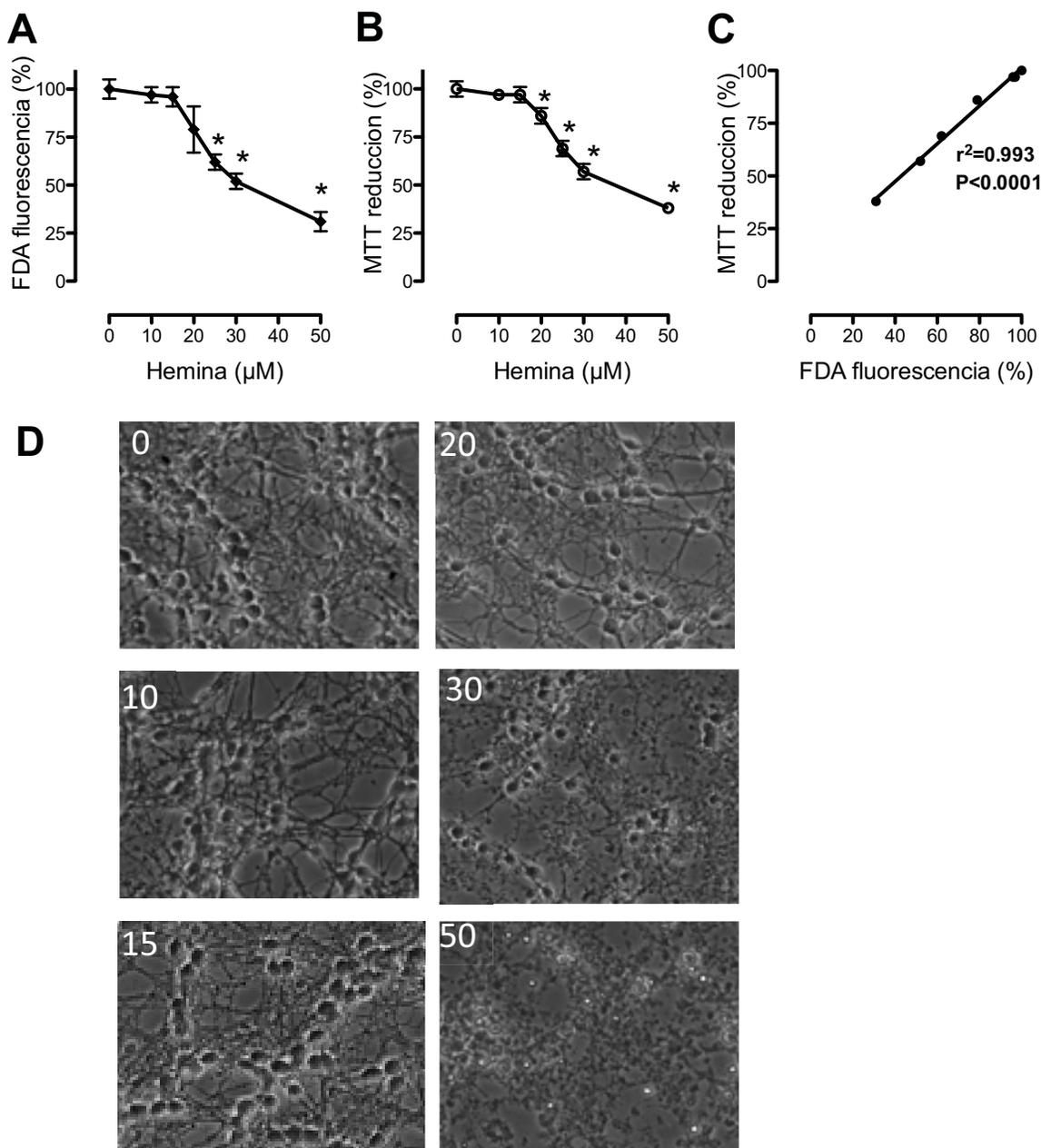


Fig. 4. Efecto de la hemina sobre la viabilidad celular de NGC. Diferentes concentraciones de hemina se usaron en los cultivos por 1 h y se mantuvieron por 24 h más en medio de cultivo para cuantificar la viabilidad celular. A. fluorescencia de FDA (%), B. reducción de MTT (%), C. Índice de correlación entre el FDA y el MTT, D) imágenes de campo claro representativas de las células tratadas con 0-50 µM de hemina, aumento 40X. Los datos se expresan como media±EEM; n=5. \*P<0.05 vs. 0 µM (control).

## Efecto de la curcumina sobre la viabilidad celular.

Las NGC se incubaron con concentraciones crecientes de curcumina (0-50  $\mu\text{M}$ ). Se observó que la morfología de las células se mantuvo constante con los cuerpos definidos y los procesos gruesos. A partir de 50  $\mu\text{M}$ , los cuerpos se empiezan a hinchar y perder, en cuanto a los procesos se vuelven delgados (Fig. 7A). Esto se relaciona con la menor viabilidad observada tanto en la reducción de MTT como en la fluorescencia de FDA, la cual es significativa a concentraciones mayores de 30  $\mu\text{M}$  (Fig. 7B).

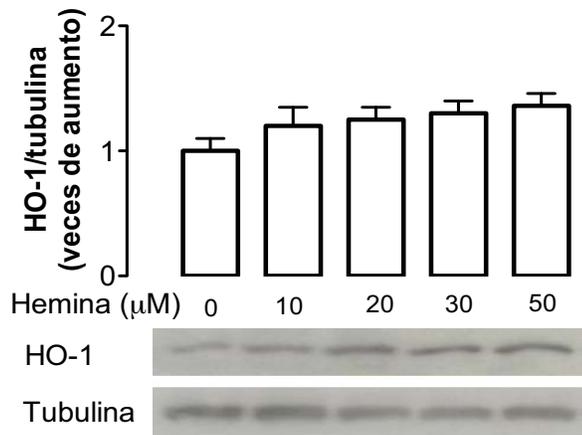


Fig. 5. Efecto de la hemina sobre los niveles de HO-1 en NGC. Las células se incubaron con hemina por 1 h y se obtuvo el paquete celular 24 h después del tratamiento. El inmunoblot de HO-1 y tubulina (control de carga) con las veces de inducción se presenta en el panel superior; la imagen representativa del western blot de las proteínas anteriores, panel inferior. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. n=3. Las concentraciones probadas no presentan diferencias significativas contra el control (0  $\mu\text{M}$ ).

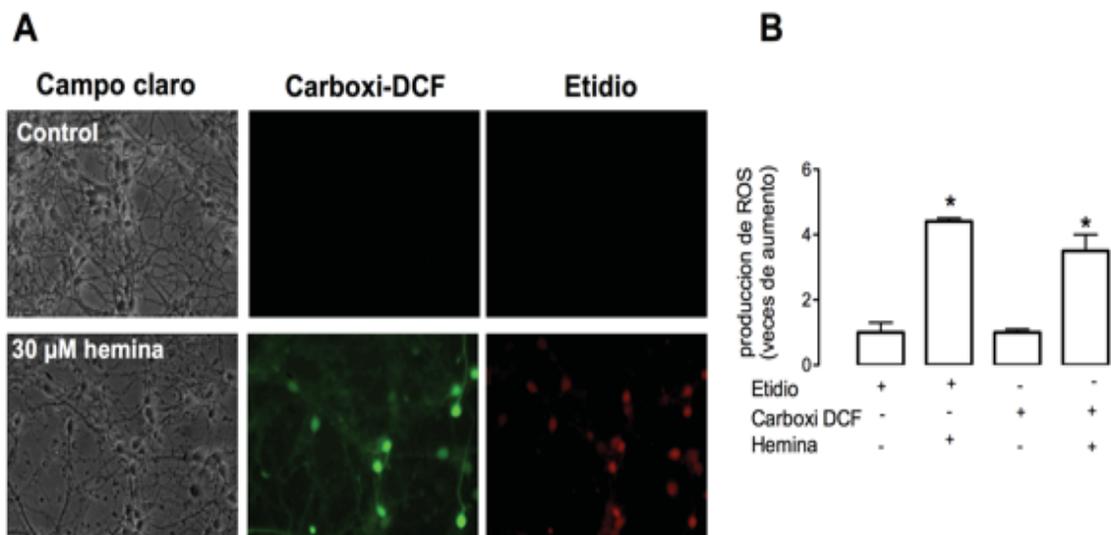


Fig. 6. Efecto de la hemina sobre los niveles de ROS en NGC. (A) Imágenes representativas después del tratamiento con 30  $\mu$ M de hemina por 1 h; campo claro (40X) en el panel izquierdo, carboxi-DCF y etidio en los paneles medio y derecho, respectivamente. Se presenta el mismo campo para cada condición. (B) La intensidad de fluorescencia de carboxi-DCF o etidio se midió en 5 campos diferentes por pozo por condición. Los datos se expresaron como media $\pm$ EEM, n=3. \*P<0.05 vs 0  $\mu$ M.

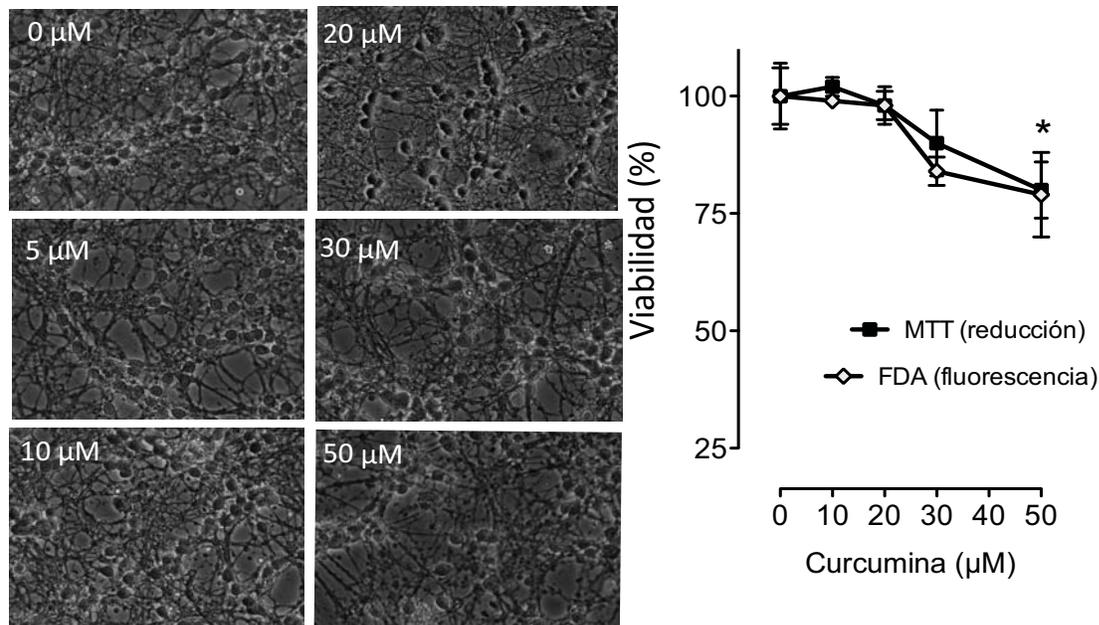


Fig. 7. Efecto de la curcumina sobre la viabilidad de NGC. Las neuronas se incubaron con 5, 10, 20, 30 y 50  $\mu$ M de curcumina por 24 h. A. Imágenes de campo claro representativas del efecto de las concentraciones de curcumina en la morfología celular, B. la viabilidad celular se cuantificó por MTT y FDA. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM; n = 6. \*P<0.05 vs. 0  $\mu$ M.

## **Efecto de la incubación de la curcumina en NGC antes de condiciones de estrés oxidante.**

Para evaluar el efecto de la curcumina en cultivos de NGC expuestos a estrés oxidante con 30  $\mu\text{M}$  hemina, se realizaron primero incubaciones cortas de 0.5, 1 y 2 h y permanentes todo el tiempo antes y después de hemina hasta las 24 h en que se midió la viabilidad celular (Fig. 8A). Por otra parte, se pre-incubó con 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  de curcumina 24 h antes de la hemina (Fig. 8B).

Se observó que las incubaciones cortas, en donde la curcumina podría estar ejerciendo su función de atrapador directo de ROS, fallaron en prevenir el daño por hemina, más aún se observa una exacerbación en la muerte celular. Sin embargo, con la pre-incubación por 24 h, que muestra su función de antioxidante indirecto, se previene el daño por hemina. En los subsecuentes experimentos se utilizó el protocolo de pre-incubación de 24 h con curcumina.

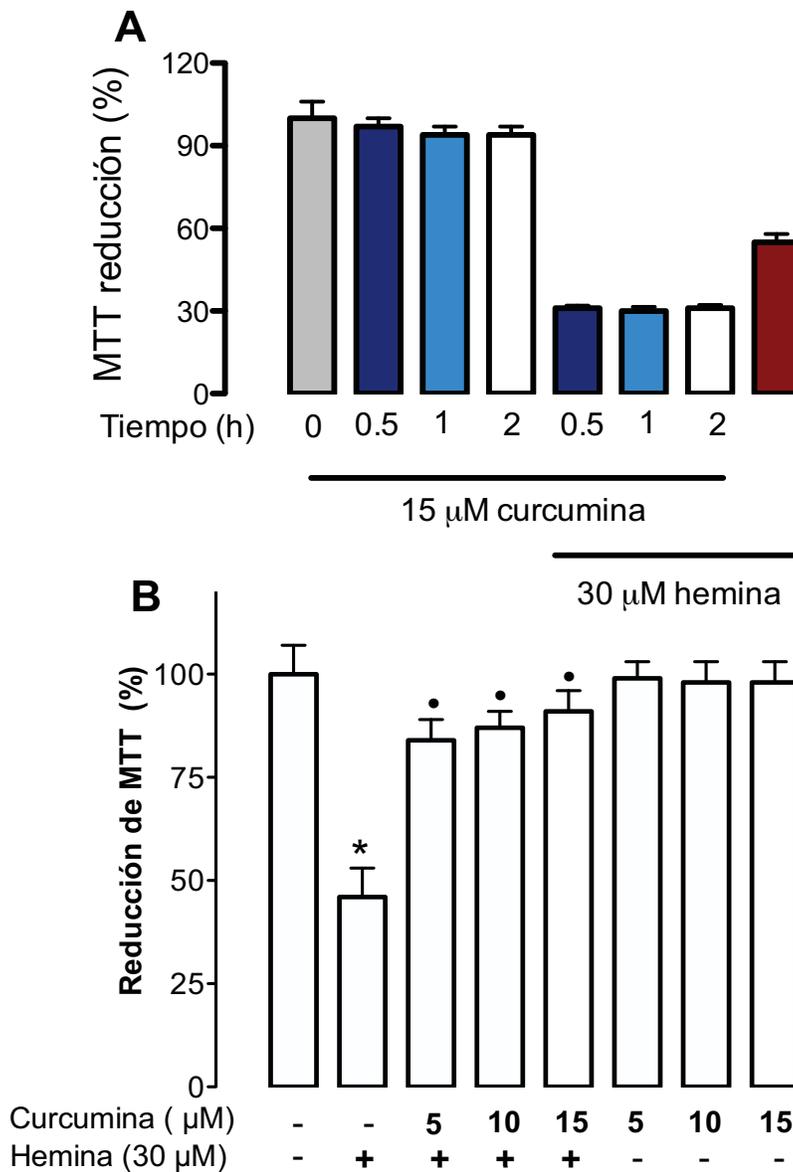


Fig. 8. Efecto de la curcumina sobre la viabilidad de NGC expuestos a hemina. A. Las NGC se incubaron con 15  $\mu$ M de curcumina por 0.5, 1 y 2 h antes de la hemina. La curcumina permaneció hasta que se cumplieron 24 h para medir viabilidad celular. B. Las neuronas se incubaron con 5, 10 y 15  $\mu$ M de curcumina por 24 h. El medio de cultivo se retiró y la hemina se adicionó por 1 h. Posteriormente el tóxico se eliminó y se puso medio fresco y se incubó por 24 h más. La viabilidad celular se cuantificó por la reducción de MTT. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM; n = 3-6. \*P<0.001 vs. 0, •P<0.001 vs. hemina.

Por otra parte, se evaluó el efecto sobre la producción de las ROS con la pre-incubación con curcumina por 24 h previo a la exposición a hemina. Los niveles de ROS cuantificados

como fluorescencia de etidio disminuyeron de manera significativa con 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  de curcumina (Fig. 9).

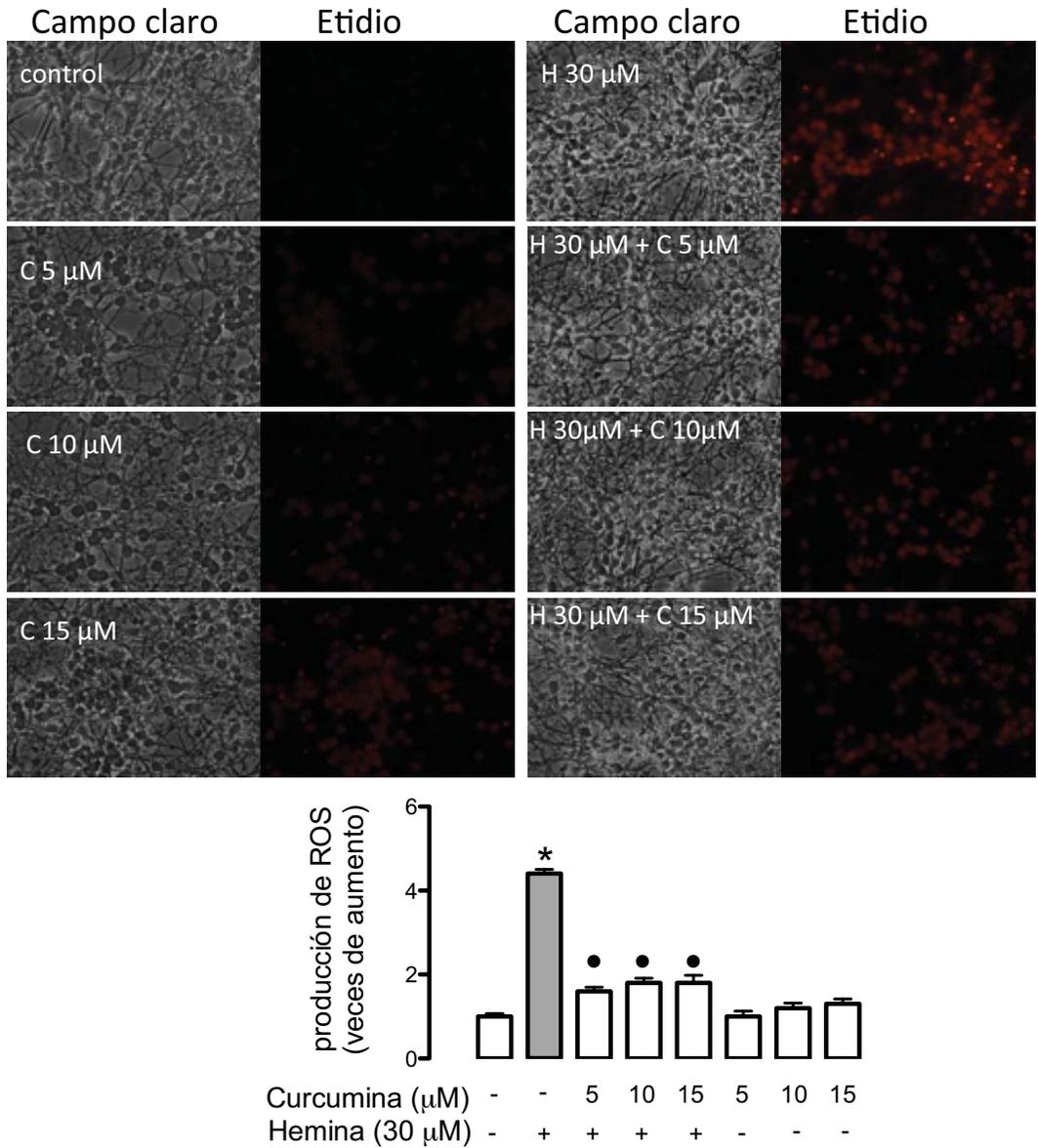


Fig. 9. Efecto de la curcumina en la producción de ROS con y sin hemina en NGC. A. Imágenes de campo claro y fluorescencia de etidio con 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  de curcumina sin y con hemina, B. Cuantificación de la fluorescencia de 5 campos aleatorios por condición en experimentos independientes. Los datos se expresaron como media $\pm$ EEM; n = 3. \* $P < 0.05$  vs. o, • $P < 0.05$  vs. hemina.

## Efecto de la curcumina en la expresión de HO-1 en las NGC.

Se evaluó si la curcumina induce a la HO-1 en las NGC. Las células se incubaron por 24 h con concentraciones crecientes de este compuesto mediante el análisis de la expresión de proteína por western blot. La inducción de HO-1 fue dependiente de la concentración y desde 5  $\mu\text{M}$  hubo un aumento significativo en la proteína (Fig. 10A). En cuanto a la respuesta sobre el tiempo se observó que desde las 8 h y hasta las 24 h hay un aumento significativo con 15  $\mu\text{M}$  (Fig. 10B).

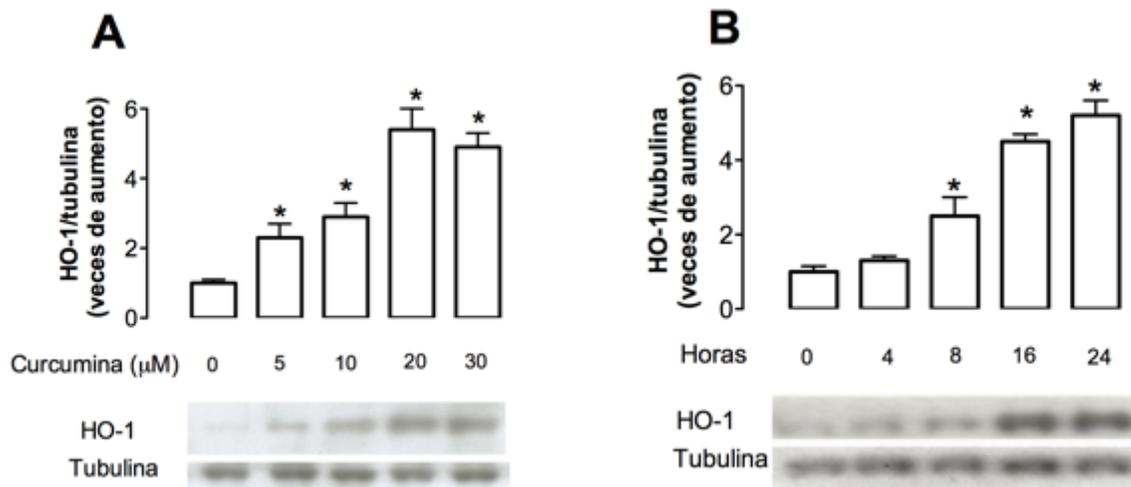


Fig. 10. Efecto de la curcumina en la inducción de HO-1 en NGC. En la parte superior se presenta la densitometría de las veces de aumento de la enzima HO-1 respecto a la tubulina como control de carga. En la parte inferior se encuentra la imagen representativa del inmunoblot correspondiente. A. Efecto de las concentraciones de curcumina en la inducción de HO-1 después de 24 h, B. Efecto del tiempo con 15  $\mu\text{M}$  de curcumina en la inducción de HO-1. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM; n = 4. \*P<0.05 vs. 0  $\mu\text{M}$ .

## Efecto de la inhibición de HO y glutatión sobre la protección celular generada por curcumina, en cultivos expuestos a condiciones de estrés oxidante.

Se evaluó la participación del sistema HO en la protección celular que se obtuvo en la pre-incubación de los cultivos celulares que se retaron con hemina. Se usó 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor SnMP. El protocolo que se siguió fue similar al utilizado con la hemina. La diferencia consistió en poner el SnMP 15 min antes de añadir la hemina y este inhibidor

estuvo presente durante todo el experimento. La inhibición de HO evitó la protección que se presentó con la pre-incubación de 10  $\mu\text{M}$  de curcumina y la adición de hemina (Fig. 11). En la Fig. 12 se presentan imágenes representativas de las condiciones que se usaron en el experimento en el cual se bloqueó la protección que la curcumina ejerció ante estrés oxidante.

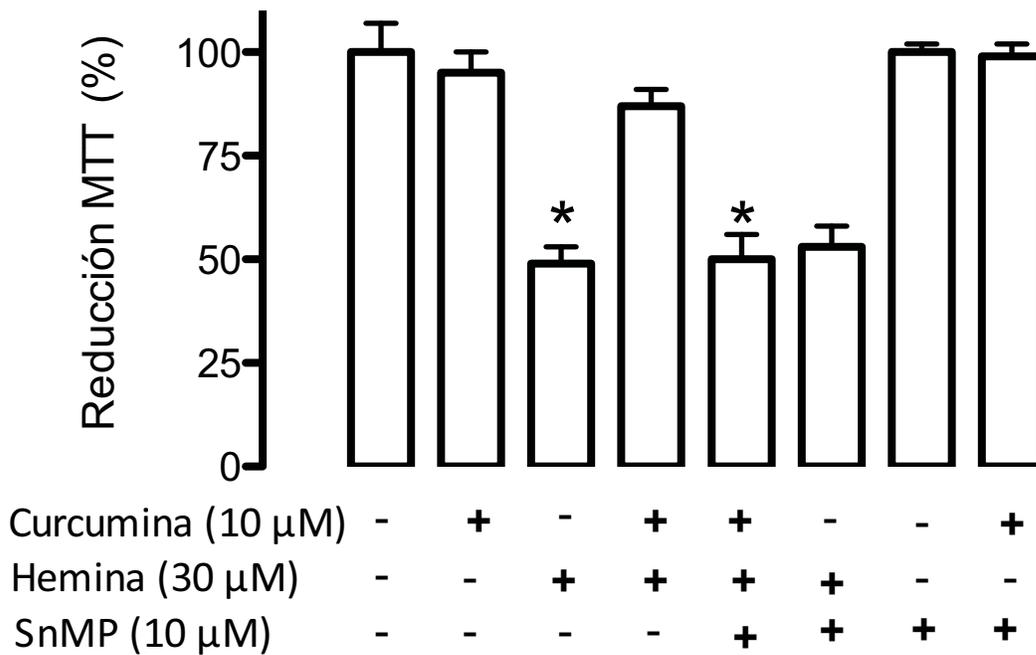


Fig. 11. Efecto del inhibidor SnMP sobre la viabilidad de NGC pre-incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de curcumina y expuestas a hemina. Las neuronas se incubaron con 10  $\mu\text{M}$  de SnMP por 15 min y se adicionó hemina por 1 h. Posteriormente el tóxico se eliminó y se añadió medio fresco y se incubó con el inhibidor por 24 h más. Finalmente, la viabilidad celular se cuantificó por la reducción de MTT. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM; n = 6. \*P<0.05 vs. 0  $\mu\text{M}$ .

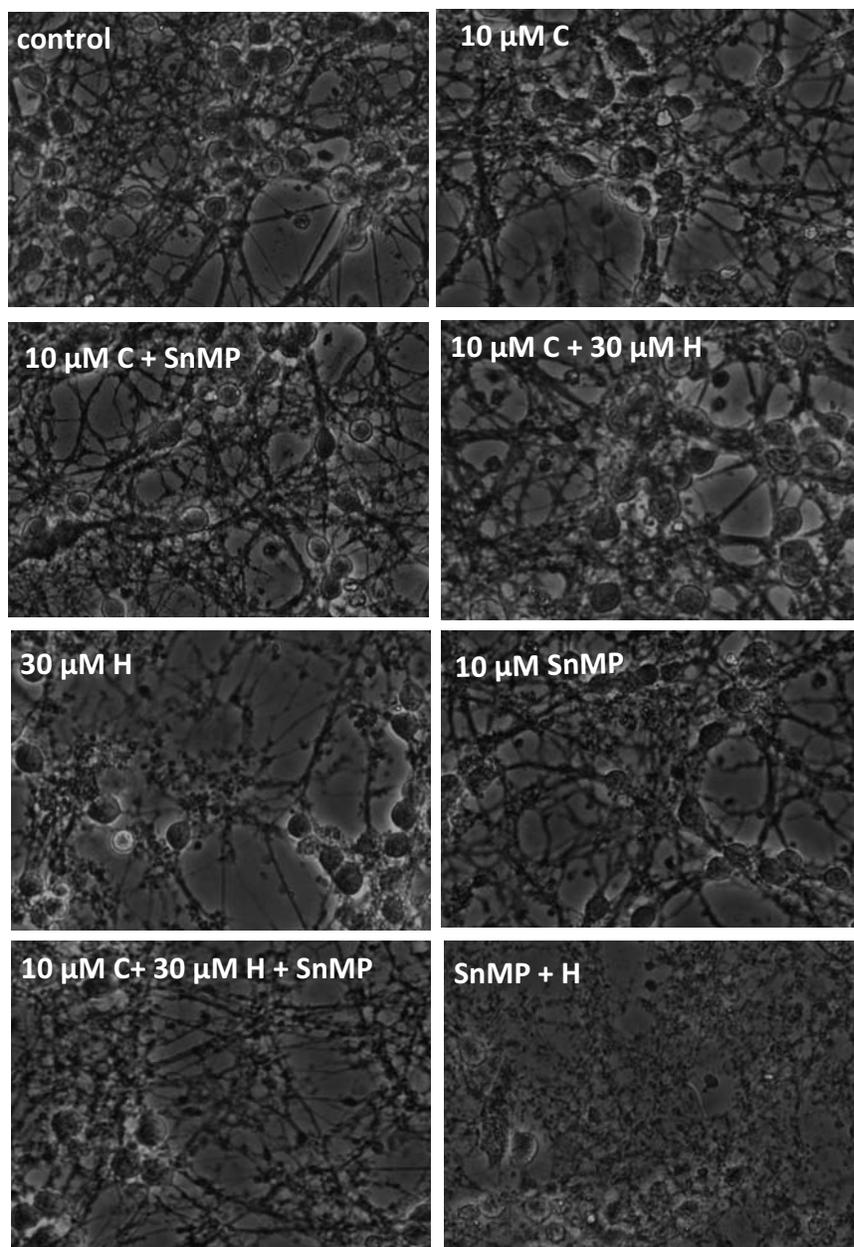


Fig. 12. Imágenes representativas de la morfología de las NGC sobre el efecto del pre-tratamiento con curcumina (C) y posterior exposición con la hemina (H) y con el SnMP. Campo claro, aumento 40X.

Por otra parte, se evaluó la participación del GSH como el antioxidante endógeno más abundante en el sistema. Se midió la viabilidad celular de las neuronas que se pre-incubaron con 15  $\mu\text{M}$  de curcumina y que posteriormente se expusieron a 25  $\mu\text{M}$  de BSO (concentración que no afecta la viabilidad celular). Este compuesto se adicionó 1 h antes de agregar la hemina y permaneció durante todo el ensayo. El BSO bloqueó la protección

de la curcumina de manera significativa (Fig. 13). Este evento sugiere que la presencia del GSH tiene un papel importante en la protección.

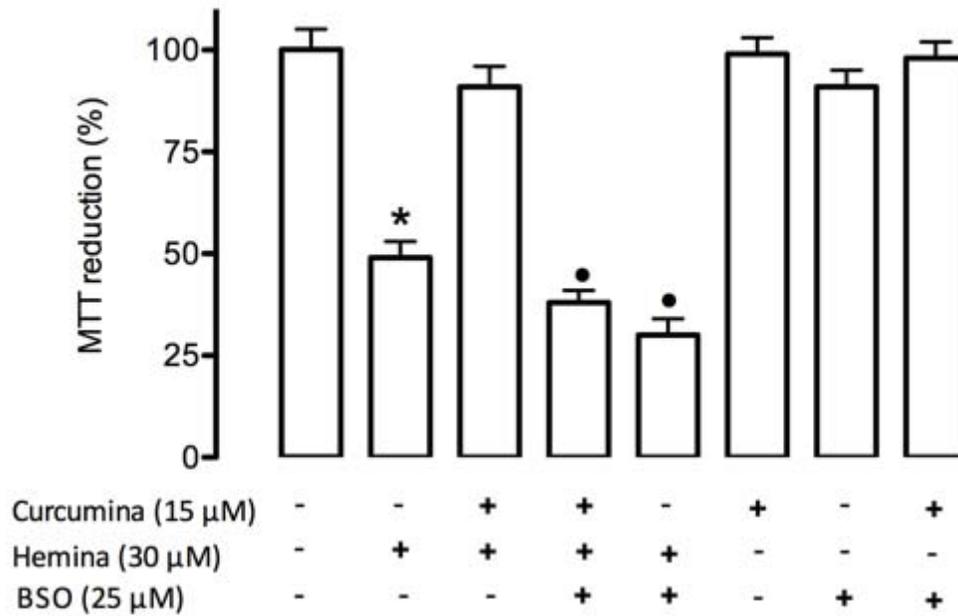


Fig. 13. Efecto del inhibidor BSO sobre la viabilidad de NGC pre-incubadas con 15 μM de curcumina y expuestas a hemina. Las neuronas se incubaron con 25 μM de BSO por 1 h antes de la adición hemina por 1 h. Posteriormente el tóxico se eliminó y se puso medio fresco y se incubó con el inhibidor por 24 h más. Finalmente, la viabilidad celular se cuantificó por la reducción de MTT. Los datos se expresan como media±EEM; n = 6. \*P<0.05 vs. 0 μM •P<0.001 vs. hemina.

**El sistema GSH en los cultivos de NGC incubados con curcumina y expuestos a hemina.**

Las NGC se incubaron con curcumina (0-30 μM) y se midió la cantidad de GSH, el GSSG y la cantidad de [GSH] + [GSSG]. La curcumina aumentó el contenido de [GSH] + [GSSG] que se debe principalmente al GSH, pues el contenido de GSSG es bajo (Fig. 14).

Por otra parte, la hemina aumenta los niveles totales de GSH, esto es, la suma de GSH y GSSG. Sin embargo esto se explica porque aumenta el contenido de GSSG y disminuye los

niveles de GSH reducido. Las pre incubaciones con 15  $\mu\text{M}$  de curcumina evitaron la disminución de GSH y el aumento de GSSG, inducidos por hemina (Fig. 15).

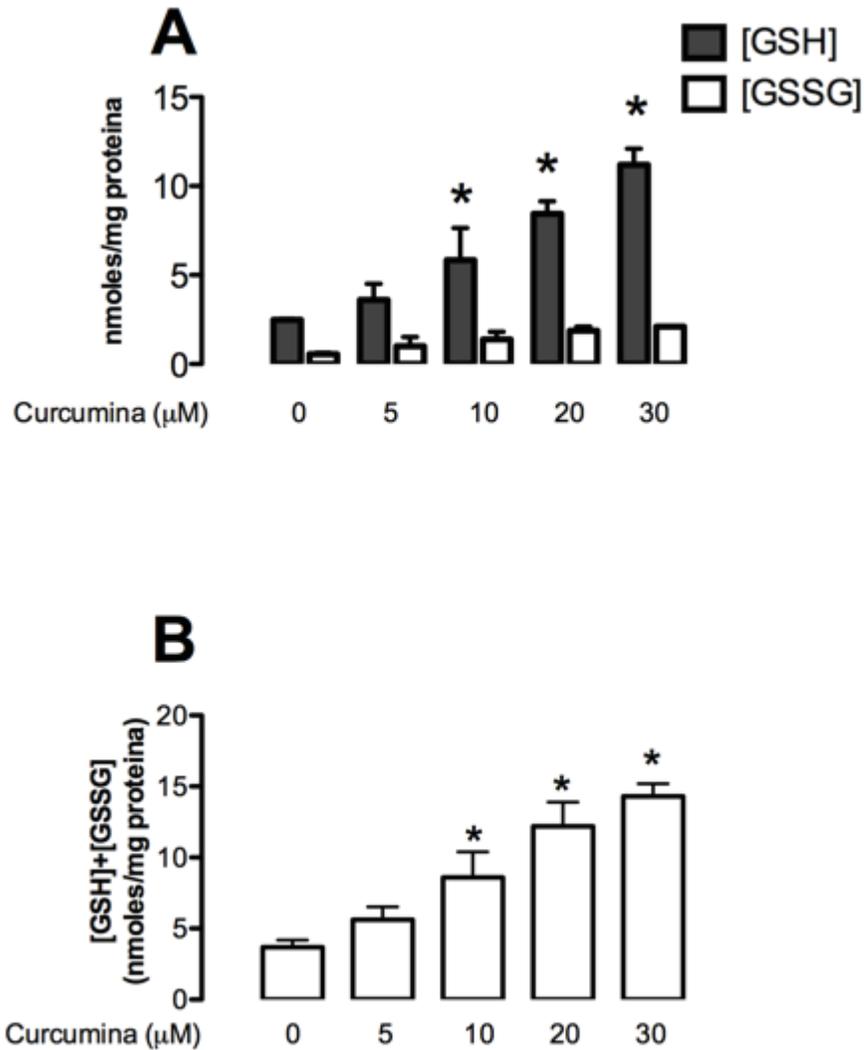


Fig. 14. Efecto de la pre-incubación de curcumina en los niveles de GSH y GSSG. Las neuronas se incubaron con 5-30  $\mu\text{M}$  de curcumina por 24 h. A. niveles de GSH y GSSG en NGC, B. niveles totales de GSH, [GSH]+[GSSG] en NGC. Los datos se expresaron como media $\pm$ EEM; n = 4. \*P<0.05 vs. 0  $\mu\text{M}$ .

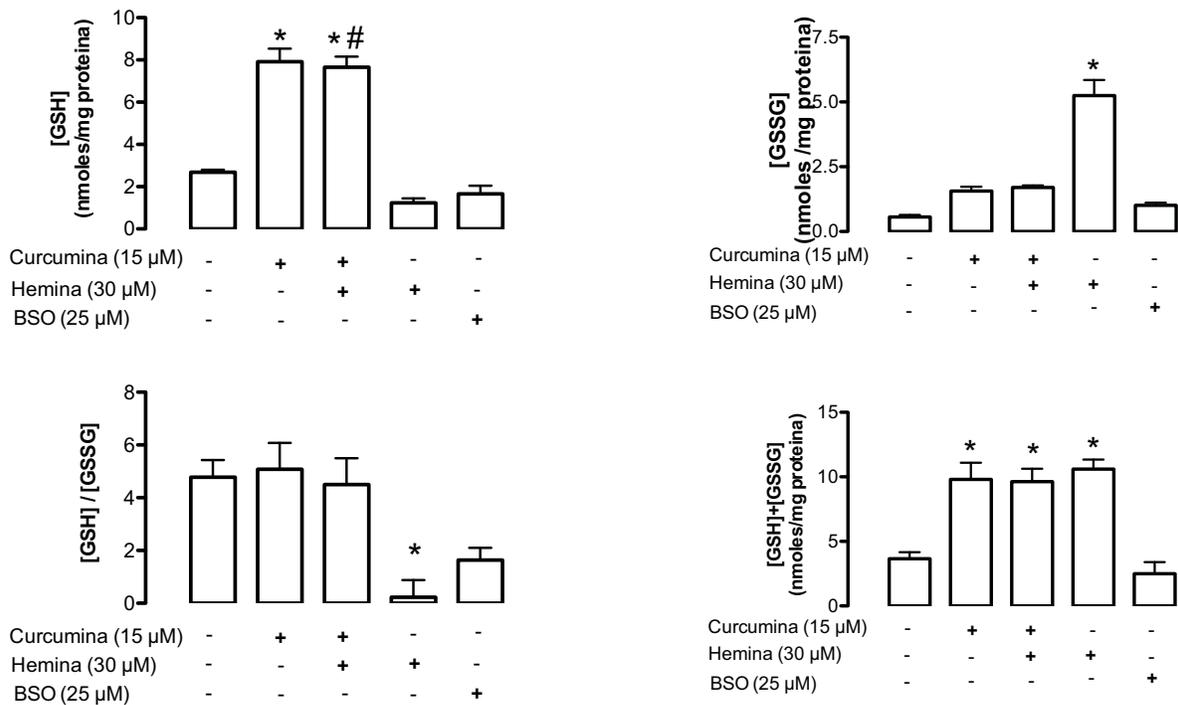


Fig. 15. Efecto de la pre-incubación de curcumina en NGC expuestas a hemina sobre los niveles de GSH y GSSG. Las neuronas se incubaron con 15  $\mu$ M de curcumina por 24 h y se adicionó hemina. El BSO se usó como control. A. Niveles de GSH, cuantificación fluorométrica, B. Niveles de GSSG, C. relación GSH/GSSG, D. Niveles totales de GSH, [GSH]+[GSSG] en NGC. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM; n = 4. \*P<0.05 vs. 0  $\mu$ M, # P<0.05 vs. hemina.

### Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes.

Se evaluaron las enzimas antioxidantes GST, GR y SOD para tener un panorama más completo del sistema antioxidante que podría tener una contribución con el efecto de pre-incubar la curcumina antes del reto tóxico. Se observó que en estas enzimas aumentó la actividad después de 24 h de tratamiento con curcumina y que se mantuvo aumentada aún con 24 h de recuperación. En el tratamiento de curcumina y hemina se encontró que la actividad se mantuvo aumentada aunque el cambio no logró ser significativo con respecto a las células sin tratamiento (Fig. 16).

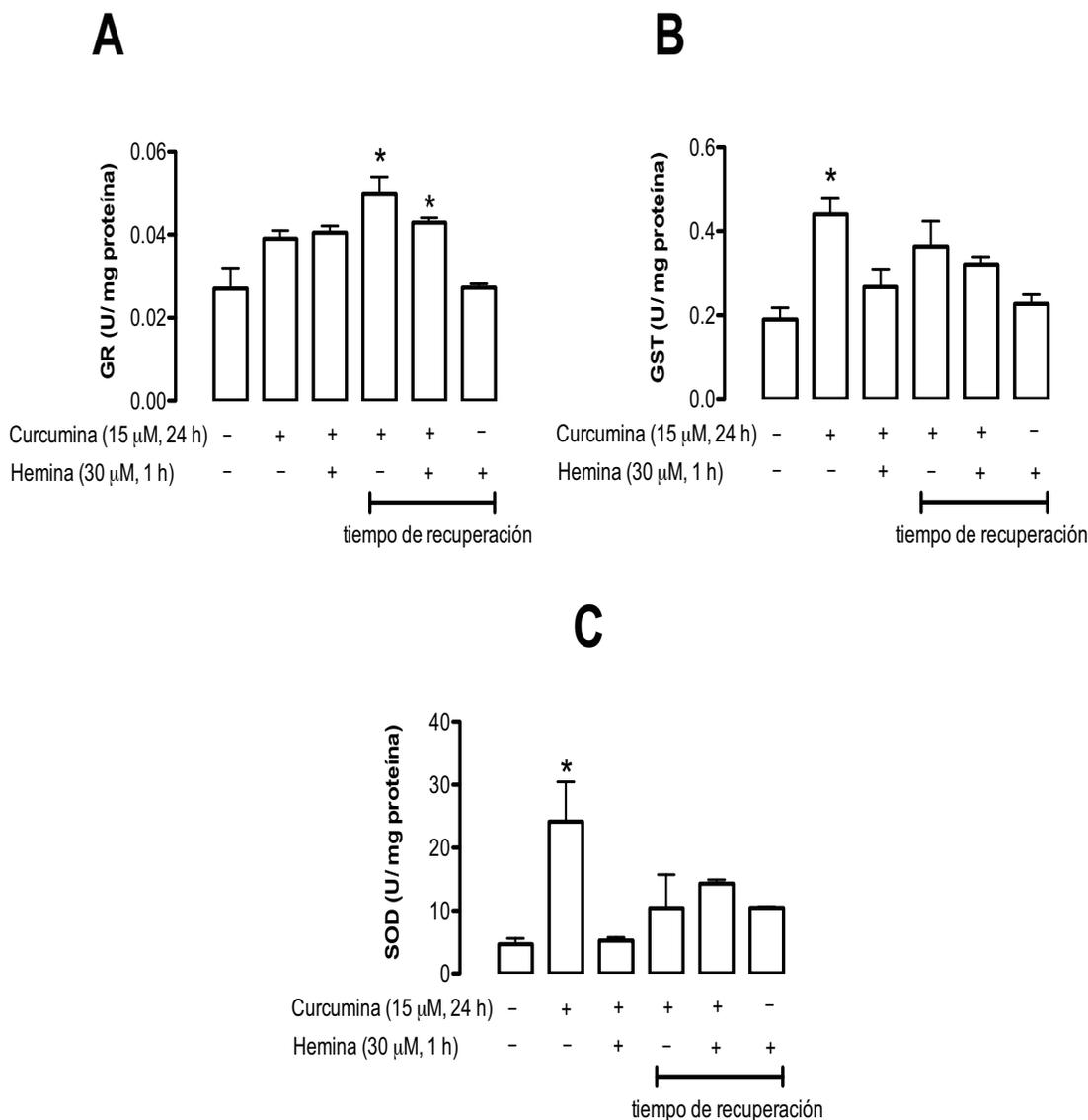
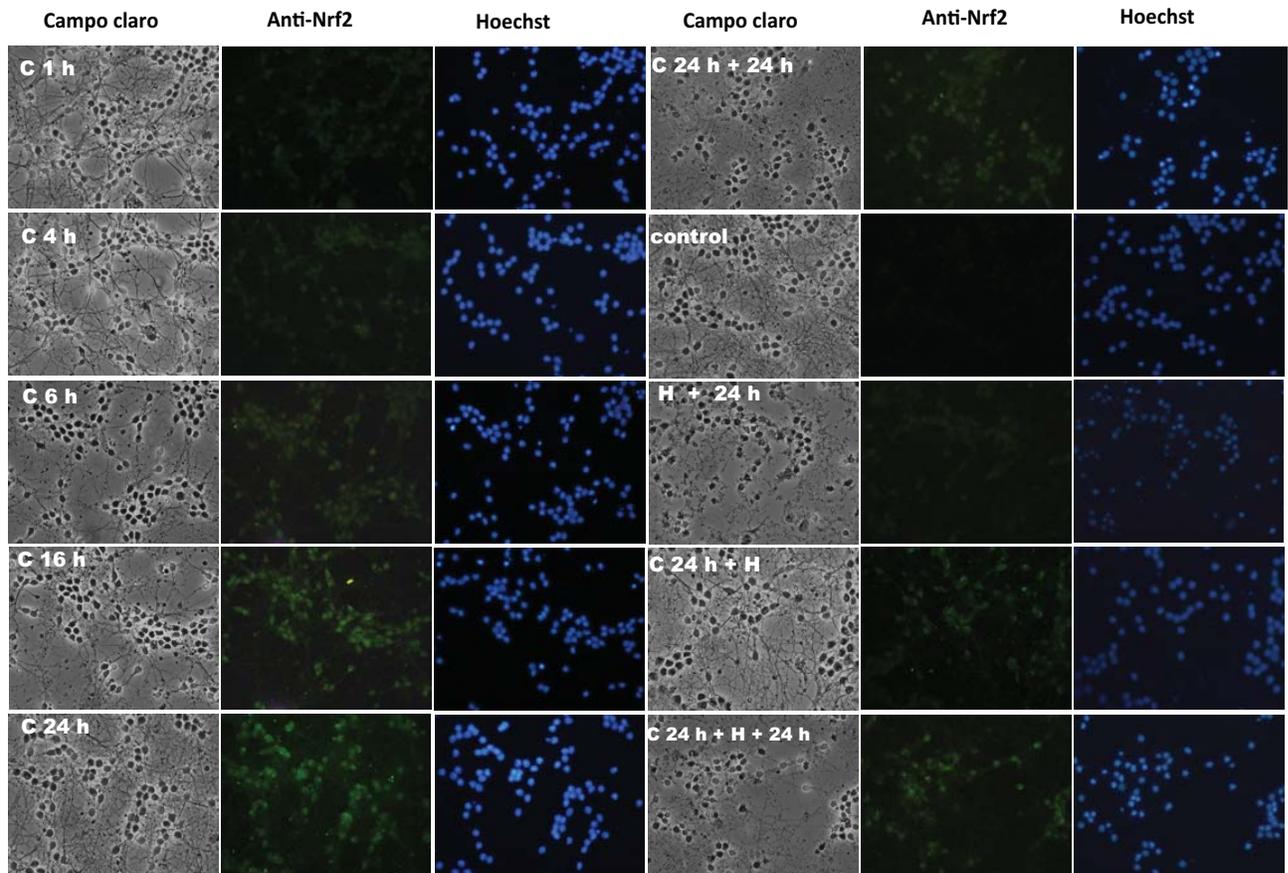


Fig. 16. Efecto de la curcumina sobre la actividad de enzimas antioxidantes. (arriba) GR, (medio) GST y (abajo) SOD. Las células se incubaron con la curcumina 15  $\mu$ M por 24 h, antes del tratamiento con hemina o en su caso se dejaron las células recuperándose 24 h. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM; n = 3-5. \*P $\leq$  0.05 vs 0  $\mu$ M.

### Efecto de la curcumina sobre Nrf2.

Con base en lo anterior, en el que hay un sistema antioxidante activado o aumentado en sus niveles por efecto de la curcumina, que permanece después del reto con hemina, se planteó averiguar si el factor Nrf2 estaba involucrado en el proceso. Lo anterior se

determinó con una inmunocitoquímica para observar la presencia en el núcleo y con la actividad transcripcional de Nrf2. Se observó que la incubación con 15  $\mu$ M de curcumina indujo la traslocación de Nrf2 al núcleo desde las 6 h y permaneció hasta 24 h, esto es en el tiempo de recuperación, y la hemina no traslocó a Nrf2 al núcleo de manera significativa (Fig. 17A, B). Asimismo, se observó que hubo una activación de Nrf2 y que esta permaneció en cuanto estuvo mezclado curcumina y hemina (Fig. 17C).



A

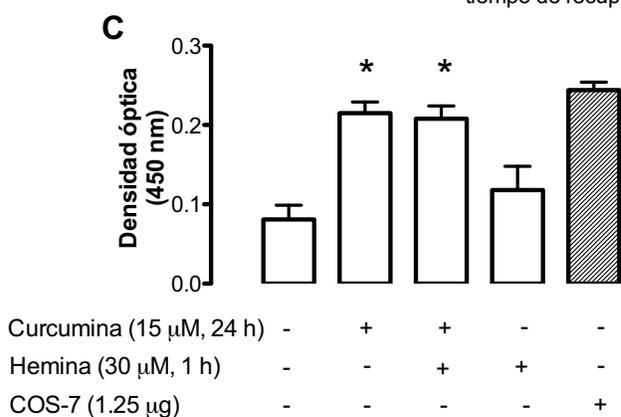
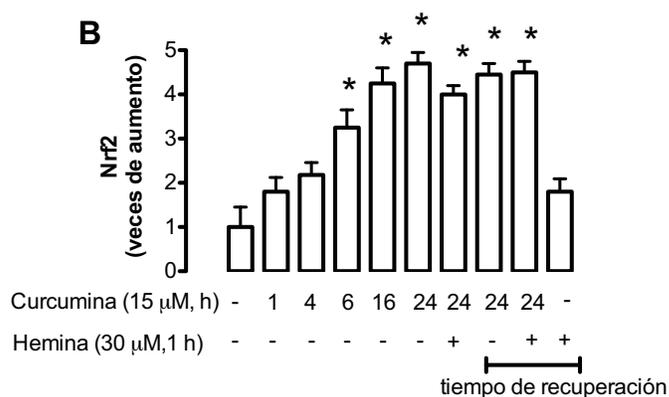
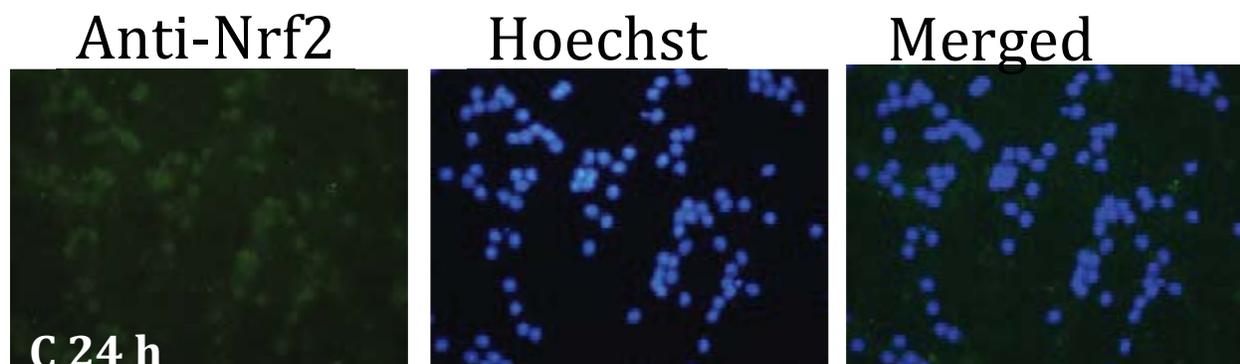


Fig 17. La curcumina traslocó al núcleo y activo a Nrf2 en NGC. Las células tratadas con 15 μM de curcumina (C) por 1, 4, 6, 16 y 24 h. La hemina (H) se dejó 1h en las células. Para los co-tratamientos la curcumina se añadió 24 h previas a la exposición con hemina. Las C24 h + 24 h, C24 h + H, C24 h + H + 24 h, tienen un tiempo de recuperación de 24 h. A. Imágenes representativas de la inmunocitoquímica para Nrf2 y la señal nuclear con Hoechst 33258. Lado izquierdo, campo claro; medio, Nrf2; derecho, Hoechst 33258. B. Cuantificación de la fluorescencia obtenida de 5 fotografías por pozo por condición. C. Actividad transcripcional de Nrf2 cuantificada espectrofotométricamente, las NGC se trataron con 15 μM de curcumina por 24 h y en su caso se adicionó hemina por 1 h. Las células COS-7 se usaron como control positivo de la actividad. Los datos se expresan como media ± SEM; n = 3. \*P ≤ 0.05 vs 0 μM.

## RESUMEN DE RESULTADOS.

La curcumina es un antioxidante que protege del estrés oxidante por hemina a las NGC en cultivo. La hemina es un tóxico potencialmente importante en el sistema nervioso central porque es la forma oxidada del grupo hemo y su presencia puede aumentar en algún daño cerebrovascular. La protección de las NGC está medida por la inducción de la HO-1 y el aumento en la cantidad de GSH así como de las enzimas GR, GST y SOD cuando las células se incuban con 15  $\mu$ M de curcumina por 24 h previas a la presencia de hemina. El factor Nrf2 se traslada al núcleo y se activa con la presencia de curcumina por 24 h previas al daño.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la funcionalidad antioxidante de la curcumina ante un evento de estrés oxidante. Un antioxidante bifuncional se caracteriza por la habilidad de atrapar ROS de manera directa y de inducir enzimas de fase II o de citoprotección. La curcumina tiene esas dos características y al igual que otros compuestos provenientes de fuentes naturales el interés de estudiar su mecanismo de acción ha aumentado considerablemente (Kelsey *et al.*, 2010).

La curcumina es un compuesto pleitrópico pues la cantidad de blancos moleculares como cinasas, factores de transcripción, ciclinas, componentes epigénéticos, entre otros, lo que le confiere características terapéuticas muy atractivas (Thangapazham *et al.*, 2006).

El estudio de la curcumina en muchos modelos genera la posibilidad de considerar a este abundante componente del t urmerico como un agente protector. Sin embargo, a pesar que en la base de datos de Pubmed hay m as de 6, 000 artículos con tema principal curcumina y sus efectos biológicos, es importante tener en cuenta el legado de Paracelso, que indica "Todo puede ser un veneno dependiendo de la dosis". Esta idea está muy relacionada al término de hormesis, que involucra de modo sustancial el mecanismo de acción de un mismo compuesto dependiendo de la concentración. La curcumina es

considerada como un agente hormético, ya que también presenta características pro-oxidantes. En condiciones de hormesis se genera un estado de estrés medio para que el sistema pueda responder a una situación de daño (Calabrese *et al.*, 2010).

La funcionalidad química de la curcumina la hace un potenciador de efectos, pues si bien hasta hace poco se consideraba como un compuesto no tóxico y bien tolerado por el organismo, en algunos estudios recientes se ha puesto de manifiesto que tiene efectos adversos (Aggarwal *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2013).

Con base en las ideas anteriores, es relevante evaluar el efecto que tiene la curcumina en un modelo en particular. En este estudio se utilizó un modelo con NGC las cuales son ampliamente usadas para dilucidar mecanismos moleculares (Contestabile, 2002), en particular, se utilizaron las neuronas con 9 días *in vitro*, condición que asemeja a la neuronas de un organismo maduro.

Por otra parte, la hemina se eligió como generador de daño por su posible relevancia fisiológica al ser un producto de la oxidación de la hemoglobina que puede ser liberada en cualquier proceso de daño cerebral como hematomas o derrames cerebrales (Qureshi *et al.*, 2009). La hemina es degradada por la actividad de HO generando subproductos que tienen funcionalidad biológica en condiciones en las cuales no se producen en exceso (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009; González-Reyes *et al.*, 2009). Sin embargo, en eventos en los cuales la exposición al sustrato es grande, como es caso de alguna hemorragia, se puede dar una situación deletérea para el organismo. Se ha sugerido que el Fe libre es el principal mediador del daño después de la actividad de HO pues su presencia aumenta la posibilidad de generar  $\bullet\text{OH}$  y, por lo tanto, de que ocurra la lipoperoxidación. En este sentido la actividad de la HO resulta contradictoria. Más allá de la cantidad de Fe libre que no es la causa fundamental de daño en astrocitos y NGC de rata (Dang *et al.*, 2011a; Dang *et al.*, 2011b) está la idea de que el consumo energético para degradar a la hemina es lo que afecta a la célula. Se requieren siete electrones del NADPH para romper a la hemina hasta biliverdina. La degradación continua de hemina podría consumir grandes cantidades de NADPH creando con ello un serio problema en el cerebro con hemorragia, puesto que el NADPH citosólico es regenerado esencialmente por la vía de las pentosas

fosfato, ruta que podría ser menos activa en las condiciones de hipoglucemia que envuelven al daño. Además de la actividad de HO, el NADPH es necesario para regenerar GSH a partir de GSSG, lo que aumentaría la presencia de ROS, generando daño celular al tener disminuído el sistema antioxidante endógeno (Robinson *et al.*, 2009; Liddell *et al.*, 2006). En estudios recientes, se ha descrito que la exportación de la hemina es un evento importante para disminuir la toxicidad de este compuesto, la unión a albúmina o deferoxamina permiten la exportación y en las neuronas es mayor (Che-Roetling *et al.*, 2014).

En este trabajo las condiciones de daño oxidante que se utilizaron fueron con 30  $\mu\text{M}$  de hemina por 1 h de incubación en las NGC, lo que produjo una disminución en la viabilidad celular y un aumento en la cantidad de ROS. Además que la actividad de HO no se aumentó significativamente, lo cual correlaciona con datos previos (Dang *et al.*, 2011a).

Antes de evaluar el efecto de la curcumina sobre las NGC, se confirmó la actividad atrapadora de ROS. Se emplearon ensayos fluorométricos que demostraron que la curcumina con alta pureza utilizada en este estudio posee actividad comparable a los compuestos de referencia y es este curcuminóide y no otro el que estaba ejerciendo algún efecto.

La curcumina en concentraciones bajas (hasta 30  $\mu\text{M}$ ) no afecta de manera sustancial la viabilidad celular de las NGC. No obstante, se prefirió utilizar concentraciones entre 5 y 15  $\mu\text{M}$  para determinar el efecto de la curcumina, para estar en las concentraciones más bajas sin efecto tóxico que puedan generar un efecto protector

Para probar su papel de antioxidante bifuncional se propusieron dos estrategias. La primera fue para evaluar su papel directo, al utilizar tiempos cortos de incubación antes de la hemina y dejar a la curcumina presente todo el tiempo para que ejerciera su papel de atrapador de ROS. Este esquema falló en generar protección y de hecho se magnificó el daño medido como viabilidad celular. Esto se relaciona con lo antes descrito en un modelo con células HepG2 donde la curcumina con incubaciones de un par de horas no

protegió del daño por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen *et al.*, 2011). La explicación es que en el período inicial la curcumina se autooxida y genera un aumento de ROS lo que se suma al estrés con el tóxico utilizado (Sandur *et al.*, 2007; Griesser *et al.*, 2011).

El segundo esquema experimental para evaluar el papel de antioxidante indirecto mediante la inducción de enzimas citoprotectoras fue de pre-tratamientos con curcumina por 24 h previas al daño. Bajo este procedimiento se observó una prevención del daño oxidante, puesto que la muerte celular y la producción de ROS se atenuaron. En este sentido, la inducción de enzimas citoprotectoras podría tener una función importante. En este estudio la curcumina aumentó los niveles de HO-1, el contenido de GSH y la actividad de enzimas como GR, GST y SOD involucradas tanto en el ciclo redox del GSH así como en el atrapamiento de ROS.

Se ha descrito que estas enzimas citoprotectoras están reguladas en gran medida por el factor de transcripción Nrf2 (Esatbeyoglu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Bajo condiciones normales Nrf2 está unido a Keap-1 en un dímero. El represor Keap-1 es una molécula con una gran cantidad de cisteínas en su composición y al menos cinco son esenciales para regular la unión a Nrf2 y llevarlo a degradación proteosomal (Turpaev, 2013). La proteína Keap-1 se considera un sensor redox pues en presencia de un electrófilo o compuesto generador de estrés pueden oxidarse algunas cisteínas y causar la separación de Nrf2, permitiendo con ello su exportación al núcleo para que se lleve a cabo la transcripción de los genes de las enzimas citoprotectoras (Esatbeyoglu *et al.*, 2012; Lee & Johnson, 2004). Aún no se sabe con certeza cual es la cisteína blanco en Keap-1 por parte de la curcumina, como es el caso del sulforafano en que la cisteína 151 es la que se modifica (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002). Lo que sí se sabe es que curcumina modifica el ambiente redox y oxida las cisteínas al llevarse a cabo su proceso autooxidativo en el que se empieza a modificar su estructura para posteriormente ser activador de genes de enzimas de fase II (Dinkova-Kostova *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2011).

En varios estudios *in vivo* e *in vitro* se demostró que la curcumina activó la señalización de Nrf2 (Balogun *et al.*, 2003; Scapagnini *et al.*, 2006, Jiang *et al.*, 2011). En este trabajo se investigó cuál es el efecto de la curcumina sobre el Nrf2 en la exposición de horas de este

compuesto en las NGC. Se hizo un análisis temporal a partir de 30 min y no se observó una señal para Nrf2 mediante inmunocitoquímica, sino después de las 8 h, permaneciendo hasta después de 24 h posteriores al retiro de curcumina. Este evento sugiere que la proteína de Nrf2 pudiera estar en un proceso de estabilización, además de acumularse gradualmente, sin llegar a tener niveles tóxicos para la célula. No sólo se observó la señal de traslación al núcleo, sino que también hubo una activación de Nrf2. El tiempo de activación de Nrf2 por curcumina coincide con la mayor actividad de las enzimas GR, GST y SOD.

Sin embargo, la función de Nrf2 en las NGC solo está ligado a la mayor actividad de Nrf2 y de las enzimas. Puesto que habría que disminuir o prescindir de Nrf2 para averiguar si aún así hay mayor actividad de las enzimas.

No está completamente dilucidado cómo es que la curcumina activa a Nrf2, porque si el solo hecho de generar un estrés fuera requerido, la hemina podría haber activado a Nrf2, lo cual no se observó con este compuesto *per se* ni con la mezcla con curcumina.

Las modificaciones químicas que sufre la curcumina cuando entra a las células es parte de su potencial uso, al igual que otros fitoquímicos como es el caso de la quercetina, la cual activó también a Nrf2 en NGC a tiempos largos de incubación (Arredondo *et al.*, 2010). Además, si el estatus de GSH como una relación GSH/GSSG estuviera desequilibrado al estar presente curcumina, la relación hubiera bajado, considerando un estrés oxidante por el aumento progresivo del GSSG. Por el contrario, lo que se observó fue un aumento del contenido de GSH, el cual se mantuvo aún en presencia de hemina, la cual sí genera una disminución de la relación GSH/GSSG.

En astrocitos se ha observado que la presencia de GSH atenúa la inflamación y el daño de lipoperoxidación que conduce a la necrotosis (una forma alternativa de regular la necrosis que procede vía un mecanismo independiente de caspasas, Degterev *et al.*, 2005) generada con la hemina (Laird *et al.*, 2008).

Los resultados en conjunto sugieren que la participación de curcumina para aumentar el sistema antioxidante endógeno es importante cuando existe un daño oxidante. Teniendo

en contexto la cantidad de compuesto a usar así como el tiempo de exposición para evitar un daño al organismo con un compuesto con curcumina.

## **CONCLUSIÓN.**

La actividad antioxidante directa de curcumina no previno la muerte celular de los cultivos neuronales.

La función antioxidante indirecta de curcumina, con el pre-tratamiento por 24 h de las NGC, activa y traslada a Nrf2 al núcleo con la consecuente inducción del sistema antioxidante enzimático y no enzimático que promueve protección contra el estrés oxidante por hemina.

La HO-1 y el glutatión tienen un papel importante en evitar la muerte, manteniendo los niveles de proteína y contenido, respectivamente.

## **PERPECTIVAS.**

La participación de Nrf2 puede ser evaluada desde otras alternativas como serían evaluar la cantidad de la proteína que se encuentra en el citoplasma y en el núcleo para verificar que haya una traslación. Además de tener un mecanismo en el que se disminuya la cantidad de Nrf2 en el núcleo para medir la actividad de las enzimas GR, GST y SOD y determinar que la presencia de Nrf2 está implicado en el proceso de citoprotección en las NGC.

También puede evaluarse la parte prooxidante de la curcumina en las horas iniciales de incubación, donde se modifica la estructura del compuesto y de esta manera determinar si hay un efecto de hormesis en el proceso.

## REFERENCIAS

- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. 2007. Curcumin: The Indian solid gold (molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 595: 1-75.
- Andreadi CK, Howells LM, Atherfold PA, Manson MM. 2006. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Molecular Pharmacology* 69:1033-1040.
- Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. 2012. Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18. *Amino Acids* 42(1):163-169.
- Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antúnez K, Jones DP, Go YM, Liang YL, Dajas F. 2010. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology & Medicine* 49(5):738-747.
- Azzi A, Davies KJA, Kelly Frank. 2004. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Letters* 558: 3-6
- Balongun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *The Biochemical Journal* 371: 887-895.
- Barone E, Di Domenico F, Mancuso C, Butterfield DA. 2014. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: It's time for reconciliation. *Neurobiology of Disease* 62: 144-159
- Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. 2011. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One* 6(10):e26012
- Beckman JS, Chen H, Ischiropulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymology* 1994; 233: 229-240.
- Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 303(2):474-82.
- Bindokas VP, Ishida AT: Conotoxin-sensitive and conotoxin-resistant Ca<sup>2+</sup> currents in fish retinal ganglion cells. *Journal of neurobiology* 1996, 29(4):429-444.
- Brito MA, Brites D, Butterfield DA. 2004. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *Brain Research* 1026: 33-43.
- Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Calabrese EJ, Mattson MP. 2010. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxidant Redox Signal* 13(11): 1763-811.

- Choi AMK & Alam J. 1996. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 15: 9-19.
- Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2011. No protective effect of curcumin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacological Reports* 63(3):724-32.
- Chen-Roetling J, Cai Y, Lu X, Regan RF. 2014. Hemin uptake and release by neurons and glia. *Free Radical Research* 48: 200-205
- Chiueh CC. 2001. Iron overload, oxidative stress, and axonal dystrophy in brain disorders. *Pediatric Neurology* 25: 138-147.
- Contestabile A. 2002. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum* 1(1):41-55.
- Dang TN, Robinson SR, Dringen R, Bishop GM. 2011(a). Uptake, metabolism and toxicity of hemin in cultured neurons. *Neurochemistry International* 58: 804-811.
- Dang TN, Bishop GM, Dringen R, Robinson SR. 2011(b). The metabolism and toxicity of hemin in astrocytes. *Glia* 59(10):1540-50.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 1:112-119.
- Dinkova-Kostova AT & Talalay P. 1999. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20: 911-914.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 99(18):11908-13.
- Dolphin D, Poulson R, Avramovic O, Eds. 1989. *Glutathione: Chemical, Biochemical and Metabolic Aspects*, Vols. A and B, J. Wiley and Sons, New York, USA.
- Doré S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. 1999. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 96: 2445-2450.
- Dringen R, Hirrlinger J. 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biological Chemistry* 384(4):505-516.
- Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. 2012. Curcumin--from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition in English* 51(22):5308-32.
- Fernández-Checa, JC & Kaplowitz N. 1990. The Use of Monochlorobimane to Determine Hepatic GSH Levels and Synthesis. *Analytical Biochemistry* 190: 212-219.
- Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A. 1998. Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Seminars in Liver Disease* 18(4):389-401.

- Franklin JL. 2011. Redox Regulation of the Intrinsic Pathway in Neuronal Apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* 8: 1437-1448.
- 
- González-Reyes S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. 2009. Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radical Research* 43(3):214-23.
- Gordon ON, Schneider C. 2012. Vanillin and ferulic acid: not the major degradation products of curcumin. *Trends in Molecular Medicine* 18(7):361-363.
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. 2010. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 323-354.
- Griesser M, Pistis V, Suzuki T, Tejera N, Pratt DA, Schneider C. 2011. Autoxidative and cyclooxygenase-2 catalyzed transformation of the dietary chemopreventive agent curcumin. *Journal of Biology and Chemistry* 286: 1114-1124
- Griffith, OW. 1980. Determination of glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.
- Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB. 2011. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural Product Report* 28: 1937-1955.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. New York, NY: Oxford University Press. New York, USA.
- Hill-Kapturczak N, Thamilselvan V, Liu FY, Nicj HS, Agarwal A. 2001. Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells *The American Journal of Physiology* 281: F851-F859.
- Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. 1994. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Research* 54: 5841-5847.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J and Prior R. 2002. High-throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:4437-4444.
- Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. 2007. Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- $\gamma$  activation. *PPAR Research* 2007:89369.
- Jain AK & Jaiswal AK. 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry* 281:12132-12142.
- Jaiswal AK. 2000. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology & Medicine* 29: 254-262.
- Jaiswal AK. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology & Medicine* 36:1199-1207.
- Jenner P. 1994. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344:796-798.
- Jiang H, Tian X, Guo Y, Duan W, Bu H, Li C. 2011. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 cytoprotective signaling by curcumin protect primary

- spinal cord astrocytes against oxidative toxicity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34(8):1194-7.
- Jones EA, Shahed A, Shoskes DA. 2000. Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction. *Urology* 56: 346-351.
  - Jovanovic SV, Boone CW, Streenken S, Trinoga M, Kaskey RB. 2001. How curcumin works preferentially with water soluble antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 123:3064-3068.
  - Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology* 1: 244-257.
  - Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. 2010. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 15(11):7792-814.
  - Kim JM, Araski S, Kim DJ, Park CB, Takasuka N, Baba-Toiyama H, Ota T, Nir Z, Khachik F, Shimidzu N, Tanaka Y, Osawa T, Uraji T, Murakoshi M, Nishino H, Tsuda H. 1998. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* 19: 81-85.
  - Kim HS, Quon MJ, Kim JA. 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate *Redox Biology* 10:187-195
  - Konisberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas. Manual moderno. México, D.F.*
  - Kremer ML. 1989. The reaction of hemin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *European Journal of Biochemistry* 185: 651-658.
  - Kunchandy E & Rao MNA. 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmacology* 58: 237-240.
  - Laird MD, Wakade C, Alleyne CH Jr, Dhandapani KM. 2008. Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes. *Free Radical Biology & Medicine* 45(8):1103-14.
  - Lee JM, Johnson JA. 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37: 139-143.
  - Lee WH, Loo CY, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. 2013. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current Neuropharmacology* 11(4):338-378.
  - Li Y, Paonessa JD, Zhang Y. 2012. Mechanism of chemical activation of Nrf2. *PLoS One* 7: e35122.
  - Liddell JR, Hoepken HH, Crack PJ, Robinson SR, Dringen R. 2006. Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity. *Journal of Neuroscience Research* 84: 578-586.
  - Lima CF, Pereira-Wilson C, Rattan SI. 2011. Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: relevance for anti-aging intervention. *Molecular Nutrition & Food Research* 55(3):430-42.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-75.
- Maines MD, Panahian N. 2001. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Advances in Experimental Medicine and Biology* 502: 249–272.
- Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37: 517–554.
- Maines MD. 2005. New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology (Bethesda)* 20: 382–389.
- Mancuso C, Bonsignore A, Di Stasio E, Mordente A, Motterlini R. 2003. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochemistry Pharmacology* 66: 2355–2363.
- Mancuso C, Tringali G, Grossman A, Preziosi P, Navarra P. 1998. The generation of nitric oxide and carbon monoxide produces opposite effects on the release of immunoreactive interleukin-1 $\beta$  from the rat hypothalamus in vitro: evidence for the involvement of different signaling pathways. *Endocrinology* 139: 1031–1037.
- Markesbery, WR. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 134–147.
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Díaz R, Gallardo G, Alam J, Ruiz C, Cuadrado A. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *Journal of Biological Chemistry* 279:8919-8929.
- Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J, 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 45(10):2030-2039.
- Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ. 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 28: 1303-1312
- Mukundan MA, Chacko MC, Annapurna VV, Krishnaswamy K. 1993. Effect of turmeric and curcumin on BP-DNA adducts. *Carcinogenesis* 14: 493-496.
- Muller-Eberhard U. 1988. Hemopexin. *Methods Enzymol* 163: 536–565.
- Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. 2002. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism and Related Disorders* 8: 385-387.
- Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe k, Nakashima K. 2003. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Letters* 546: 181-184.
- Nebert DW. 1994. Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochemical Pharmacology* 47: 25-37.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 284(20):13291-5.

- Oberley LWS, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymology* 105:457-464.
- Orozco-Ibarra M, Estrada-Sánchez AM, Massieu L, Pedraza-Chaverrí J. 2009. Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: role of CO and bilirubin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41(6):1304-14.
- Pickett CB, Lu AYH. 1989. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual Review of Biochemistry* 58: 743-764.
- Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DR. 2011. Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA* 17: 792-798.
- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. 2004. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *The Journals of Gerontology. Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 59: 478-493.
- Pugazhenthii S, Akhov L, Sevaraj G, Wang M, Alam J. 2007. Regulation of heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse beta-cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293:645-655.
- Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. 2009. Intracerebral haemorrhage. *Lancet* 373: 1632-1644.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols* 6:3159-3165.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Schoofs A, Davignon J, Poirier J. 2000. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology Diseases* 7:23-37
- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. 2009. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?. *The AAPS Journal* 11: 495-510.
- Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. 2013. Direct and indirect antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular Nutrition and Food Research* 57:114-25
- Robinson SR, Dang TN, Dringen R, Bishop GM. 2009. Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke. *Redox Report* 14(6):228-35.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews* 86:583-650.
- Sa G & Das T. 2008. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell division* 3:14
- Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, Aggarwal BB. 2007. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radical Biology & Medicine* 43: 568-580.

- Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A. 2003. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 278:13898-13904.
- Scapagnini G, Foresti R, Calabrese AM, Guiffrida S, Green CJ, Motterlini R. 2002. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Molecular Pharmacology* 3:554-561.
- Scapagnini G, Colombrita C, Amadio ML, D'agata V, Arcelli E, Sapienza M, Quattrone A, Calabrese V. 2006. Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress. *Antioxidant & Redox Signal* 8: 395-403.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry* 267, 4904 – 4911.
- Sharma KA, Gescher AJ, Steward WP. 2005. Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer* 41:1955-1968.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789–801.
- Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. 2010. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immunity & Ageing* 7:1
- Sreejayan & Rao MNA. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49: 105-107.
- Tietze, F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27: 502-522.
- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The journal AAPS* 8(3):E443-449.
- Tolosano E, Altruda F. 2002. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol* 21(4):297-306.
- Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol* 1(1):448-456.
- Turpaev KT. 2013. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry (Mosc)* 78(2):111-26.
- Urbina-Cano P, Bobadilla-Morales L, Ramirez-Herrera MA, Corona-Rivera JR, Mendoza-Magana ML, Troyo-Sanroman R, Corona-Rivera A. 2006. DNA damage in mouse lymphocytes exposed to curcumin and copper. *Journal of Applied Genetics* 47: 377- 382.
- Valentao P, Fernández E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. 2002. Studies on antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25 (10): 1324-1327

- Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 1867-1876.
- Wang K, Qiu F. 2013. Curcuminoid metabolism and its contribution to the pharmacological effects. *Current drug metabolism* 7:791-806.
- Wozniak M, Tanfani F, Bertoli E, Zolese G, Antosiewicz J. 1991. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1082(1):94-100.
- Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1999. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Research* 826(1):53-62.
- Yanagisawa S, Koarai A, Sugiura H, Ichikawa T, Kanda M, Tanaka R, Akamatsu K, Hirano T, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. 2009. Oxidative stress augments toll-like receptor 8 mediated neutrophilic responses in healthy subjects. *Respiratory Research* 10:50.
- Yan GM, Ni B, Weller M, Wood KA, Paul SM. 1994. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research* 656:43-51.
- Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 100:30-47.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. 1997. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* 253(2):162-168.