



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Efecto de α -mangostina sobre el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en células de Schwann

Tesis para obtener el título de

Bióloga

Presenta

Gabriela García Cerón

Tutora

Dra. Mónica Adriana Torres Ramos

Ciudad Universitaria, Ciudad de México
2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DEL ALUMNO

García
Cerón
Gabriela
5540953109
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311187274

2. DATOS DEL TUTOR

Dra.
Mónica Adriana
Torres
Ramos

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.
Ricardo
Reyes
Chilpa

4. DATOS DEL SINODAL 2

Dr.
José
Pedraza
Chaverri

5. DATOS DEL SINODAL 3

Dr.
Marisol
Orozco
Ibarra

6. DATOS DEL SINODAL 4

Dra.
Silvia Laura
Guzmán
Gutiérrez

7. DATOS DE LA TESIS

Efecto de α -mangostina sobre el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en células de Schwann.
54 p.
2019

Este trabajo fue realizado en la Unidad Periférica de Neurociencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, “Manuel Velasco Suarez” y financiado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (CONACYT-FOSISS 262295).

Agradecimientos

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de ser parte de su comunidad y formarme como Bióloga.

A mi asesora la Dra. Mónica Torres por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y sus enseñanzas.

A los miembros del jurado de examen: Dr. José Pedraza, Dr. Ricardo Reyes, Dra. Laura Guzmán por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus aportaciones para mejorarlo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Marisol Orozco, también miembro del jurado. Por la paciencia, apoyo y enseñanzas que me brindó para mejorar tanto en este trabajo como mi perspectiva de vida.

Al Dr. Aurelio Campos, a la Dra. Norma Serrano, a la Dra. Alma Ortiz y a la QFB. Ana, por sus atenciones, apoyo y por el equipo de trabajo así como el material que nos proporcionaron para la realización de este trabajo.

Dedicatorias

A mis padres Lilia y Paulino, quienes siempre me han apoyado, orientado y dado la libertad de decidir mi camino.

A mi hermano Pablo, por su apoyo incondicional y soportarme siempre. Gracias, eres mi persona favorita.

A mi tía Irma, quien siempre se preocupa por mi bienestar y me apoya.

A mis amigos de la infancia y adolescencia, con quienes he compartido gran parte de este camino: Noheli, Elena, Xime, Viris, Maffer, Tania, Ale, Edson, Rojo y Dayro; aunque el tiempo nos ha llevado por sitios diferentes siempre están ahí para apoyarme y compartir momentos importantes.

A Círculo de la amistad: Fer, Maruri, Cintya, Bris Frie, Alfi, Cabral, Jj, Yayo y Dani; mis amigos de la Facultad con quienes compartí momentos muy especiales, divertidos, caóticos e importantes que me han ayudado a crecer como persona.

A mis amigos de la Facultad, Mariana y Proo, por ser tan bellas personas conmigo, por los momentos compartidos y el apoyo que siempre me brindan.

A mis amigos de lab.: Migue, Karen, Aleida, Víc, Gabo, Gaby y Nichte, con quienes compartí gran parte de mi estancia durante la realización de este trabajo, gracias por los buenos momentos, tanto dentro como fuera del lab., son personas increíbles y aliviaron esa estancia.

Gracias a todos ustedes, por siempre estar cerca de mí, espero que siempre sea de esa manera; por tener un momento para escucharme y compartir tanto. Son personas importantes en mi vida, que quiero de una forma muy especial.

Abreviaturas

DAPI 4', 6-Diaminidino-2-fenidol diclorhidrato

DC Dispersión completa.

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO Dimetilsulfóxido.

HAH Hidrocarburos aromáticos halogenados.

mg Miligramos.

mM Milimolar.

MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

rpm Revoluciones por minuto.

SNP Sistema nervioso periférico.

TCDD 2, 3, 7, 8- Tetraclorodibenzo-p dioxina.

µm Micrómetro.

µM Micromolar.

Índice General

Agradecimientos

Dedicatorias

Abreviaturas.....	I
Índice general.....	II
Índice de figuras y tablas.....	III
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 <i>Garcinia mangostana</i>	2
1.2 Polifenoles.....	3
1.2.1 Xantonas.....	3
1.2.2 Xantona α -mangostina.....	4
1.2.3 Actividad biológica de α -mangostina.....	5
1.3 Ligandos de AhR.....	5
1.3.1 Receptor de hidrocarburos de arilo (AhR).....	7
1.3.2 Vía de señalización de AhR.....	8
1.4 Células Gliales.....	10
1.4.1 Células de Schwann.....	11
1.4.2 Morfología.....	11
1.4.3 Función.....	12
1.4.4 Afecciones en células de Schwann.....	12
2. Justificación.....	13
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
4. Diseño experimental.....	14
5. Materiales y Métodos.....	14
5.1 Materiales.....	14

5.2 Cultivo de línea celular Células de Schwann S16.....	15
5.3 Preparación de la α -mangostina.....	15
5.4 Citotoxicidad.....	16
5.4.1 Reducción MTT.....	16
5.5 Efecto de la α -mangostina sobre el AhR.....	17
5.5.1 Inmunofluorescencia.....	17
5.6 Análisis de la localización e AhR.....	19
5.7 Análisis estadístico.....	19
6. Resultados.....	20
6.1 Cultivo celular Schwann S16.....	20
6.2 Morfología de las células de Schwann S16.....	20
6.3 Confluencia celular.....	22
6.4 Citotoxicidad.....	22
6.5 La α -mangostina produce cambio del AhR en la localización celular.....	25
7. Discusión.....	32
7.1 Cultivo celular Schwann S16.....	32
7.2 Morfología y confluencia de las células de Schwann S16.....	32
7.3 Confluencia y localización celular del AhR en células de Schwann S16.....	33
7.4 Citotoxicidad de la α -mangostina en células de Schwann S16.....	35
7.5 Xantona α -mangostina produce cambio en la localización celular del AhR.....	36
8. Conclusiones.....	38
9. Perspectivas.....	38
10. Bibliografía.....	39

Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1. Corte longitudinal del fruto del mangostán.....	2
Figura 2. Origen biosintético de las xantonas.....	3
Figura 3. Esqueleto de la xantona y sustituyentes.....	4
Figura 4. Estructura química xantona α -mangostina.....	4
Figura 5. Estructura del AhR de humano.....	8
Figura 6. Activación del AhR.....	9
Figura 7. Clasificación de las células gliales de acuerdo a su localización en el SN.....	11
Figura 8. Morfología estrellada, célula de Schwann.....	11
Figura 9. Diseño experimental empleado para el desarrollo del proyecto.....	14
Figura 10. Placa de 24 pozos para conocer la viabilidad de células de Schwann S16, en 24 y 48h.....	16
Figura 11. Placa de 24 pozos –método MTT.....	17
Figura 12. Montaje de las muestras de inmunofluorescencia	18
Figura 13. Morfología células de Schwann S16.....	21
Figura 14. Cambio en la localización del AhR debido a la confluencia celular.....	22
Figura 15. Citotoxicidad de α -mangostina en células de Schwann S16 en 24 h.....	23
Figura 16. Citotoxicidad de α -mangostina en células de Schwann S16 en 48 h.....	24
Figura 17. Efecto de la α -mangostina en la localización celular del AhR producido por el tratamiento de 24 h en células de Schwann S16.....	27
Figura 18. Efecto de la α -mangostina en la localización celular del AhR producido por el tratamiento de 48 h en células de Schwann S16.....	29
Figura 19. Porcentaje de la localización celular del AhR, 24 h.....	30
Figura 20. Porcentaje de la localización celular del AhR, 48 h.....	31

Tablas

Tabla 1. Evidencia de los efectos biológicos de la α -mangostina.....	5
Tabla 2. Ligandos endógenos y exógenos del AhR.....	6
Tabla 3. Preparación de cultivo de células de Schwann S16.....	15
Tabla 4. Establecimiento del cultivo.....	20

Resumen

Introducción: Las xantonas son una subclase de polifenoles sintetizados por plantas, presentan un esqueleto tricíclico con sustituyentes específicos que le confieren propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Las células de Schwann son células gliales presentes en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) que participan en la respuesta inflamatoria. El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) es un factor de transcripción dependiente de ligando, involucrado en el metabolismo de xenobióticos y respuesta inmune. La estructura molecular de las xantonas sugiere que podrían ser ligandos de AhR; por lo tanto, la α -mangostina pudiese ser un ligando de AhR.

Objetivo: Determinar si la xantona α -mangostina modifica la expresión y localización del AhR en células de Schwann S16.

Material y Métodos: Se utilizaron células de Schwann de nervio ciático de *Rattus norvegicus* (S16, ATTC), a partir de las cuales se estableció el cultivo celular para el desarrollo del estudio. Posteriormente se determinó la citotoxicidad de α -mangostina en concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 μ M con ensayos de MTT en tiempos de incubación de 24 h y 48 h. Por consiguiente, para observar el efecto de AhR producido por α -mangostina sobre la expresión y localización de AhR se realizó la técnica de inmunofluorescencia.

Resultados: Las α -mangostina a la concentración de 10 μ M en tiempos de incubación de 24 h y 48 h produce un efecto tóxico en células de Schwann S16. El AhR cambia su localización celular dependiendo de la confluencia celular. En las concentraciones 1, 2.5, 5 y 10 μ M la α -mangostina produce un cambio en la localización celular, ya sea citoplasmática, perinuclear o distribución celular del AhR, en ensayos de 24 y 48 h.

Discusión y Conclusiones: La α -mangostina promueve un cambio en la localización de del AhR en células de Schwann S16; se sugiere que este efecto podría ser por los sustituyentes moleculares del esqueleto de la α -mangostina, los cuales pudieran participar en la cascada de señalización involucrada en la activación del AhR. Si α -mangostina tuviese un efecto sobre el AhR en células de Schwann S16 podría ser útil en la profilaxis o terapias de enfermedades inmunológicas del SNP como la Esclerosis Lateral Amiotrófica y Radiculopatías.

Palabras clave: AhR, Xantona α -mangostina, Células de Schwann.

1. Introducción

1.1 *Garcinia mangostana*

La *Garcinia mangostana* pertenece a la familia Clusiaceae y se le conoce comúnmente como Mangostán, es un árbol tropical al sudeste de Asia, es abundante en lugares tropicales con temperaturas medias mayores a 20°C como Indonesia, Malasia, Sri Lanka, Filipinas y Tailandia (León, 1987).

El árbol alcanza un tamaño de 10 a 25 m de altura, con un tronco central del que salen ramas horizontales opuestas que le dan forma cónica o piramidal, posee un follaje muy denso siempre verde de hojas opuestas, de peciolo corto, son notables por su grosor; son elíptico-ovaladas, de 10 a 20 cm de largo por cinco a 10 cm de ancho, con nervadura central bien marcada y muchos nervios laterales prominentes a las plantas son unisexuales y en cultivo sólo se encuentran pistiladas. Las flores estaminadas salen en grupos de tres a nueve, en pedicelos largos y tienen cuatro sépalos y cuatro pétalos; los estambres muy numerosos aparecen en cuatro grupos y al centro hay un pistilo estéril. El árbol crece lentamente y los primeros frutos aparecen de ocho a 10 años después de la siembra, este es una baya aplanada que tiene en la base cuatro sépalos y en el ápice el estigma dividido en varios lobos en forma de estrella. El color externo varía de rojo a púrpura y el diámetro entre tres y siete centímetros. Al cortar longitudinalmente el fruto aparece primero el pericarpio, rosado y duro (**Figura 1**), con canales laticíferos que exudan líquido amarillo. El centro de la fruta está dividido en gajos blancos y brillantes, cada uno encerrado en una semilla. Es esta pulpa o arilo, de un sabor agri dulce aromático, lo que constituye la parte comestible (León, 1987). Sus principales usos etnobotánicos hacen alusión al tratamiento de las infecciones de la piel, heridas, diarrea, disentería e infecciones del tracto urinario (AMMIM, 2016). El estudio etnobotánico de *Garcinia mangostana* ha incluido otras perspectivas, como la actividad farmacológica ya que se ha encontrado uno de los grandes grupos de moléculas implicado en esta función, el de los polifenoles.



Figura 1. Corte longitudinal del Fruto del mangostán (Zokiva N., 2014)

1.2 Polifenoles

Los polifenoles son productos naturales del metabolismo secundario de las plantas (Delgado, 2015) biosintetizados en sitios específicos como: frutos, hojas, tallos, raíces, semillas, etc. La estructura principal de éstos, se basa en tener uno o más bencenos en el que al menos uno de sus átomos de hidrógeno ha sido sustituido por un grupo hidroxilo [-OH] (Claramunt et al., 2015).

La biosíntesis de los polifenoles tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina o tirosina, y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados: fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano. La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Quiñones et al., 2012).

1.2.1 Xantonas

Las xantonas son metabolitos secundarios que se encuentran comúnmente en algunas familias de plantas superiores, hongos y líquenes (Vieira y Kiijoa, 2005; Pres et al. 2000). Tienen una estructura única, compuesta de un sistema aromático tricíclico [C6-C3-C6], también denominada triciclo polifenoles; puede estar unido a diferentes sustituyentes como: isopreno, grupos metoxilo e hidroxilo que pueden estar ubicados en diferentes lugares de los anillos A y B, lo que resulta en una gran variedad de compuestos de xantonas (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013).

Tienen su origen en el producto de degradación de la fenilalanina en el ácido m-hidroxibenzoico (C6-C1) y su condensación en tres unidades de malonato. Una ruta alterna podría ser la combinación de una unidad C6-C3; por ejemplo, un ácido cinámico con dos unidades de malonato resultan en benzofenona (**Figura 2**). El acoplamiento oxidativo podría conducir a la formación de la xantona (Estrada E., 2001).

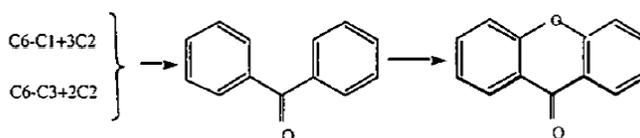


Figura 2. Origen biosintético de las xantonas (Serrano, 2014)

Las xantonas pueden ser simples o modificadas. En este último caso, por la presencia de un sustituyente glucosídico o grupo prenilado (2,2 dimetilalil). Dependiendo el grado de oxigenación que presenten pueden clasificarse como: mono, di, tri o tetraoxigenadas (**Figura 3**) (Estrada, 2001).

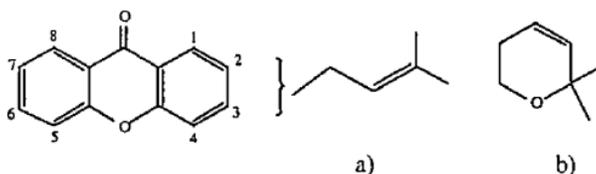


Figura 3. Esqueleto de la xantona y sustituyentes **a)** sustituyente isoprenilo (2,2 dimetilalil), **b)** sustituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un OH fenólico de la xantona (Serrano E., 2014).

1.2.2 Xantona α -mangostina

De acuerdo a Templeman (2008), Schmid fue el primer investigador que aisló en 1855 la primer xantona del pericarpio del mangostán nombrándola mangostin o mangostina, posteriormente se le llamó α -mangostina. Dragendorff (1930) y Murakami (1932) dilucidaron la estructura (C₂₄H₂₆O₆) (**Figura 4**).

La α -mangostina se puede aislar también de otras partes del mangostán como la corteza y el látex (Yates y Stout, 1958). Yates y Stout (1958) encontraron que la α -mangostina es el residuo de color amarillo obtenido del pericarpio de la fruta y establecieron su actividad óptica, su fórmula molecular, naturaleza y posición de las cadenas laterales, las vías de degradación y las relaciones estructurales (Pedraza-Chaverri et al., 2008).

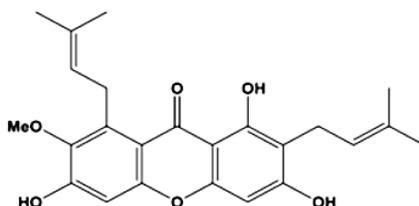


Figura 4. Estructura química xantona α -mangostina (Gutierrez-Orozco F. y Failla M., 2013)

1.2.3 Actividad biológica de α -mangostina

La α -mangostina ha sido ampliamente estudiada; principalmente se han realizado estudios sobre biodisponibilidad y metabolismo celular en donde se ha descubierto actividad: anticancerígena y antiinflamatoria, y sus efectos informados sobre las vías de señalización para el cual se han reportado actividad: antioxidante, antiproliferativa, pro-apoptótica, antiinflamatoria, anticancerígena y antimicrobiana. (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013)

Tabla 1 Evidencia de los efectos biológicos de la α - mangostina

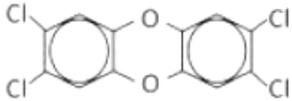
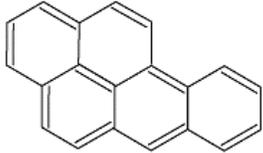
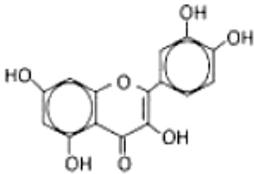
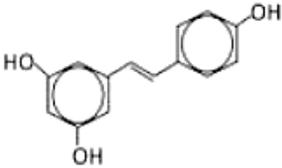
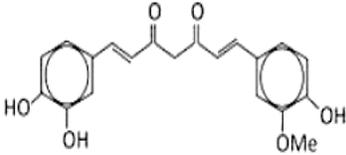
Efecto de α -mangostina	Referencia
La α -mangostina atenuó la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) estimulada por lipopolisacárido en células de tipo macrófago humano U937 y suprimió la expresión de genes relacionados con respuestas inmunes y procesos inflamatorios como la producción de citocinas.	Liu et al., 2012
La α -mangostina indujo apoptosis; detención del ciclo celular; activación de caspasa-3 y -9; pérdida de potencial mitocondrial en células de adenocarcinoma mamario de ratón BJMC3879.	Doi et al., 2009
La α -mangostina produjo inhibición de la formación de edema inducido por carragenina en pata de ratón.	Chen et al., 2008

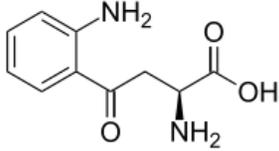
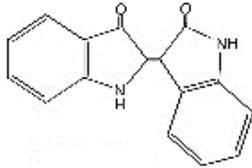
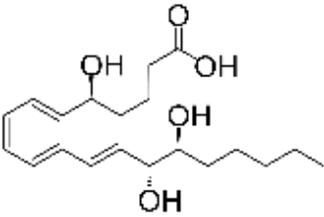
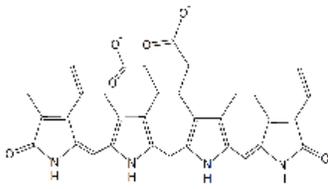
Tomando en cuenta tanto su actividad biológica como su estructura química la α -mangostina comparte características con otros ligandos conocidos del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR). El AhR es un factor de transcripción que se encuentra relacionado con procesos celulares que involucran el desarrollo, adaptación a hipoxia, control del ciclo circadiano y metabolismo de xenobióticos (Busbee et al., 2013).

1.3 Ligandos de AhR

Se han descubierto varios ligandos de AhR, tanto endógenos como exógenos (**Tabla 2**). La identificación de estos ligandos ha proporcionado un mayor conocimiento de las funciones fisiológicas de AhR (Busbee et al., 2013). Los ligandos exógenos de AhR son principalmente xenobióticos, de naturaleza hidrofóbica y estructura plana que pueden variar mucho en su estructura química y afinidad de unión, tal es el caso de los metabolitos secundarios de plantas o productos de combustión incompleta o de origen sintético como los HAH (Vázquez et al., 2016). Los ligandos de AhR que poseen una mayor afinidad por el receptor como el TCDD, se consideran más tóxicos y pueden entrar en los pulmones por inhalación, así como a través de la piel (Busbee et al., 2013).

Tabla 2. Ligandos exógenos y endógenos del AhR.

Ligandos exógenos	Descripción	Estructura
<p>TCDD $C_{12}H_4Cl_4O_2$</p>	<p>Pertencientes a los hidrocarburos aromáticos halogenados, contaminante ambiental; puede producir efectos tanto adaptativos como tóxicos.</p>	
<p>Benzo [a] pireno $C_{20}H_{12}$</p>	<p>Hidrocarburo policíclico aromático potencialmente carcinógeno y que contienen algunos alimentos, como las carnes y el pescado.</p>	
<p>Quercetina $C_{15}H_{10}O_7$</p>	<p>Antioxidante flavonoide que se encuentra en una gran variedad de vegetales como la cebolla, manzanas, uvas, té verde, etc.</p>	
<p>Resveratrol $C_{14}H_{12}O_3$</p>	<p>Estilbenoide, un tipo de fenol natural y una fitoalexina que se produce de manera natural en varias plantas como respuesta a una lesión o cuando éstas se encuentran bajo el ataque de patógenos, tales como bacterias u hongos.</p>	
<p>Curcumina $C_{21}H_{20}O_6$</p>	<p>Polifenol que se encuentra en la raíz de la cúrcuma, posee más de 150 propiedades que son posiblemente terapéuticas como: actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana y antioxidante</p>	

Ligandos endógenos	Descripción	Estructura
Quinurenina $C_{10}H_{12}N_2O_3$	Es un metabolito del aminoácido L-triptófano, usado en la producción de niacina.	
Indirrubina $C_{16}H_{10}N_2O_2$	Derivado del triptófano, pigmento rojo que se encuentra ocasionalmente en la orina.	
Lipoxina A4 $C_{20}H_{32}O_5$	Compuesto que se genera a partir de AA por la vía de las lipooxigenasas, pero a diferencia de los leucotrienos y prostaglandinas las lipoxinas son inhibidores de la inflamación.	
Bilirrubina $C_{33}H_{36}N_4O_6$	Pigmento biliar de color amarillo anaranjado que resulta de la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos reciclados.	

1.3.1 Receptor de hidrocarburos de arilo (AhR)

El AhR es un factor de transcripción dependiente de ligando perteneciente a la familia de proteínas hélice-bucle-hélice básica/PER ARNT-SIM (bHLH/PAS). Desempeña un papel importante en numerosos procesos celulares como desarrollo, adaptación a hipoxia, control del ciclo circadiano y metabolismo de xenobióticos (Busbee et al., 2013). El gen AhR fue descrito por primera vez en ratón por el grupo de trabajo de Schmidt et al. (1992) y desde entonces se han clonado homólogos del AhR de diferentes especies; por ejemplo, en humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*; *Sprague-Dawley*), hámster (*Mesocricetus auratus*), delfín (*Lagenorhynchus auratus*) y foca (*Phoca sibirica*).

El gen que codifica para el AhR en humanos se localiza en el brazo corto del cromosoma 7 en la posición 15 y se expresa principalmente en pulmón, timo, hígado y riñón (Vásquez et al., 2016).

El AhR en mamíferos presenta tres dominios funcionales (**Figura 5**):

- El Primer dominio bHLH es altamente conservado, contiene de 4 a 6 aminoácidos ácidos en el dominio amino terminal; tiene la función de unión con el ADN
- El segundo dominio contiene dos repetidos de los dominios PAS (A y B), cada uno con aproximadamente 110 residuos de aminoácidos. Se sugiere que el dominio PAS A está relacionado con la dimerización y el dominio PAS B funciona como dominio de señalización.
- El tercer dominio (Q) es esencial en la transactivación, está poco conservado y se localiza en el dominio carboxilo terminal.

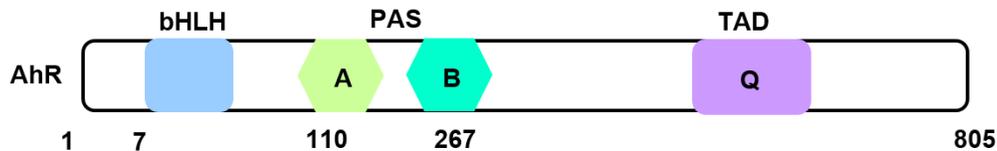


Figura 5. Estructura del AhR

1.3.2 Vía de señalización del AhR

En su forma inactiva el AhR se encuentra anclado en el citosol, unido a un complejo heterodimérico 9S; este se encuentra formado por un dímero de proteína de choque térmico 90 (Hsp90), con un peso de 23 KDa (p23) y una proteína de interacción con AhR. También se ha descrito la presencia de otras proteínas citosólicas como la chaperona (Cdc37) y cinasa triosina (c-src) (Vásquez et al., 2016); las cuales preservan al AhR en un estado conformacional que es capaz de unirse al ligando. Estos ligandos son principalmente xenobióticos de naturaleza hidrofóbica y estructura plana, tal es el caso de los metabolitos secundarios de plantas o productos de combustión incompleta o de origen sintético como los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAH) o el 2,3, 7, 8-tetraclorodibenzoo-*p*-dioxina (TCDD) (Vásquez G. et al, 2016). Estos ligandos son de origen exógeno aunque también se ha demostrado que el AhR es capaz de unir ligandos endógenos como la bilirrubina, lipoxina A4 y derivados del triptófano.

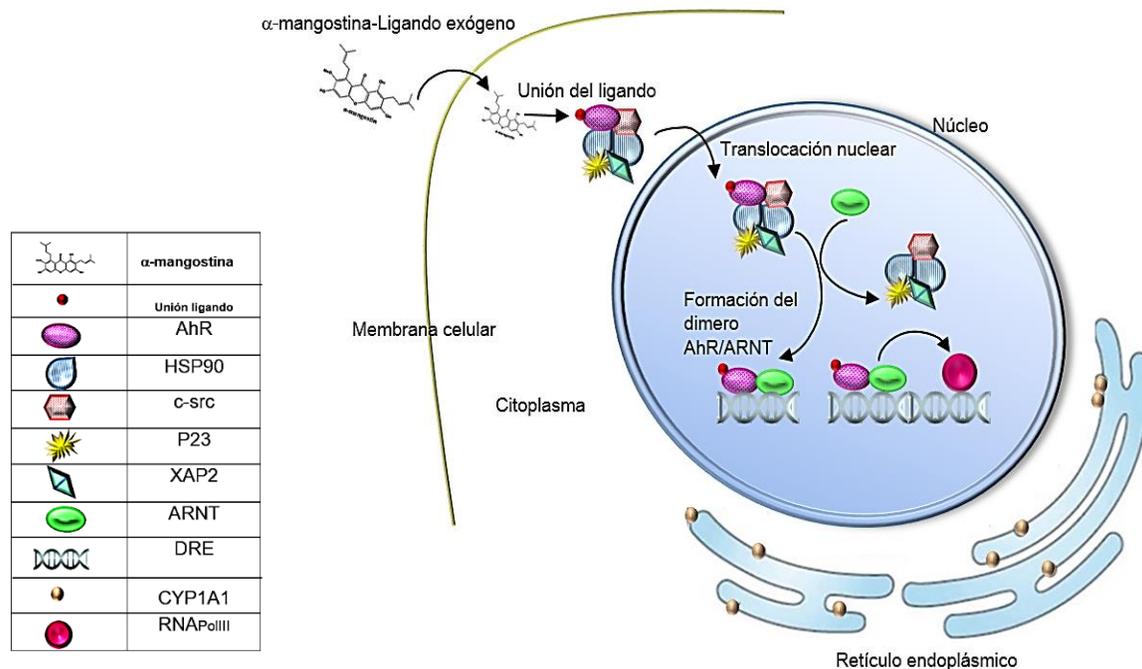


Figura 6. Activación del AhR. El receptor en su forma inactiva se localiza en el citoplasma celular formando un complejo con un dímero de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23 KDa (P23) y una proteína de interacción con el AhR parecida a la inmunofilina (AIP), también conocida como XAP2, y una cinasa de tirosina (c-src). Una vez unido su ligando, el complejo AhR se transloca al núcleo y forma un heterodímero con la proteína ARNT. Este heterodímero es capaz de unirse a los XRE (GCGTGA) y reclutar coactivadores y así favorecer la transcripción de sus genes blanco. Modificado de Vásquez G. et al., 2016.

Cuando el AhR se une a un ligando (**Figura 6**), su estructura conformacional cambia permitiendo su translocación al núcleo disociando el complejo al cual se encuentra unido. (Busbee et al., 2013). Al encontrarse en el núcleo, el AhR formará un heterodímero con la proteína translocadora nuclear del receptor de arilos (ARNT) permitiendo la expresión de un gran número de genes diana.

Se ha identificado y caracterizado la señal de localización nuclear de AhR como los residuos de aminoácidos 13-39. También se ha demostrado que AhR tiene señal de exportación nuclear, rica en leucina que depende del mantenimiento de la región cromosómica 1, que a su vez está compuesta por los residuos de aminoácidos 55-75 en la hélice 2 el núcleo hidrófobo involucrado en formación de heterodímeros con ARNT (Ikuta, et al., 2004). Empleando estas dos señales, AhR se desplaza entre el citoplasma y el núcleo de una célula, y la localización intracelular de AhR se puede regular mediante el enmascaramiento y desenmascaramiento de la señal de localización nuclear y la señal de exportación nuclear con algunas proteínas que interactúan.

La distribución intracelular de proteínas transportadoras de núcleos citoplasmáticos, como los factores de transcripción, está determinada por el equilibrio de la actividad de importación y exportación nuclear, que está regulada específicamente por varias señales fisiológicas o ambientales. Entre ellas, las modulaciones moleculares de la fosforilación o desfosforilación, especialmente cerca de la señal de localización nuclear o la señal de exportación nuclear, por la red de cascadas de transducción de señales (Ikuta, et al., 2004).

1.4 Células gliales

La glía es el grupo de células del sistema nervioso (SN) más abundante en el cerebro (Reyes et al., 2014). Es morfológica y funcionalmente diferentes a las neuronas; durante muchos años se pensó que solo brindaban apoyo, protección, nutrición y facilitaban la conducción para las neuronas que rodean. Con el paso del tiempo se ha profundizado en el estudio de la glía, estableciendo que es indispensables para mantener el microambiente para un correcto funcionamiento del sistema nervioso (SN) (Ndubaku y de Bellard, 2008) participando en funciones específicas como guiar la migración de las neuronas para formar la arquitectura neuronal, asimismo participan la formación, operación y modulación de los circuitos sinápticos (Reyes D. et al., 2014).

Las células gliales se clasifican (**Figura 7**), según su morfología, función y localización, en (Ross y Pawlina, 2006):

- **Astroцитos:** células de morfología heterogénea que poseen sostén físico y metabolismo para las neuronas del sistema nervioso central.
- **Oligodendrocitos:** células pequeñas activas en la formación y mantenimiento de la mielina en el sistema nervioso central (SNC).
- **Ependimocitos:** células cilíndricas que revisten ventrículos del encéfalo y el conducto central de la medula espinal.
- **NG2:** células identificadas como precursoras de los oligodendrocitos.
- **Microglía:** células conspicuas, con núcleos pequeños, alargados y heterocromáticos, que poseen propiedades fagocíticas.
- **Células de Schwann:** encargadas de la mielinización en el sistema nervioso periférico (SNP).
- **Células satélites o capsulares:** proporcionan nutrición, soporte y protección para las neuronas ganglionares craneales, espinales y autonómicas del SNP.
- **Células de Müller:** sirven como soporte para las neuronas de la retina.

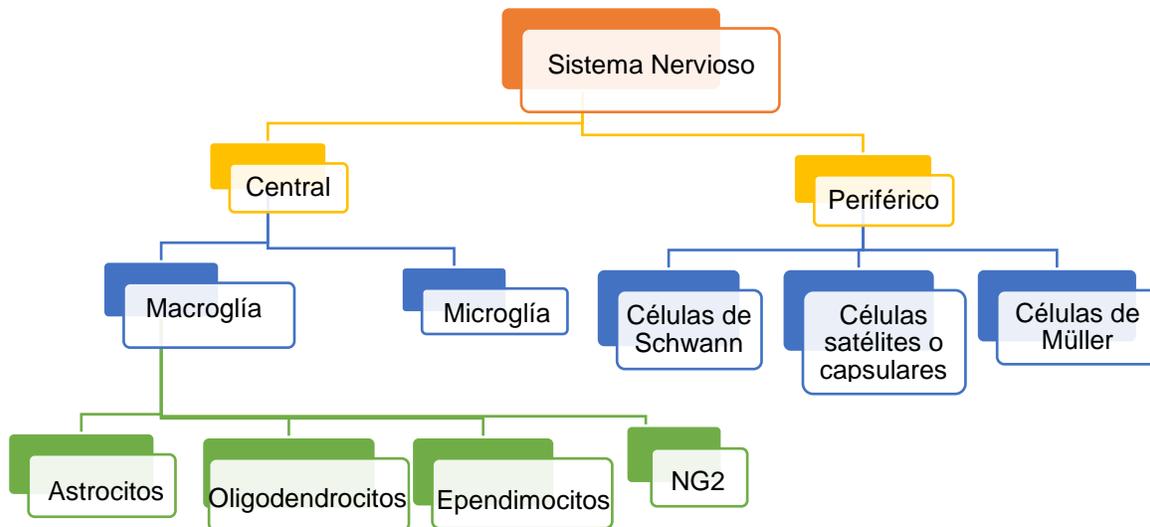


Figura 7. Clasificación de las células gliales de acuerdo a su localización en el SN.
Modificado de García A. 2016

1.4.1 Células de Schwann

Las células de Schwann descritas en 1839 por Theodor Schwann, constituyen la glía del sistema nervioso periférico (SNP). Se originan de la cresta neural, se caracterizan por presentar una fase embrionaria y una neonatal de rápida proliferación y su diferenciación final. En este sentido, el desarrollo normal de las células de Schwann presenta dos etapas principales: la etapa migratoria y la etapa mielinizante (Gratacós, 2016).

La proliferación de las células de Schwann ocurre en diferentes contextos; principalmente durante el desarrollo del nervio periférico, después de una lesión del nervio, ya sea por trauma mecánico, o por tumoración en células de Schwann.

1.4.2 Morfología

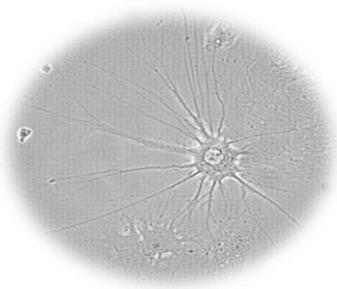


Figura 8. Morfología estrellada, célula de Schwann S16, 10X (García G., 2016)

La célula de Schwann (**Figura 8**), está rodeada de una lámina basal de 20-30 nm de espesor. El citoplasma es rico en organelos como: el Aparato de Golgi localizado cerca del núcleo, las cisternas de retículo endoplásmico rugoso se encuentran dispersas en toda la célula; también se pueden observar abundantes lisosomas, cuerpos multivesiculares, gránulos lipídicos y de glicógeno. Su membrana plasmática muestra vesículas pinocíticas. Se hallan mitocondrias pequeñas y redondeadas a través del soma.

El núcleo es aplanado y se orienta longitudinalmente a lo largo de la fibra, y su heterocromatina se distribuye periféricamente (López y Hurtado, 1993).

Se reconocen cuatro fenotipos:

- Formadoras de mielina, envuelven solamente axones de más de 1 μm de diámetro.
- No mielinizantes, que rodean múltiples axones pequeños.
- Satelitales que rodean los pericariones neuronales en los ganglios.
- Agregados tubulares de células de Schwann en los segmentos distales de los nervios seccionados.

1.4.3 Función

Las células de Schwann guían y acompañan a los axones durante su crecimiento, son células gliales de soporte en el SNP. Estas células, se caracterizan por rodear los axones del nervio. En algunos casos, esta acción es llevada a cabo envolviendo los axones a través de su propio citoplasma, y en otros casos se desarrolla a través de la elaboración de una vaina de mielina (Gratacós, 2016). Además de formar las vainas de mielina, las células de Schwann también tienen la función de guiar el crecimiento de los axones cuando estos se regeneran. Para ello, se disponen formando una serie de cilindros que sirven de tutores a los axones en regeneración. Si uno de los brotes axonales encuentra un cilindro, crecerá a lo largo del mismo a una velocidad de 3 a 4 mm por día (Morales, 2011). Las células de Schwann están involucradas en muchos aspectos importantes de la biología del nervio periférico, la conducción de los impulsos nerviosos a lo largo de los axones del nervio, el desarrollo y regeneración, el apoyo trófico para las neuronas, la producción de la matriz extracelular del nervio, la modulación de la actividad sináptica neuromuscular, y la presentación de antígenos a los linfocitos T (IQB, 2016).

1.4.4 Afecciones en células de Schwann

La viabilidad y funcionalidad de las células de Schwann como parte del nervio periférico puede ser afectada por múltiples factores de procedencia diversa como: infecciosos, inmunes, traumáticos, tóxicos y tumorales (López y Hurtado, 1993). Algunas neuropatías involucran un efecto en las funciones de las células de Schwann y producen la desmielinización de las fibras nerviosas mielinizadas, por ejemplo: esclerosis múltiple, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, síndrome de Guillain-Barré, Schwannomatosis y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (Morales, 2011).

2. Justificación

Si la α -mangostina promueve un efecto sobre AhR en células de Schwann nos brindaría información relevante para explicar procesos fisiológicos en los que participa AhR como: proliferación, producción de mielina, respuesta inmune, entre otros. A su vez esto podría ser útil en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en la profilaxis o terapias de enfermedades del sistema nervioso periférico como: esclerosis lateral amiotrófica y radiculopatías (ciática, por ejemplo).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar si la xantona α -mangostina modifica la expresión y localización del AhR en células de Schwann S16.

3.2 Objetivos particulares

- Establecer el cultivo de células de Schwann S16.
- Conocer la citotoxicidad de α -mangostina en células de Schwann S16.
- Determinar si la α -mangostina cambia la localización celular del AhR.

4. Diseño experimental

Para la realización de esta investigación se propuso un diseño experimental (**Figura 9**) conformado por los siguientes procedimientos:

- Medición de la citotoxicidad de α -mangostina.
- Observación del efecto de la α -mangostina sobre la localización celular de AhR.

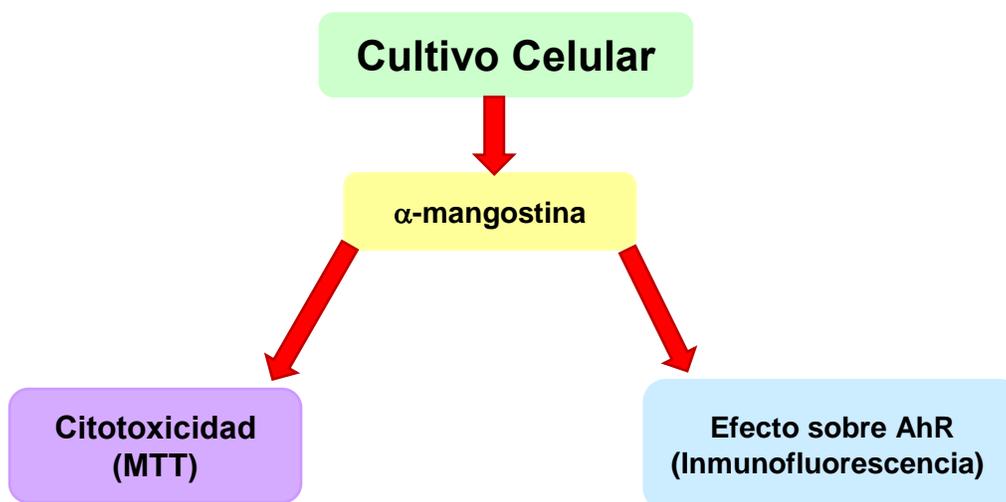


Figura 9. Diseño experimental empleado para el desarrollo del proyecto

5. Materiales y Métodos

5.1 Materiales

La línea celular de nervio ciático de *Rattus norvegicus* Schwann S16 se adquirió de ATCC® (CRL-2941™). El suero de cabra se adquirió de Equitech-Bio Inc. (SG30-0100). El Vectashield con DAPI Vector se adquirió de Laboratories Inc. El anticuerpo secundario anti-cabra IgG marcado con ALEXA FLUOR 488 (A11055) y Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) se adquirieron de Gibco Life Technologies, el anticuerpo anti-AhR policlonal hecho en cabra (M20SC8089) se adquirió de Santa Cruz. La tripsina (T4799) se adquirió de Sigma Aldrich. Los demás reactivos fueron de grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (Panasonic, MCO-170AICUVL-PA). La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de placas multimodal (Sinergy HT, Biotek). La observación de las muestras se realizó en un microscopio invertido (Olympus CKX41) y un microscopio de epifluorescencia (Eclipse E200, Nikon).

5.2 Cultivo de línea celular Schwann S16

La técnica de cultivo celular se basó en lo recomendado por la casa comercial ATCC® de donde se adquirió la línea celular de nervio ciático de *Rattus norvegicus*, células de Schwann S16 ATCC® CRL-2941™ y el método empleado en la Unidad Periférica de Neurociencias para estandarizar el cultivo celular. Para la realización de los experimentos de cultivo celular se prepararon frascos de poliestireno de 75cm² tratados previamente con poli-L-lisina en donde se realizó posteriormente la siembra del cultivo Schwann S16, para el cual se utilizó medio de cultivo DMEM con suplemento de suero fetal bobino al 10% y antibiótico al 1%. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Se mantuvo en crecimiento y en observación los días posteriores hasta llegar a una confluencia no mayor del 80-85% (aproximadamente una semana después del inicio del cultivo). Para proceder a realizar los pases del cultivo, se estableció el número de células (**Tabla 3**). Se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ para el desarrollo de los experimentos y se realizaron 24 h después de la siembra.

Tabla 3. Preparación de cultivo de células de Schwann S16

Tipo de placa	Cantidad células de Schwann (S16, ATCC)		Experimento
24 pozos	5,000		Reducción MTT
24 pozos-con cureobjetos redondos de vidrio	5,000	Células fijadas	Inmunofluorescencia

5.3 Preparación de la α -mangostina

La xantona α -mangostina (>98%), se adquirió de la casa comercial Sigma Aldrich con número de catálogo M3824; se preparó un stock 100 mM: 10 mg α -mangostina + 240 μ L DMSO. A partir de este, se realizaron stocks de 1, 2.5, 5 y 10 mM, posteriormente se prepararon las soluciones necesarias para los ensayos 1, 2.5, 5 y 10 μ M.

5.4 Citotoxicidad

Fue importante conocer la viabilidad de la línea celular de nervio ciático de *Rattus norvegicus*, Schwann S16, de acuerdo a la xantona α -mangostina; para establecer las concentraciones de xantona α -mangostina a utilizar en los experimentos posteriores ya que no existen experimentos previos que nos indiquen la citotoxicidad de α -mangostina en esta línea celular. Los experimentos se realizaron en placas de 24 pozos (**Figura 10**) tratados con poli-L-lisina, en las que se sembraron 5,000 células de Schwann S16 por pozo, se colocaron 500 μ L por pozo, un control (DMEM) y un vehículo (DMSO), así como diferentes concentraciones de la α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μ M, por duplicado en ensayos de 24 h y 48 h, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂; posteriormente se observó al microscopio de campo claro el efecto citotóxico de los ensayos realizados en 24 h y 48 h de tratamiento xantona α -mangostina. Se realizaron pruebas de citotoxicidad con el ensayo de reducción por MTT.

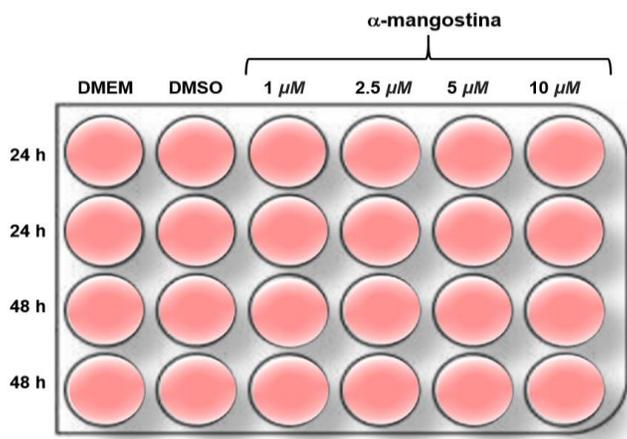


Figura 10. Placa de 24 pozos con control, vehículo y tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μ M para conocer la viabilidad de células de Schwann S16, en 24 y 48h

5.4.1 Reducción MTT

Es un método que se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por deshidrogenasas y agentes reductores presentes en células metabólicamente activas, con lo que se obtiene un compuesto color azul-violáceo (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad de las células tratadas; se ha descrito que la absorbancia es directamente proporcional al número de células activas. (García, 2016). Se empleó el método descrito por Mossman (1983). Se aplicaron 250 μ L de MTT (1 mg/ml) por pozo a los ensayos mencionados anteriormente, incubando durante 1.5 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ (**Figura11**).

Transcurrido el tiempo se retiró el medio de cultivo y los cristales de formazán se diluyeron con DMSO, posteriormente fueron tomados 200 μ L de cada tratamiento y transferidos en orden a una placa de 96 pozos para medir su absorbancia con ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

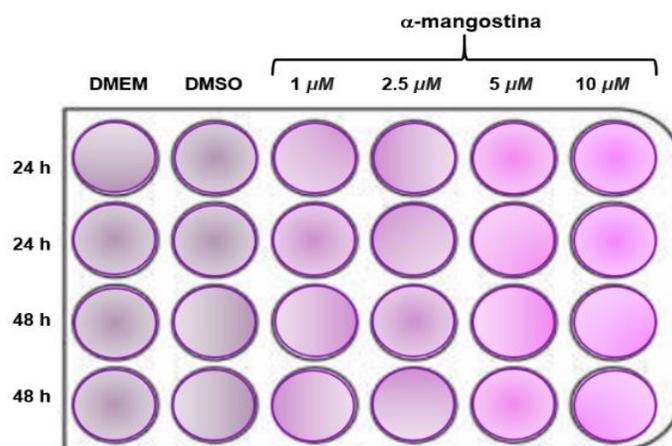


Figura 11. Placa de 24 pozos con control, vehículo y tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μ M en 24 y 48h analizada por el método de MTT.

5.5 Efecto de la xantona α -mangostina sobre el AhR

Para estudiar el efecto de la α -mangostina sobre AhR se prepararon cultivos celulares de Schwann S16, en placas de 24 pozos con cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro y 0.13-0.17 mm de grosor tratados con poli-L-lisina, se sembró por pozo una cantidad de 5,000 células. Posteriormente, para la aplicación de los tratamientos se colocaron 500 μ L por pozo de un control (DMEM) y un vehículo (DMSO), se utilizaron las concentraciones obtenidas del experimento de citotoxicidad de la α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μ M; aplicando los diferentes tratamientos por duplicado en ensayos de 24 h y 48 h, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

5.5.1 Inmunofluorescencia

Para evaluar el efecto de la α -mangostina en la localización celular del AhR se utilizó la técnica de inmunofluorescencia (Serrano, 2014). Se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con buffer de fosfato salino para eliminar los residuos, después se añadieron 700 μ L de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C. Concluido el tiempo se realizaron lavados con buffer de fosfato salino y se procedió a realizar la permeabilización de las células, para esto se incubaron con 700 μ L de metanol durante 10 minutos a -20°C.

Transcurrido el tiempo se realizaron lavados con buffer de fosfato salino y consecutivo a esto se colocaron los cubreobjetos redondos de vidrio en una cámara húmeda en donde se añadieron 85 μL por cubreobjetos de la solución de bloqueo de suero de cabra al 4%; se incubó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el anticuerpo primario AhR cabra policlonal M20SC8089 1:500, añadiendo 150 μL por cubre objeto y se incubó durante 24 h a 4°C en la cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se realizaron lavados con buffer de fosfato salino y se colocaron nuevamente los cubreobjetos en la cámara húmeda para colocar el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 anti-cabra 1:200, añadiendo 100 μL por cubreobjetos, el cual se incubó a temperatura ambiente en completa oscuridad por 1:30 h. Para finalizar, se realizó el montaje de las muestras (**Figura 12**) en portaobjetos, se agregó una gota de Vecta shield con DAPI (5 μL) como medio de montaje y sobre esta se situaron los cubreobjetos. El efecto de la α -mangostina sobre el AhR en los diferentes tratamientos se observó usando el microscopio de la marca Nikon Eclipse E200, mediante un software Q-Capture Pro 7, 2010 Q Imaging.

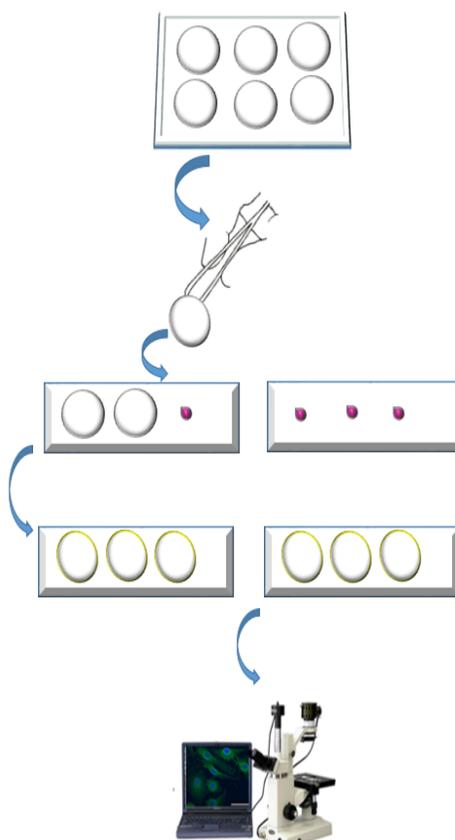


Figura 12. Montaje de las muestras: control, vehículo y tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μM en 24 y 48 h.

5.6 Análisis de la localización del AhR

Se realizó un conteo de 15 células aleatorias de diferentes campos, tomando tres fotografías 10x por experimento de un total de cuatro experimentos para 24 h y seis experimentos para 48 h con la aplicación de tratamiento α -mangostina para obtener un porcentaje de la localización celular del AhR. Se consideraron tres criterios para identificar la localización del AhR de acuerdo a lo observado: citoplasmática, perinuclear y distribución celular (DC).

5.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el programa Prism 5.00, mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM). Se consideraron diferencias significativas con una $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Cultivo celular Schwann S16

Al realizar diferentes ensayos (**Tabla 4**) para estandarizar el cultivo celular Schwann S16, se obtuvo que la confluencia celular influye en la morfología de la célula. Por lo tanto, se decidió utilizar placas de 24 pozos para la realización de los experimentos.

Tabla 4. Establecimiento del cultivo

Cultivo	Confluencia	Morfología
Frasco 75cm ²	95-100%	Redondeada
Frasco 75cm ²	80-85%	Poligonal
Placa de 96 pozos	80-85%	Redondeada
Placa de 48 pozos	80-85%	Estrellada
Placa de 24 pozos	80-85%	Poligonal

6.2 Morfología de las células de Schwann S16

Al observar los cultivos celulares de la línea Schwann S16 en placas de 24 pozos con un microscopio invertido Olympus CKX41, se encontraron diferentes morfologías. En la **Figura 13** se muestran imágenes representativas; con flechas rojas se identifican las morfologías mencionadas en los diferentes paneles. Cuando existe una confluencia menor al 80% se identificó una morfología estrellada con prolongaciones definidas y extensas, el citoplasma y núcleo definido (**panel a**); al tener una confluencia celular de 85% se identificó una morfología poligonal, las células se ensancharon mostrando formas angulosas y no desarrollaron prolongaciones definidas (**panel b**), al tener una confluencia mayor de 98% la morfología varió notablemente pues las células se encontraban redondeadas, en algunos casos con pocas prolongaciones muy alargadas y sin visibilidad definida del citoplasma (**panel c**). También se identificó que al tener más de ocho pases el cultivo celular las células presentan morfologías amorfas, en algunos casos con prolongaciones largas o cortas; es importante mencionar que al dejarlas en reposo durante una semana su morfología comienza a ser más definida mostrando morfologías poligonales (**panel d**).

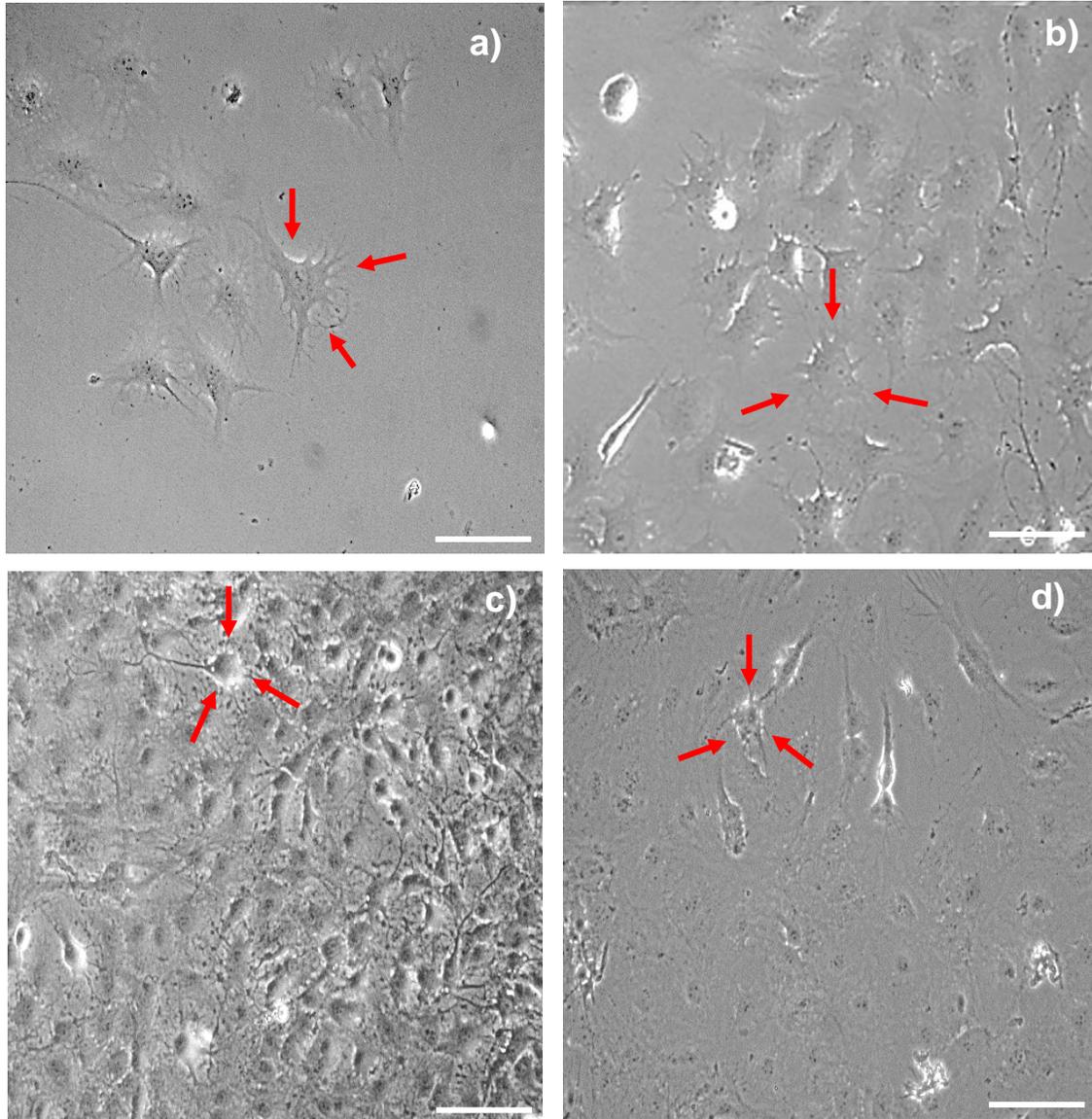


Figura 13. Morfología células de Schwann S16 en un tiempo de incubación de 24 h en el 5to pase de cultivo, observadas con un objetivo 10x. Barra de escala 80 μ M a) Estrellada, b) Poligonales, c) Redondeadas, d) Amorfas.

6.3 Confluencia celular

Sin estímulos externos se observó que la proteína AhR cambiaba su localización celular dependiendo de la confluencia celular. En la **figura 14** se muestran imágenes representativas señalando con flechas y círculos rojos la localización del AhR; en el panel **a)** el AhR se encuentra en el citoplasma, al tener una confluencia celular menor, de 80-85%, lo que indica que se encuentra en su estado basal. En cambio, en el panel **b)** el AhR se encuentra en el núcleo, al tener una confluencia celular de 90-98%,

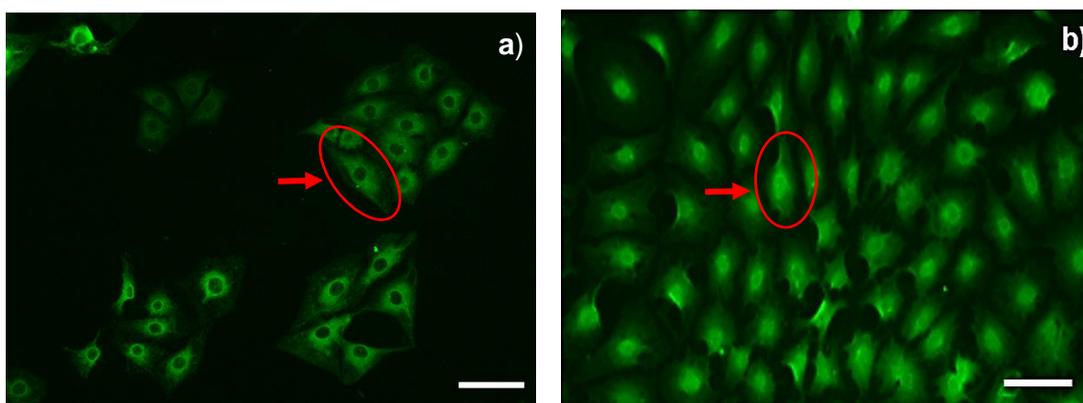


Figura 14. Cambio en la localización del AhR debido a la confluencia celular. a) Células de Schwann S16 con confluencia celular de 80-85%. b) Células de Schwann S16 con confluencia celular de 90-98%. Fotografías tomadas con un objetivo 10x. Barra de escala 80 μ M. En color verde se observa la marca que corresponde a la expresión del AhR.

6.4 Citotoxicidad

En las **Figura 15 y 16** panel **b)** correspondientes a los tratamientos de 24 y 48 h se observa que la xantona α -mangostina provoca citotoxicidad en la concentración de 10 μ M para ambos casos, ya que se encuentran diferencias significativas; y el porcentaje de células vivas disminuye hasta un 30% comparando la concentración de 10 μ M contra el vehículo.

En los experimentos realizados y en todas las concentraciones, incluyendo el control y vehículo, se observó con microscopio la presencia de las morfologías descritas anteriormente, con una mayor incidencia de la morfología poligonal. En las figuras **15 y 16** panel **a)** se muestran imágenes representativas de acuerdo al tratamiento.

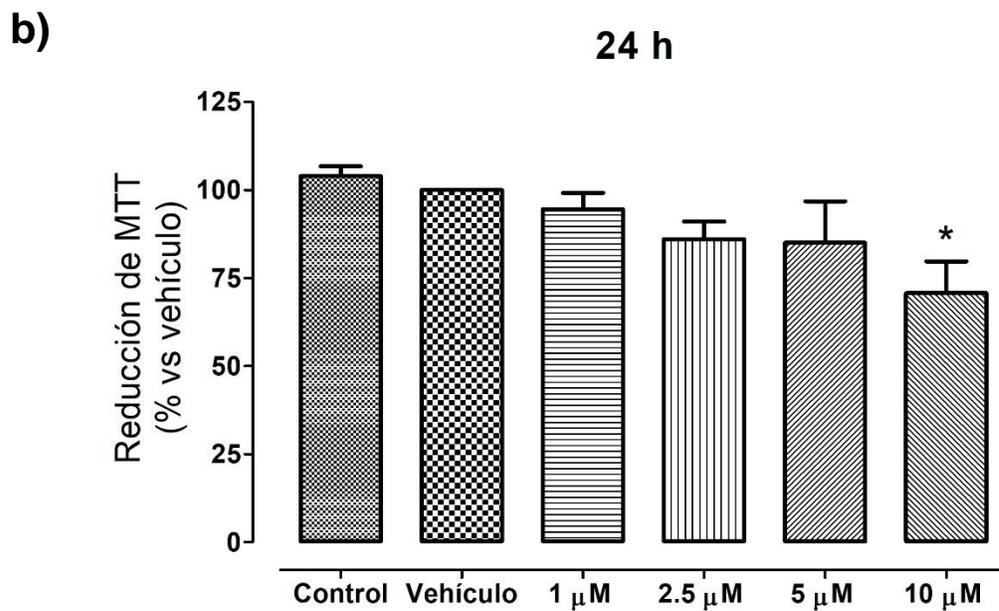
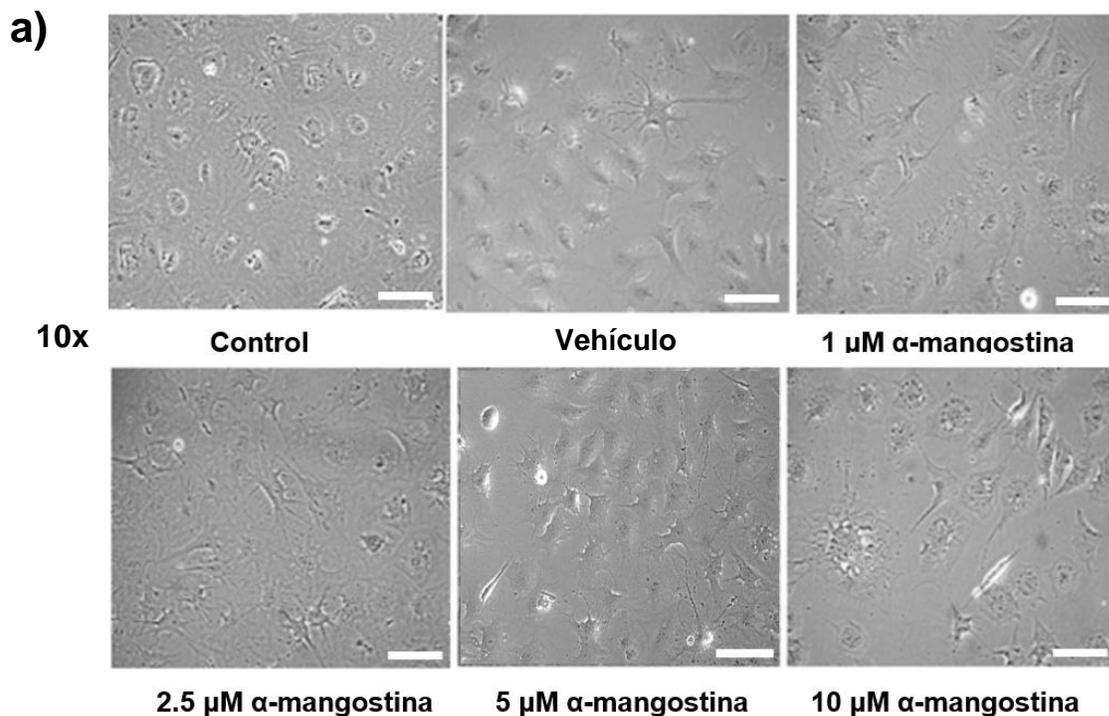


Figura 15. Citotoxicidad de α -mangostina en células de Schwann S16 en 24 h. a) Fotografías representativas del cultivo celular tomadas con un objetivo 10x. Barra de escala 80 μM . De izquierda a derecha, se encuentran el control y vehículo, seguidos de diferentes concentraciones del tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μM . b) Efecto citotóxico del tratamiento α -mangostina a 24 h en células de Schwann S16, por el método MTT. ANOVA de una vía seguido de Dunnet. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de cinco experimentos independientes, * $p < 0.05$ vs vehículo.

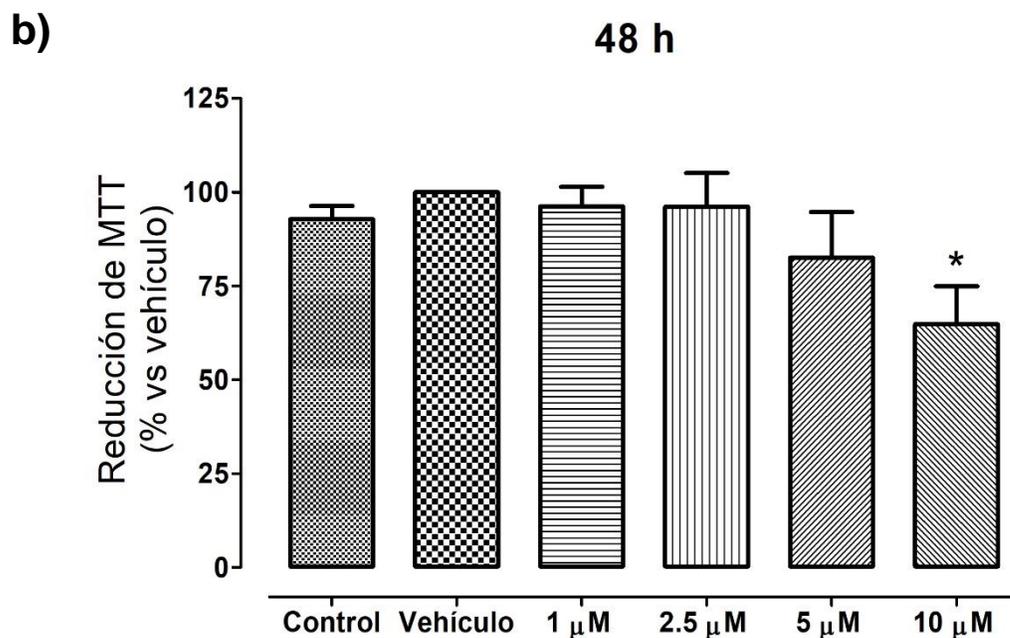
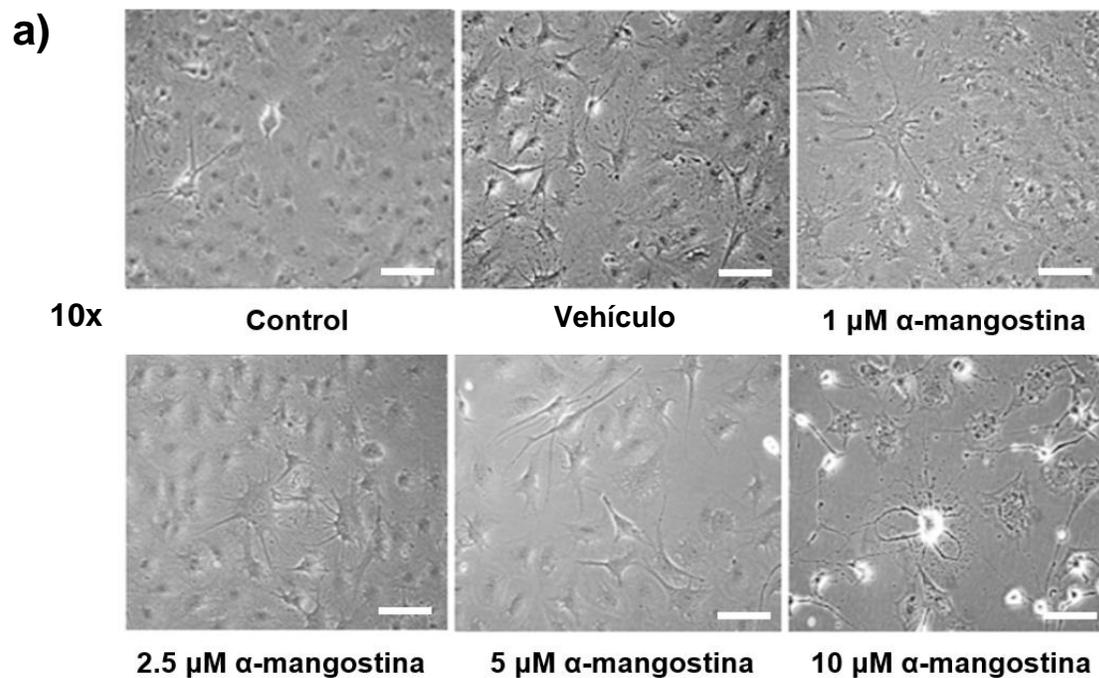


Figura 16. Citotoxicidad de α -mangostina en células de Schwann S16 en 48 h. a) Fotografías representativas del cultivo celular tomadas con un objetivo 10x. Barra de escala 80 μM . De izquierda a derecha, se encuentran el control y vehículo, seguido de diferentes concentraciones del tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μM . b) Efecto citotóxico del tratamiento α -mangostina a 48 h en células de Schwann S16, por el método MTT. ANOVA de una vía seguido de Dunnett. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de seis experimentos independientes, * $p < 0.05$ vs vehículo.

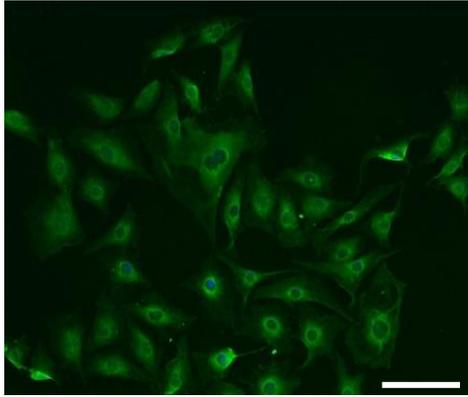
6.5 La xantona α -mangostina produce cambio del AhR en la localización celular.

Por medio de la técnica de inmunofluorescencia realizada, se estudió la localización celular del AhR utilizando un anticuerpo primario para su detección. En la **Figura 17 y 18** se muestran imágenes representativas de los cultivos realizados con el tratamiento de la α -mangostina en 24 y 48 h señalando con flechas rojas la localización de AhR en el panel **b)**. Para el tratamiento de 24 h se observa en la **Figura 17** que el AhR tiene una localización citoplasmática y ligeramente perinuclear en el control y vehículo, en la concentración 1 y 2.5 μ M en donde es más evidente la localización perinuclear; en cambio en las concentraciones 5 y 10 μ M, se observa que el AhR comienza a cambiar su localización perinuclear y se encuentra en el citoplasma en su mayoría. En la **Figura 19** en el panel **a)** se muestra que las concentraciones de 1 y 2.5 μ M tienen diferencias significativas tomando en cuenta los criterios de localización del AhR, citoplasmático y perinuclear respecto al vehículo, y en el panel **b)** se muestran los porcentajes de localización celular del AhR.

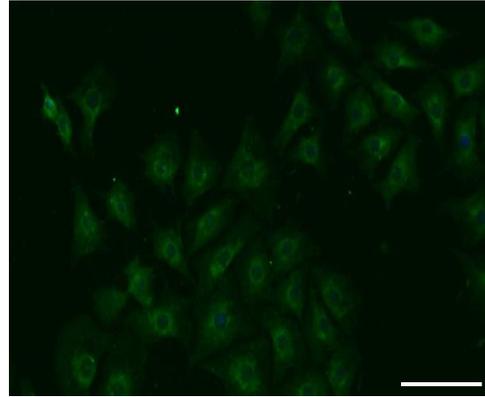
En la **Figura 18** se observa el tratamiento de 48 h. Se encontró al AhR localizado de forma homogénea en el citoplasma y ligeramente perinuclear, en el control y vehículo como era esperado, en el caso de las concentraciones 1, 2.5 y 5 μ M se observó que la localización y expresión de AhR fue mayormente perinuclear lo que sugiere un efecto de la α -mangostina sobre el AhR, principalmente en 1 μ M; en la concentración de 10 μ M la localización del AhR tiene una distribución celular (DC), es decir, el AhR se visualiza tanto en el citoplasma como en el núcleo. En la **Figura 20** en el panel **a)** se muestra que las concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 μ M tienen diferencias significativas tomando en cuenta los criterios de localización del AhR, citoplasmático, perinuclear y DC respecto al vehículo, y en el panel **b)** se muestran los porcentajes de la localización celular del AhR. Los resultados sugieren que la α -mangostina dependiendo de su concentración puede producir un cambio en la localización celular del AhR.

a)

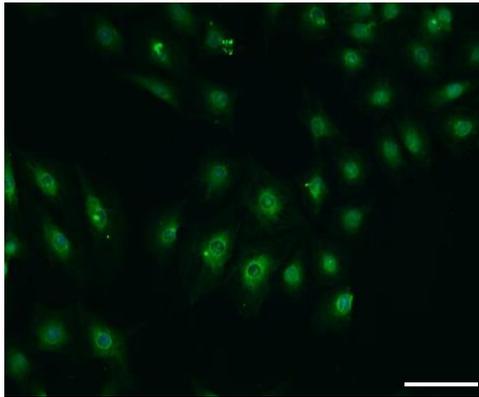
10x



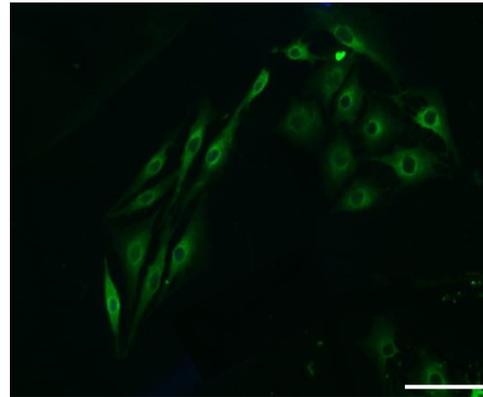
Control



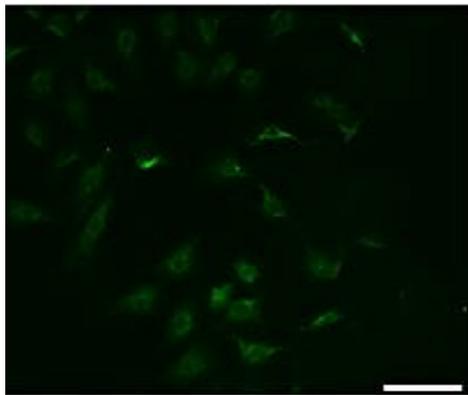
Vehículo



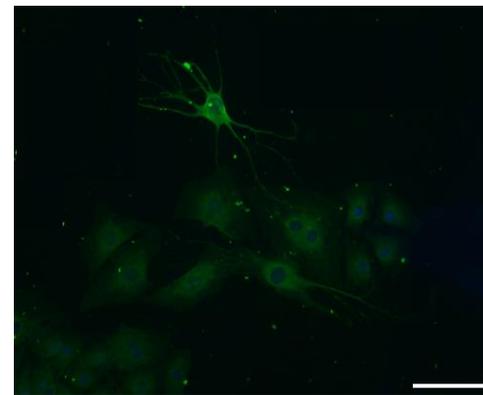
1 μM α-mangostina



2.5 μM α-mangostina



5 μM α-mangostina



10 μM α-mangostina

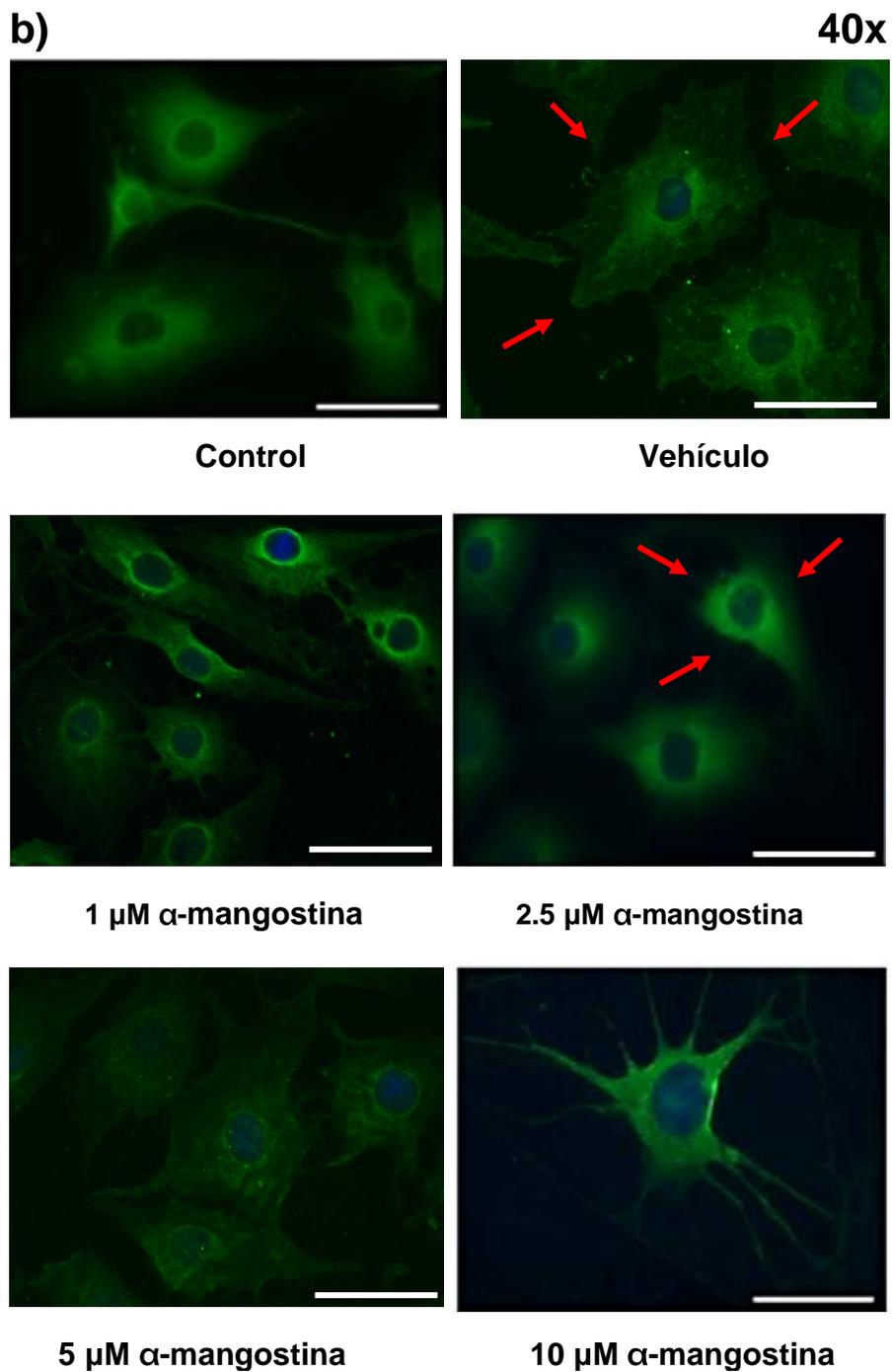
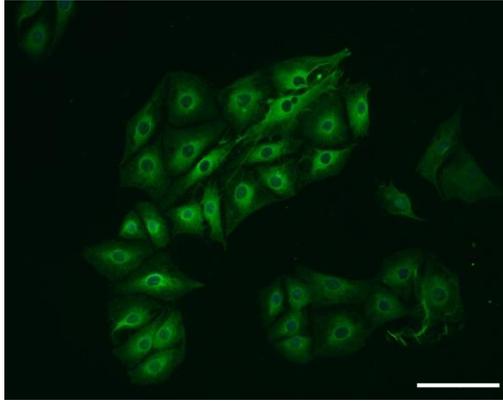


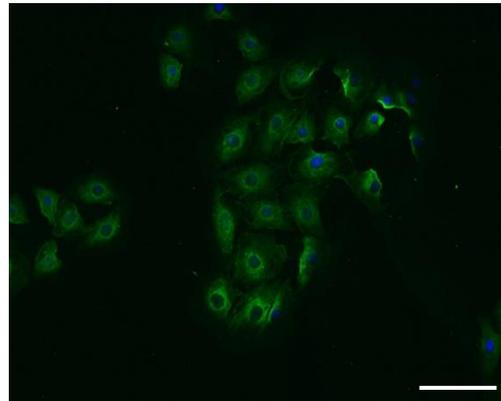
Figura 17. Efecto de la α -mangostina en la localización celular del AhR producido por el tratamiento de 24 h en células de Schwann S16. Fotografías representativas observadas con un objetivo 10x a) Barra de escala 80 μM y 40x b) Barra de escala 200 μM , de izquierda a derecha y en orden descendente; se encuentra el control y vehículo seguido de diferentes concentraciones del tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μM . En verde se observa la marca de AhR y en azul los núcleos celulares-DAPI. Con flechas rojas se encuentra señalada en el panel b) la localización citoplasmática y perinuclear de AhR.

a)

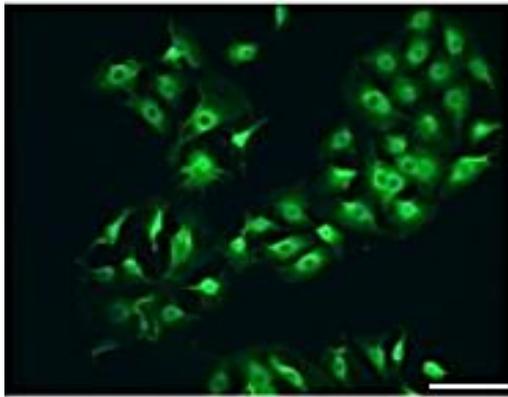
10x



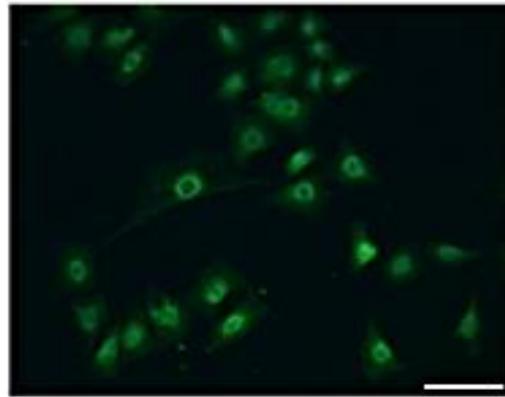
Control



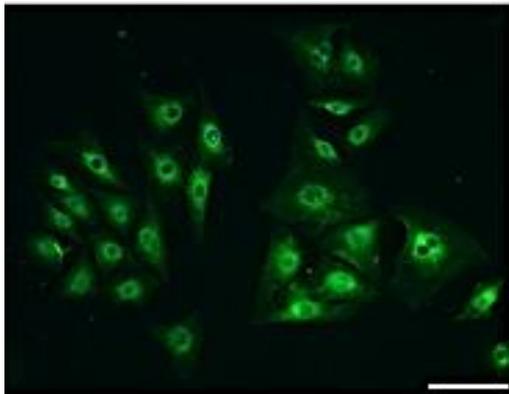
Vehículo



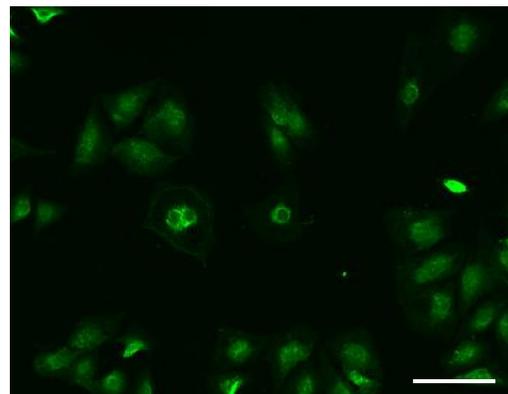
1 μM α-mangostina



2.5 μM α-mangostina



5 μM α-mangostina



10 μM α-mangostina

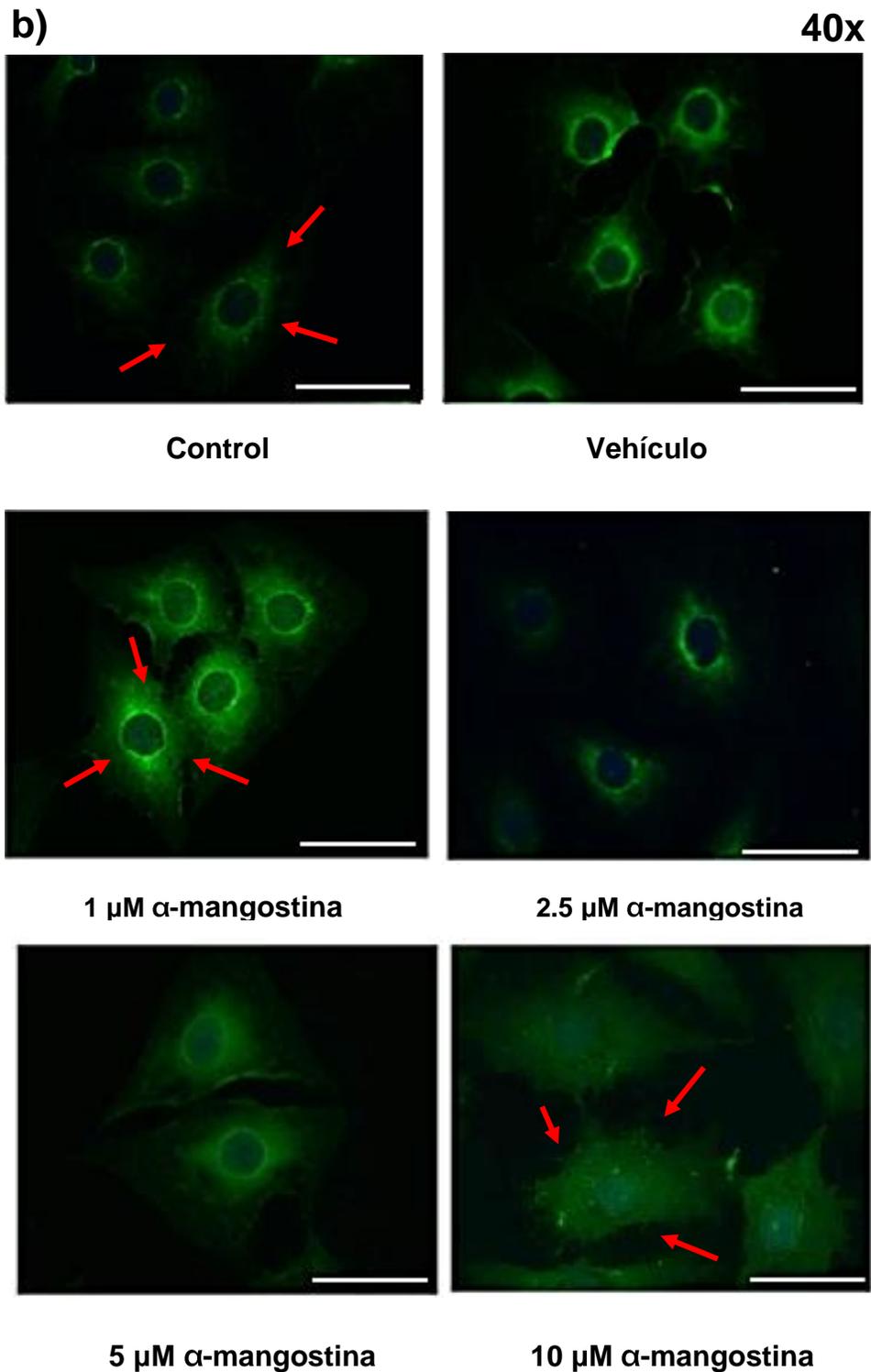
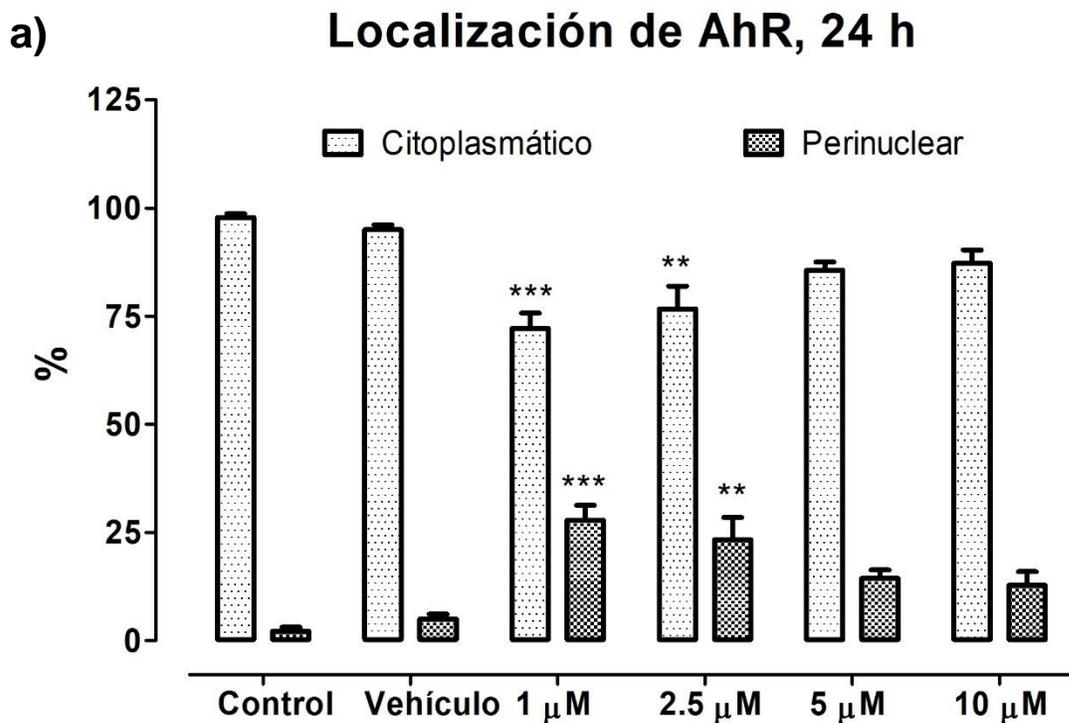


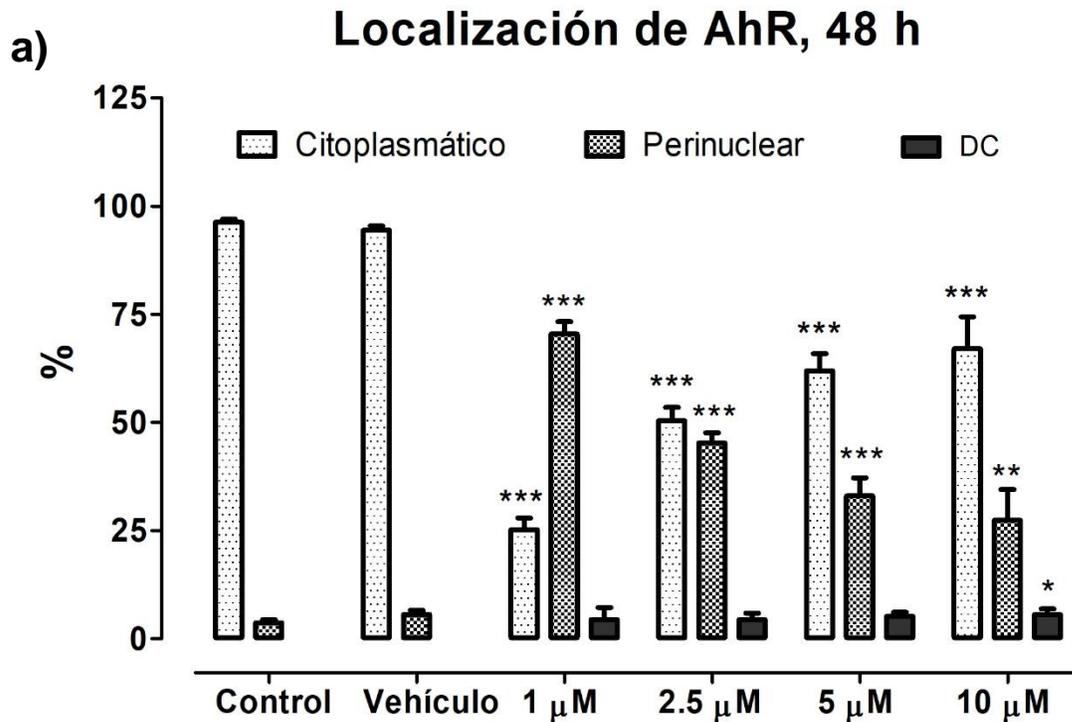
Figura 18. Efecto de la α -mangostina en la localización celular del AhR producido por el tratamiento de 48 h en células de Schwann S16. Fotografías representativas observadas con un objetivo 10x a) Barra de escala 80 μM y 40x b) Barra de escala 200 μM , de izquierda a derecha y en orden descendente; se encuentra el control y vehículo seguido de diferentes concentraciones del tratamiento α -mangostina: 1, 2.5, 5 y 10 μM . En verde se observa la marca de AhR y en azul los núcleos celulares-DAPI. Con flechas rojas se encuentra señalada en el panel b) la localización citoplasmática, perinuclear y de distribución celular del AhR.



b)

24h	%	%
	Citoplasmático	Perinuclear
DMEM	98 ± 0.9	2 ± 0.9
DMSO	95 ± 1.1	5 ± 1.1
1 μM	72 ± 3.5	28 ± 3.5
2.5 μM	77 ± 5.2	23 ± 5.2
5 μM	86 ± 1.9	15 ± 1.9
10 μM	88 ± 3.1	13 ± 3.1

Figura 19. Porcentaje de localización celular de AhR tomando los criterios de localización citoplasmático y perinuclear con la aplicación de tratamiento α -mangostina en 24 h. Gráfica de localización de AhR, 24 h a) y tabla de porcentajes con los criterios de localización b). ANOVA de una vía seguido de Dunnett. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de cuatro experimentos independientes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehículo.



b)

48h	%	%	%
	Citoplasmático	Perinuclear	DC
DMEM	96 ± 0.7	4 ± 0.7	0 ± 0.0
DMSO	94 ± 1.0	6 ± 1.0	0 ± 0.0
1 μM	25 ± 2.7	71 ± 2.9	4 ± 2.8
2.5 μM	50 ± 3.1	46 ± 2.4	4 ± 1.5
5 μM	62 ± 4.0	33 ± 4.2	5 ± 0.9
10 μM	68 ± 7.4	26 ± 7.1	6 ± 1.3

Figura 20. Porcentaje de localización celular de AhR tomando los criterios de localización citoplasmático, perinuclear y distribución celular (DC) con la aplicación de tratamiento α -mangostina en 48 h. Gráfica de localización de AhR, 48 h a) y tabla de porcentajes con los criterios de localización b). ANOVA de una vía seguido de Dunnett. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de seis experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehículo.

7. Discusión

7.1 Cultivo celular Schwann S16

Las células de Schwann constituyen la glía del SNP que además de ser el soporte estructural para los axones, tiene la función de producir mielina. La gran importancia de la mielina es su participación en los procesos de neuroconducción (López y Hurtado, 1993).

Para la realización de este estudio se utilizó la línea celular Schwann S16 (ATCC® CRL-2941™) de nervio ciático de *Rattus norvegicus*. Se ha descrito como importante considerar la edad de las ratas de las que se obtienen los nervios ciáticos. Muchos de los estudios realizados se han basado en la obtención de células de Schwann a partir de ratas recién nacidas, ya que cuando se trabaja con tejidos adultos se tienen dificultades añadidas debido a que éstos presentan una abundante cantidad de tejido conectivo y mielina y, por tanto, en las preparaciones celulares se obtienen altos porcentajes de fibroblastos contaminantes del cultivo que pueden superar a la población de células de Schwann (Rodríguez, 2014).

Se sabe que el establecimiento de líneas celulares neuronales y de Schwann se ha considerado difícil (Sango et al., 2012), probablemente debido a la alta actividad proliferativa y las diferencias fenotípicas y morfológicas de las células. Por lo tanto, el establecimiento de un cultivo celular se da en función de criterios como: solo formarán parte del cultivo aquellas células que sean capaces de superar el proceso de disgregación, adhesión al sustrato y de proliferación.

El establecimiento del cultivo Schwann S16 se determinó para la realización de este estudio, puesto que no se han encontrado reportes con esta línea celular. A partir de los cultivos en frascos de poliestireno de 75cm², se realizó el pase celular en placas de 24 pozos con una confluencia determinada, de 80-85 % para la realización de los experimentos, ya que estas condiciones permiten un buen desarrollo celular para la realización del estudio. También el realizar los cultivos en placas de 24 pozos facilita cuestiones técnicas como la elaboración de los experimentos de inmunofluorescencia.

7.2 Morfología y confluencia de células de Schwann S16

Tomando en cuenta los datos que la casa comercial ATCC® de donde se adquirió la línea celular proporciona; menciona que las células de Schwann S16 se dividen muy rápidamente y son más redondas que otras células de Schwann y que elaboran muchos procesos después de alcanzar una alta confluencia.

De acuerdo con lo anterior y a lo observado en la realización del trabajo, la variación en las morfologías observadas pudiera estar relacionada con la confluencia celular, las horas en cultivo, así como el número de pases. En el desarrollo de este estudio las observaciones de cultivos celulares de Schwann S16 nos permitieron identificar diferentes morfologías de estas células; estrelladas, poligonales, redondeadas y amorfas.

La morfología estrellada y poligonal encontradas en el cultivo de Schwann S16, presentaron una forma ahusada bipolar, siendo esto una característica común en la morfología de células de Schwann (Rodríguez, 2014). Tanto la morfología estrellada como la poligonal coinciden con lo observado por Brockes et al. (1979); la morfología estrellada tiene la apariencia de un cuerpo celular ovalado y procesos medianos, y la morfología poligonal coincide con lo observado en el séptimo día de cultivo (Brockes et al., 1979), ya que presenta un cuerpo celular más grande siendo triangular o poligonal con dos a cinco procesos. Las células con morfología redondeada que presentan una forma alargada, probablemente tuvieron este efecto por la alta confluencia provocando una tripolaridad por el sobre acomodo de las células. (Rodríguez, 2014).

Se identificó que al tener más de ocho pases el cultivo celular, las células presentan morfologías amorfas; al dejarlas en reposo durante una semana su morfología tiene cambios visibles, pues comienza a ser más definida mostrando morfologías poligonales. No se encuentran reportes de esta morfología o similares, sin embargo, es posible que sea una característica de esta línea celular.

7.3 Confluencia y localización celular del AhR en células S16

Inicialmente, diversos reportes describieron que el AhR es activado por la pérdida de adhesión al sustrato celular (Cho et al., 2004), encontrando también una relación con la regulación del ciclo celular, ya que la activación del AhR conduce a la detención del ciclo celular en la fase G1 en varias líneas celulares, debido a una asociación directa del AhR con la proteína del retinoblastoma (Dietrich y Kaina, 2010).

Más tarde Cho et al. 2004 demostraron que el AhR está regulado por la confluencia celular, basándose en que el AhR se activa por la pérdida de contacto célula-célula en ausencia de ligandos exógenos (Dietrich y Kaina, 2010). Tal es el caso de fibroblastos C3H10T1 / 2 y la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT que presentan resultados similares de acuerdo a la confluencia celular y localización de AhR, es decir, la confluencia celular, pero no el ciclo celular, influye en la distribución intracelular de AhR, con una localización nuclear

predominante de AhR en células distribuidas escasamente, localización tanto en el núcleo como en el citoplasma en células subconfluentes y la localización citoplasmática predominante en células confluentes (Ikuta et al., 2004).

En este estudio con la línea celular Schwann S16, se encontró que dependiendo la confluencia celular la localización de AhR cambia, contrastando con la literatura ocurre lo opuesto, es decir, al tener una confluencia de 95-100% se identificó que la proteína AhR se translocaba al núcleo, en cambio al tener una confluencia celular menor, de 80-85%, el AhR se encontró localizado en el citoplasma, lo que indica que se encuentra en su estado inactivo, atribuyendo esto a la menor confluencia celular. Sin embargo, el hecho de que el AhR tenga una localización nuclear en alta confluencia celular en células de Schwann S16 pudiera indicar que no participa en mecanismos de proliferación, tal vez pudiera estar involucrado en mecanismos de mielinización. Ya que la activación de AhR en confluencias altas pudiera involucrar a este factor transcripcional en el proceso de formación de la mielina puesto que se ha evidenciado al AhR como regulador fisiológico de la mielinización y los procesos inflamatorios en el SN que influyen en el desarrollo. (Juricek et al., 2017). Dado que muchos de los ligandos exógenos del AhR son contaminantes ambientales, los mecanismos por los cuales éstos pudieran influir en la mielinización del sistema nervioso central y explicar parcialmente enfermedades del sistema nervioso periférico como la Schwannomatosis, y también como el AhR podría ser una diana farmacológica relevante para las enfermedades desmielinizantes (Juricek et al., 2017).

Desde otra perspectiva, Inkuta et al. (2004) usando leptomicina B (inhibidor de la exportación nuclear, que inhibe exportin 1 (CRM1) necesaria para la exportación nuclear de proteínas que contienen señales de exportación nuclear) en células hepáticas HaCaT pudo promover la acumulación nuclear de AhR independientemente de la confluencia celular, la alta confluencia celular incluso puede acelerar la exportación nuclear del AhR pero no inhibir la importación nuclear dependiente de su activación, sugiriendo la presencia de ligandos endógenos independientes de la concentración celular.

En estudios recientes se ha proporcionado evidencia progresiva sobre la localización nuclear de proteínas, que no solo está regulada por la importación nuclear, sino también por la actividad de exportación (Ikuta, et al, 2004). Tomando en cuenta esto, se sabe que la exportación de proteínas nucleares dependiente de señales de exportación nuclear está regulada principalmente por la fosforilación-desfosforilación de la señal de exportación nuclear (Ohtake et al., 2009, Eagle y Levine 1967). Por lo tanto, es probable que la señal

de exportación nuclear de AhR constituya un módulo regulador de la exportación nuclear mediado por fosforilación (Ikuta et al., 2004). Entonces, es posible que la localización de AhR esté regulada por un equilibrio de fosfatasa e inhibidores de fosfatasa en el núcleo, que depende de la confluencia celular (Dietrich y Kaina, 2010).

7.4 Citotoxicidad de la α -mangostina en células de Schwann S16

En este trabajo se estudió el efecto de α -mangostina en células de Schwann S16; previamente en nuestro equipo de trabajo se determinaron viables las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μ M de otras xantonas en un tiempo de 48 h en astrocitos corticales de rata en cultivo primario (Serrano, 2014). La utilización del ensayo de reducción de MTT tuvo el objetivo de determinar la toxicidad de la α -mangostina en el cultivo de células de Schwann S16 con la aplicación de concentraciones: 1, 2.5, 5 y 10 μ M, con la finalidad de determinar las concentraciones adecuadas para los tratamientos en 24 y 48 h; ya que este método se ha usado para evaluar la citotoxicidad, proliferación celular e incluso función mitocondrial (Bernas y Bobrucki, 2000; Stockert et al., 2012). En ambos ensayos, de 24 y 48 h se detectó que la concentración de 10 μ M es tóxica pues muestra diferencias significativas respecto al vehículo. De acuerdo con los datos obtenidos por MTT y la observación al microscopio se corroboró el efecto citotóxico; encontrando que en la concentración de 10 μ M, se observa una tendencia hacia la muerte celular y daño en la integridad celular producida por la α -mangostina en las células de Schwann S16.

Las xantonas aisladas de *Garcinia mangostana* han sido ampliamente estudiadas principalmente las mangostinas α , β y γ , la garcinona E, la 8-deoxygartanin y la gartanin (Pedraza Chaverri et al., 2008). Para la xantona α -mangostina no se ha descrito un efecto citotóxico importante en células de las líneas RAW 264.7, MDM, HepG2, HT-29, THP-1 y Caco-2 en un rango de concentraciones de 4.5 a 15 μ M (Gutierrez-Orozco et al., 2013). Sin embargo, si es citotóxica en células de cáncer de colon HCT-116 en un rango de concentraciones de 2.5 a 30 μ g/ml.

Este efecto fue confirmado en ratones xenógrafos inyectados con dichas células (Aisha et al., 2012). Asimismo, la α -mangostina también presenta citotoxicidad en una línea celular de cáncer de mama humano 28 en intervalos de concentración de 7.5 a 30 μ M (Kritsanawong et al., 2016). Lo anterior puede sugerir que a pesar de los numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la bioactividad de las xantonas de *Garcinia mangostana*, se necesita profundizar más para evaluar sus efectos protectores o tóxicos

dependiendo de las concentraciones empleadas y para qué tipo celular o tejidos son utilizadas. Como en este caso en células de Schwann S16.

7.5 Xantona α -mangostina produce cambio en la localización celular del AhR

A lo largo de los años, se han descubierto varios ligandos de AhR, tanto endógenos como exógenos. La identificación de estos ligandos ha proporcionado un mayor conocimiento de las funciones fisiológicas de este factor de transcripción (Busbee et al., 2013). Los ligandos de origen exógeno del AhR más estudiados son principalmente xenobióticos, de naturaleza hidrofóbica y estructura plana, tal es el caso de productos de combustión incompleta o de origen sintético como los hidrocarburos aromáticos halogenados o el TCDD (Vázquez et al., 2016), o bien, los metabolitos secundarios de plantas. También existen informes de que el AhR es capaz de unir ligandos endógenos como la bilirrubina, lipoxina A4 y derivados del triptófano. Por lo anterior, en este estudio se sugiere que α -mangostina pudiese ser un ligando exógeno de AhR, asimismo se ha demostrado que α -mangostina y otras xantonas son metabolizadas por células humanas y animales (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013). Por lo tanto, se evaluó el efecto de α -mangostina y su posible relación con el AhR en tratamientos de 24 y 48 h. Analizando las inmunofluorescencias realizadas con los tratamientos, se encontró que en 24 h un porcentaje importante de AhR se encuentra localizado de forma citoplasmática en el control, vehículo y en concentraciones 1 y 2.5 μ M de la α -mangostina se comienza a notar un efecto importante respecto a la localización celular del AhR, pues se observa una localización perinuclear en donde se encontró una diferencia significativa en estas concentraciones respecto al vehículo.

A 48 h, el efecto fue evidente; se observó un cambio en la localización del AhR: citoplasmático, perinuclear y distribución celular por toda la célula; el porcentaje de localización citoplasmático del AhR en control y vehículo fue alto, a diferencia de las concentraciones 1, 2.5, 5 y 10 μ M de la α -mangostina que muestran diferencias significativas respecto al vehículo; en donde el porcentaje incrementa claramente a una localización perinuclear para 1, 2.5, 5 μ M y comienza una distribución celular en 10 μ M.

De acuerdo a lo anterior, tanto el tratamiento de 24 como el de 48 h, en las concentraciones donde se produce mayor efecto en el cambio de localización del AhR son de 1 y 2.5 μ M de la α -mangostina; esto, pudiese sugerir que en bajas concentraciones la α -mangostina esté produciendo un efecto importante sobre el AhR en células de Schwann S16. Se han realizado estudios de otros polifenoles como la quercetina, resveratrol, luteolina,

alizarina, apigenina, emodina que en un rango de bajas concentraciones que van de 0.6 a 3.9 μM modulan la actividad del AhR en la vía inducida por TCDD en un bioensayo para dioxina con el método de Ah-I, que es un ensayo de unión al receptor extraído de células hepáticas de mamíferos (Amakur et al., 2008). También nuestro equipo de trabajo ha realizado estudios con otros polifenoles como la morina, en donde se encontró que en concentraciones menores a 2.5 mg/kg producen un efecto positivo en la proliferación neuronal (Ignacio, 2019).

Actualmente se sabe que los polifenoles tienen acciones benéficas sobre el sistema nervioso (Williams y Spencer, 2012), por lo tanto, conocer el significado fisiológico del efecto producido por la α -mangostina a bajas concentraciones resulta interesante para comprender la participación del AhR en células de Schwann S16. Con los resultados obtenidos se puede inferir un efecto de la α -mangostina sobre AhR, por el cambio en la localización celular que presentó el AhR en los diferentes tratamientos. Por esta razón, y considerando que hay una preferencia general del AhR hacia sustancias químicas con una estructura plana y con menos extensión en las posiciones mediales y extensiones más grandes en las posiciones laterales (Xing et al., 2012); podría considerarse a la α -mangostina como un ligando exógeno del AhR, ya que al ser un polifenol, con una estructura plana, de sistema aromático tricíclico [C6-C3-C6], unido a diferentes sustituyentes: isopreno, grupos metoxilo e hidroxilo, se asemejan a los ligandos comunes del AhR como los hidrocarburos aromáticos halogenados, b[a]p o TCDD.

El dominio de unión al ligando mínimo del AhR se ha mapeado en la región PAS B y la secuencia inmediatamente después de PAS B (Coumailleau et al., 1995; Dolwick et al., 1993). Por lo tanto, cuando un ligando cruza la membrana plasmática, se une al AhR en el dominio PAS B (Larigot, 2018). No obstante, poco se sabe sobre la base estructural de las preferencias de ligando del AhR y la promiscuidad de ligando (Xing et al., 2012). Por lo tanto, si α -mangostina activara la cascada de señalización canónica de AhR, se debe identificar el proceso en el cambio de la localización (citoplasmático, perinuclear, distribución celular) que produce la α -mangostina sobre el AhR.

Esto, dado que muchos compuestos polifenólicos reaccionan fácilmente con los componentes de medios de cultivo celular generando H_2O_2 , quinonas y semiquinonas capaces de inducir alteraciones en la actividad celular (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013).

8. Conclusiones

- Tomando en cuenta las observaciones; se puede notar la variación en la localización del AhR sin la aplicación de un estímulo, la localización depende de la confluencia celular. En confluencias bajas la localización del AhR es citoplasmática, mientras que en confluencias altas, la localización del AhR es nuclear en el caso de células de Schwann S16.
- La α -mangostina en células de Schwann S16 tiene un efecto citotóxico. Al realizar los análisis estadísticos pertinentes, se obtuvieron valores significativos en el ensayo de 24 y 48 h en la concentración de 10 μM .
- Las células de Schwann S16 presentan AhR y la α -mangostina es capaz de cambiar su localización, dependiendo de la concentración; encontrando valores significativos para bajas concentraciones 1 y 2.5 μM , en ensayos de 24 y 48 h.

9. Perspectivas

- Evaluar con diferentes tratamientos de α -mangostina para conocer si promueve translocación nuclear.
- Emplear diferentes métodos que nos permitan determinar si la localización del AhR es nuclear o citoplasmática e identificar si la α -mangostina es un ligando exógeno del AhR.
- Identificar en que vías de señalización se encuentra relacionada la α -mangostina con el AhR. Además de Identificar si α -mangostina tiene actividad antiinflamatoria dependiente del AhR, para esto se propone establecer un modelo inflamatorio en las células de Schwann S16 usando lipopolisacarido (LPS).

10. Bibliografía

1. Aisha A, Abu-Salah K, Ismail Z, Majid A. (2012) In vitro and in vivo anti-colon cancer effects of *Garcinia mangostana* xanthonic extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12: 104.
2. Amakura Y., Tsutsumi T., Sasaki K., Nakamura M., Maitani T. (2008) Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay. *Elsevier. Phytochemistry* 69 3117-3130.
3. AMMIM (2016) Propiedades medicinales de las xantonas del mangostán. Consultado en línea 28/11/16. Disponible en: http://www.ammim.org/index.php?option=com_content&view=article&id=1648:propiedades-medicinales-de-las-xantonas-del-mangostan-referencias-bibliograficas-unam&catid=27:articulos-completos&Itemid=514.
4. Brage R. y Trapero I. (2010) Bases de la farmacología clínica. Valencia, España. Open course ware. Pp 3.
5. Brockes J., Fields K., Raff M., (1979) Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Research*, 165(1), 105-118.
6. Busbee, P. B.; Rouse, M; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S. (2013). Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *NutritionReviews* Vol 71 (6): 353-369.
7. Chen L.G., Yang L.L., Wang C.C.(2008) Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46:688–693.
8. Cho YC, et al. (2004) Disruption of cell–cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol. Apl. Pharmacol.* Vol. 199 pág. 220-238.
9. Claramunt R.; Cornago P.; Esteban S.; Farrán Ma.; Pérez M.; Sanz del Castillo D. (2015). Principales compuestos químicos. Universidad Nacional de Educación a distancia Madrid, España. Consultado en línea 11/03/18: https://books.google.com.mx/books?id=K45iAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=principales+compuestos+quimicos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiZn_Gk_OTZAhUP6mMKHb7kB6QQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false.
10. Cohen, P.S.; Arruda, J.C.; Williams, T. y Laux, D.(1985) Adhesion of a human fecal *E.coli* strain to mouse colonic mucus. *Infect Immun.* 48. 1985: 139-145.
11. Coumailleau P., Poellinger L., Gustafsson J. A., Whitelaw M. L.(1995). Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J. Biol. Chem.*270, 25291–25300.
12. De la Fuente I., Alcalde I., Gamboa O., Garrosa M. Y Gayoso M.(2012) A method for obtaining Schwann cell cultures from adult rabbit nerve base done in vitro predegeneration and neuregulin treatment. *Histol. Histopathol.* 27,95-102.
13. Delgado Bautista M. (2015) Perspectiva actual de los polifenoles en México. *Entre textos* Vol 21 (7), ISSN: 2007-5316.
14. Dietrich C. y Kaina B. (2010) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell–cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*, Volume 31, Issue 8 1319–1328.

15. Dragendorff O. (1931) Veber das harz von *Garcinia mangostana* L. *Justus liebig's Ann. Der chem* 482: 280-301.
16. Doi H., Shibata M., Shibata E., Morimoto J., Akao Y., Iinuma M., Tanigawa N., Otsuki Y. (2009) Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer. *Anticancer Res.* 2009;29:2485–2495.
17. Eagle H., & Levine E. (1967) Growth regulatory effects of cellular interaction, *Nature*. Vol. 213 (pg. 1102-1106).
18. Estrada Muñiz E. (2001) Coumarinas y xantonas de *Calpyllum brasiliense*: evaluación de su actividad antiviral, citotóxica y antibacteriana. Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM, México. Pp. 8.
19. Gratacós M. (2016) Células de Schwann: Características, Anatomía y Funciones.
20. García A. (2016) Estudio de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en cultivos primarios de astrocitos. Facultad de Química, UNAM. México, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular UNAM-INNyN "Instituto de Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" Pp 2.
21. Gutierrez-Orozco F. y Failla M. (2013) Biological Activities and Bioavailability of Mangosteen Xanthenes: A Critical Review of the Current Evidence. *Nutrients* 5, 3163-3183.
22. Gutierrez-Orozco F, Chitchumroonchokchai C, Lesinski GB, Suksamrarn S, Failla ML.(2013) α -Mangostin: Anti-Inflammatory Activity and Metabolism by Human Cells. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2013;61(16):3891-3900. doi:10.1021/jf4004434.
23. Holst O., Ulmer A., Brade H., Flad B., Rietschel E. (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 16(1996) 83-104.
24. Ignacio A. (2019) Efecto de la morina sobre la neurogénesis en ratones adultos sanos. Facultad de Ciencias, UNAM. México, Unidad Periférica de Neurociencia UNAM-INNyN Instituto de Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".
25. Ikuta T., Kobayashi Y. y Kawajiri K. (2004) Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor, *J. Biol. Chem.* Vol. 279 (pg. 19209-19216).
26. IQB (2016) Células de Schwann. Atlas de neurología. Consultado en línea 24/05/16: <http://www.iqb.es/neurologia/atlas/celulas/celula06.htm>.
27. Juricek L., Carcaud J., Pelhaitre A., Riday T., Chevallier A., Lanzini J., Auzeil N., Laprévotte O., Dumont F., Jacques S., Letourneur F., Massaad C., Agulhon C., Barouki R., Beranek M. & Coumoul X. (2017). AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation.
28. Kritsanawong S, Innajak S, Imoto M, Watanapokasin R. (2016) Antiproliferative and apoptosis induction of α -mangostin in T47D breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2016; 48(5):2155-65. *Sci Rep.* 2017; 7: 9794.
29. Larigot L., Juricek L., Dairoub J., Coumoul X.(2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochime Open*.Volume 7 2018,1-9.

30. León J (1987) Botánica de los cultivos tropicales. San José Costa Rica, Editorial IICA, Pp. 352.
31. López A. y Hurtado H. (1993) La Célula de Schwann. Biomédica, Revista del Instituto Nacional de Salud. Vol. 13, Núm. 4 I-ISSN 2590-7379.
32. Liu S.H., Lee L.T., Hu N.Y., Huang K.K., Shih Y.C., Munezazu I., Li J.M., Chou T.Y., Wang W.H., Chen T.S. (2012) Effects of α -mangostin on the expression of anti-inflammatory genes in U937 cells. Chin. Med. 2012;7:19. doi: 10.1186/1749-8546-7-19.
33. Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 79:727–747.
34. Mandrell, R.E. y Apicella, M.A. (1993) Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. Immunobiology. 187: 382-402.
35. Morales P. (2011) Células de Schwann. Consultado en línea 11/05/16. Disponible en: <http://biologia.laguia2000.com/citologia/celula-de-schwann>.
36. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol 65:55-63.
37. Murakami M. (1932) Über die constitution des mangostins. Liebigs. Ann 496:122-151.
38. Ndubaku U y de Bellard ME (2008) Glial cells: Old cells with new twists. Acta Histochem. 110:182-195.
39. Ohtake F., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2009). AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions, Biochem. Pharmacol. Vol. 77 (pg. 474-484).
40. Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., Pérez-Rojas J.M. (2008) Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*) Food Chem. Toxicol. 2008;46:3227–3239. doi: 10.1016/j.fct.2008.07.024.
41. Quiñones M., Miguel M. y Alexicandre A. (2012) Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria 2012;27(1):76-89 ISSN 0212-1611.
42. Raetz, C. y Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71. (2002): 635-700.
43. Reyes D., Bulavina L y Pivneva T.(2014) La glía, el pegamento de las ideas. Comunicación libre. Ciencia
44. Rodríguez M. (2014) Valoración cuantitativa del crecimiento del cultivo de células de Schwann de rata. Valladolid. Trabajo fin de master. Pp 26-27.
45. Romero S. y Iregui C. (2010) Lipopolysaccharide. Rev. Med. Vet. No.19 Bogotá
46. Ross M. y Pawlina W. (2006) Histology: A text and atlas correlated cell and molecular biology. Copyright by J.B. Lippincott Williams & Wilkins, INC. EE.UU. Pp 363.
47. Sango K, Kawakami E, Yanagisawa H, Takaku S, Tsukamoto M, Utsunomiya K et al. (2012) Myelination in coculture of established neuronal and Schwann cell lines. Histochem Cell Biol. 2012;137:829-839.
48. Serrano E. (2014) Modulación de marcadores neuroinflamatorios por la xantona v aislada del duramen de calophyllum brasiliense en astrocitos corticales de rata. Facultad de Ciencias, UNAM, México, Unidad Periférica de Neurociencia UNAM-

- INNyN Instituto de Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"
Pp. 26-39.
49. Stommel J., Marchenko N., Jimenez G., Moll U., Hope T., Wahl G. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES Masking. *The EMBO Journal* (1999) 18, 1660-167.
 50. Templeman F. (2008) *The Next Generation of supplementary feed for to Health. Mangosteen the factor X 3 edition.* Pp 1-53.
 51. Vázquez G.; Rubio J.; Espinoza J. (2016) Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. D.R. Tip. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 19(1):54-67.
 52. Williams R. and Spencer J. (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free radical biology and medicine* 52(1). Elsevier Inc.: 1292-1303.
 53. Xing Y., Nukaya M., Satyshur K., Jiang L., Stanevich V., Korkmaz Burdette E., Kennedy G., Cui Q. y Bradfield C. (2012) Identification of the Ah-Receptor Structural Determinants for Ligand Preferences. *Toxicological Sciences*, Volume 129, Issue 1, 1 September 2012, Pages 86–97.
 54. Yates P. y G.H. Stout (1958) The structure of mangostin. *Journal of the American Chemical Society* 80: 1691-1700.
 55. Zokiva N. (2014) Natural Pain Relief with Mangosteen Powder Extract Consultado en línea 24/05/16. Disponible en: <http://www.zokiva.com/blogs/news/15201369-natural-pain-relief-with-mangosteen-powder-extract>.