



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

NEUROTOXICIDAD POR YODOACETATO
EN CULTIVOS DE NEURONAS
GRANULARES DE CEREBELO:
ACTIVIDAD DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES Y EFECTO PROTECTOR
DEL ÁCIDO NORDIHIIDROGUAYARÉTICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

**NOEMÍ CÁRDENAS
RODRÍGUEZ**

Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

Diciembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

NEUROTOXICIDAD POR YODOACETATO EN CULTIVOS DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO: ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y EFECTO PROTECTOR DEL ÁCIDO NORDIHDROGUAYARÉTICO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209, edificio F, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Rolando E. Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Liliana Quintanar, del Departamento de Química del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV, IPN), por sus sugerencias durante la elaboración de este proyecto.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Omar Noel Medina Campos en los experimentos de cinética enzimática.

Se reconoce la asesoría de la M. en C. Marisol Orozco Ibarra en el cultivo de neuronas granulares y los experimentos de neurotoxicidad.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Rolando E. Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Agradecimientos

A Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Massieu, a la Dra. Liliana Quintanar y al Dr. Rolando Hernández por sus valiosas sugerencias en los tutorales.

A la Dra. Silvia Guzmán Beltrán por su apoyo en mis dudas durante la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Esaú Floriano Sánchez por darme enseñanzas científicas nuevas (y también aquellas no relacionadas con la ciencia).

A mis compañeros del laboratorio 209: Sabina, Sonia, Octavio, Susana, Laura, Ericka, Irasema, Eva y Elvia por los muy buenos momentos que pasamos juntos.

A todos mis amigos de la carrera por no olvidarse de mí, en especial a Nadia, Roberto, Noemí, Gustavo, Belém y Eva.

A mis profesores: la maestra Silvia Mendoza Arellano, la maestra Ernestina Cervera, a la maestra Lucía Cornejo, al maestro Pedro Villanueva y al maestro Adolfo García Osuna por enseñarme muchas cosas que apliqué en esta etapa de mi vida.

Dedicatorias

A mis padres Noemí y Víctor

Por ayudarme a no desesperarme y apoyarme con la realización de este proyecto.

A mi hermana Annia

Por sus ocurrencias que me alegraron la vida y por su apoyo técnico.

A mi hermano Víctor Iván

Por sus muchos consejos que me hicieron pensar en el propósito de mi vida.

A mi amado novio

Por ser la felicidad en mi vida, pero sobre todo, por aceptarme como soy, escucharme y hacerme ver otras facetas de la vida.

Siento tu alma

*Aún cuando estoy sola
y se que tu estás lejos
veo brillar algo,
un prisma, espejo, reflejos muy intensos.*

*Es cuando cierro los ojos
y entonces me doy cuenta
que no es la soledad lo que yo siento
es algo más...Algo más que un simple sentimiento, encuentro.*

*Coloco mi mano en el corazón,
relampagueo, tiemblo
es cuando entendí entonces
que es tu alma la que está cercana, abrasador.*

*No necesito sentir más dolor,
ni más amargura, decepción
la tristeza se va
una vez que estás conmigo, amor.*

*La vida una vez se me fue
la que muchas veces tu has regresado
y es que de las muchas cosas que he alcanzado
la más importante es aquello que no se ve, ausencia.*

*Aquello que no es percibido
y que tu me has dado
es la contemplación de tu espíritu
breve, etéreo y lacrado .*

*Pido a Dios que no se extinga
la presencia que de tu alma emana
de la que bebo cual si fuera néctar,
ambrosía, licor sagrado.*

*Pero más pido a Dios, lo imposible,
que permita que esa esencia, la que te acompaña
vaya a mi lado siempre, seamos una,
al abrir mis ojos cada mañana.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

1

I. ANTECEDENTES

3

I.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN).

3

Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante: Importancia biológica.

I.1.1. Estrés oxidativo

3

I.1.2. Definición de radical libre

4

I.1.3. Reducción univalente del oxígeno

4

I.1.4. Formación de ERO

5

I.1.4.a. Oxígeno singulete

5

I.1.4.b. Anión superóxido

6

I.1.4.c. Peróxido de hidrógeno

6

I.1.4.d. Radical hidroxilo

6

I.1.4.e. Anión peroxinitrito

7

I.1.4.f. Ácido hipocloroso

7

I.1.4.g. Peroxilo, alcoxilo

7

I.1.4.h. Producción de ozono

7

I.1.5. Mecanismos antioxidantes de defensa a nivel celular y extracelular

8

I.1.5.1. Agentes antioxidantes de alto peso molecular

8

I.1.5.1.a. Superóxido dismutasa (SOD): Cu-Zn SOD y MnSOD

8

I.1.5.1.b. Catalasa (CAT)

8

I.1.5.1.c. Glutación peroxidasa (GPx)

8

I.1.5.1.d. Glutación reductasa (GR)

9

I.1.5.1.e. Glutación-S-transferasa (GST)

9

I.1.5.1.f. Tiorredoxina (Trx)

9

I.1.5.1.g. Tiorredoxina reductasa (TrxR)

10

I.1.5.1.h. Peroxirredoxinas (Prxs)

10

I.1.5.2. Agentes antioxidantes de bajo peso molecular

10

I.2. Estrés oxidativo y neurotoxicidad

11

I.3. Actividad del yodoacetato

13

I.4. Papel del yodoacetato en la generación de ERO

13

I.5. Características del ácido nordihidroguayarético (NDGA)

15

I.5.1. Introducción

15

I.5.2. Descripción botánica, distribución y propiedades medicinales de <i>Larrea tridentata</i>	15
I.5.3. Propiedades del NDGA en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	16
I.5.4. Capacidad antioxidante del NDGA en modelos celulares	17
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
V.I. Reactivos y métodos	20
V.I.1. Reactivos	20
V.I.2. Métodos	20
V.I.2.1. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo	20
V.I.2.2. Experimento de neurotoxicidad	21
V.I.2.3. Evaluación de viabilidad celular	21
V.I.2.4. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes	22
V.I.2.4.a. Obtención del homogenado celular	22
V.I.2.4.b. Catalasa (CAT)	22
V.I.2.4.c. Glutación peroxidasa (GPx)	23
V.I.2.4.d. Glutación reductasa (GR)	23
V.I.2.4.e. Glutación-S-transferasa (GST)	23
V.I.2.4.f. Determinación de proteínas totales por el método de Lowry	24
V.I.2.5. Determinación de la presencia de estrés oxidativo y de la inhibición metabólica inducida por yodoacetato	24
V.I.2.5.a. Determinación de la actividad enzimática de aconitasa y fumarasa	24
V.I.2.5.b. Determinación de la actividad enzimática de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH)	25
V.I.2.6. Evaluación del efecto alquilante del IAA en la actividad de GR y GST	25
V.I.2.7. Evaluación del efecto del NDGA en la neurotoxicidad inducida por IAA	25
V.I.2.8. Análisis estadístico	26

VI. RESULTADOS	27
VI.1. Efecto de la toxicidad inducida por IAA en la viabilidad de los cultivos de NGC	27
VI.2. Efecto de la toxicidad inducida por IAA en la actividad de enzimas antioxidantes de los cultivos de NGC	28
VI.3. Evaluación del efecto alquilante del IAA en GR y GST	31
VI.4. Efecto del NDGA en la toxicidad inducida por el IAA en los cultivos de NGC	33
VII. RESUMEN DE RESULTADOS	39
VIII. DISCUSIÓN	39
IX. CONCLUSIONES	46
X. PERSPECTIVAS	46
XI. REFERENCIAS	47

ABREVIATURAS

ERO: Especies reactivas de oxígeno
ERN: Especies reactivas de nitrógeno
RL: Radical libre
O₂: Oxígeno
O₂^{•-}: Superóxido
HO[•]: Hidroxilo
RO₂[•]: Peroxilo
RO[•]: Alcoxilo
HO₂[•]: Hidroperoxilo
¹O₂: Oxígeno singulete
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
O₃: Ozono
ONOO⁻: Peroxinitrito
NO[•]: Óxido nítrico
HOCl: Ácido hipocloroso
HOBr: Ácido hipobromoso
COX: Citocromo oxidasa
iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible
eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial
nNOS: Sintasa de óxido nítrico neuronal
XO: Xantina oxidasa
MPO: Mieloperoxidasa
SOD: Superóxido dismutasa
CAT: Catalasa
GPx: Glutación peroxidasa
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
GR: Glutación reductasa
GST: Glutación-S-transferasa
Trx: Tiorredoxina
TrxR: Tiorredoxina reductasa
Prxs: Peroxirredoxinas
NMDA: N-metil-D-aspartato
PLA₂: Fosfolipasa A₂
AA: Ácido araquidónico
LOX: Lipooxigenasa
NGC: Neuronas granulares de cerebelo
IAA: Yodoacetato
NDGA: Ácido nordihidroguayarático
DIV: Días in vitro
GA3PDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
DCFH-DA: 2,4-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHR-123: Dihidrorodamina 123
BHT: Hidroxitolueno butilado
2,3-DHBA: Ácido 2,3-dihidroxibenzóico
2,5-DHBA: Ácido 2,5-dihidroxibenzóico
BSO: L-butionina sulfoximina
TBARS: Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

RESUMEN

ANTECEDENTES: El yodoacetato (IAA) inhibe en forma irreversible a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH), lo cual disminuye la degradación de la glucosa y la producción de ATP, por lo que la toxicidad por IAA constituye un modelo de inhibición metabólica. Además del efecto anterior, el IAA puede modificar covalentemente a grupos tiol e hidroxilo de otras enzimas. En diferentes cultivos neuronales, como el de las neuronas granulares de cerebelo (NGC), el IAA genera especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical hidroxilo (HO^\bullet) y el uso de diversos antioxidantes disminuye la producción de las ERO y la muerte celular.

JUSTIFICACIÓN: En los cultivos primarios de NGC no está claro si los antioxidantes que protegen a las neuronas del daño por IAA son capaces de prevenir la inhibición de la GA3PDH por IAA. En este trabajo se usó el ácido nordihidroguayarático (NDGA) como un potencial agente neuroprotector en este modelo experimental debido a que es un antioxidante natural que es especialmente eficaz para atrapar HO^\bullet (concentración inhibidora al 50%, $\text{CI}_{50} = 0.15 \mu\text{M}$), el cual está involucrado en la neurotoxicidad por IAA. Con el NDGA también podremos establecer si este antioxidante previene la inhibición de GA3PDH inducida por IAA. Tampoco está claro si el IAA es capaz de inhibir directamente a las enzimas antioxidantes a las concentraciones que causan daño neuronal. Es importante establecer lo anterior debido a que si el IAA inhibe directamente a las enzimas antioxidantes; dicha inhibición podría contribuir a explicar el aumento de las ERO inducido por IAA.

HIPÓTESIS: En los cultivos primarios de NGC se modifica la actividad de algunas enzimas antioxidantes en presencia de IAA y el NDGA, por sus propiedades antioxidantes intrínsecas, es capaz de atenuar la neurotoxicidad inducida por IAA.

OBJETIVOS: Evaluar el efecto del IAA en la actividad de algunas enzimas antioxidantes y determinar el efecto del NDGA sobre la neurotoxicidad inducida por IAA en cultivos de NGC.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL: (1) Establecer la CI_{50} del efecto tóxico del IAA medido 24 h después de 30 min de exposición en las NGC. (2) Evaluar el efecto del IAA, $30 \mu\text{M}$, sobre la viabilidad celular y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) a las 2, 4 y 6 h después de 30 min de incubación con el tóxico, (3) Evaluar el posible efecto alquilante directo del IAA sobre GR y GST. (4) Evaluar el posible efecto protector del NDGA $20 \mu\text{M}$, sobre la neurotoxicidad inducida por IAA en los cultivos de NGC a las 24 h después de 30 min de incubación con el tóxico. (5) Determinar el efecto del NDGA $20 \mu\text{M}$ sobre la disminución de la actividad de GA3PDH inducida por IAA a las 24 h después de 30 min de incubación con el tóxico. (6) Determinar el efecto del NDGA sobre el estrés oxidativo inducido por 18.4 y $25 \mu\text{M}$ de IAA monitoreado a través de las actividades de aconitasa y fumarasa a las 8 y 24 h después de 30 min de incubación con el tóxico.

RESULTADOS: El IAA causó un decremento en la viabilidad celular en forma dependiente de la concentración con una CI_{50} de 18.4 μM a las 24 h después de 30 min de incubación con el tóxico. El IAA a una concentración de 30 μM aumentó la actividad de CAT a las 4 h, la de GPx y la de GST a las 6 h y no modificó la actividad de GR, aunque si se observó una disminución significativa de la viabilidad celular a estos tiempos. El IAA no ejerció un efecto alquilante directo en la GR y la GST. El NDGA, a una concentración de 20 μM , previno significativamente la neurotoxicidad inducida por IAA a concentraciones de 18.4, 25 y 30 μM . El NDGA no fue capaz de prevenir la disminución de la actividad de la GA3PDH, inducida por IAA a 18.4 y 25 μM ; sin embargo, parece prevenir la aparición de estrés oxidativo a las 8 y 24 h después de la incubación de las células con el tóxico.

CONCLUSIONES: El IAA a una concentración de 30 μM no inhibe la actividad antioxidante enzimática al menos durante las primeras 6 h posteriores a la incubación durante 30 min con el tóxico. Asimismo, no ejerce una inhibición directa sobre la actividad de GR y GST, lo que sugiere que la inhibición de las enzimas antioxidantes no es un mecanismo por medio del cual el IAA induce la aparición de estrés oxidativo. La preincubación con NDGA 20 μM previene la neurotoxicidad inducida por IAA en las NGC por un efecto antioxidante intrínseco y no porque evite la inhibición de la actividad de GA3PDH. Los resultados encontrados sugieren que el mecanismo por el cual actúa el NDGA como un agente citoprotector es por su capacidad antioxidante directa.

I. ANTECEDENTES

I.I. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante: Importancia biológica.

En las últimas dos décadas ha tomado mucha importancia el estudio de los radicales libres de oxígeno mejor conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) y de las especies reactivas de nitrógeno (ERN) en medicina clínica y experimental. Las ERO y ERN: (a) son generadas durante la irradiación por luz UV, rayos X y por rayos gamma (b) son productos de reacciones catalizadas por metales (c) están presentes en contaminantes atmosféricos (d) son producidos por neutrófilos y macrófagos durante la inflamación (e) son subproductos de las reacciones catalizadas por los transportadores de electrones en mitocondria.

Las ERO y ERN son conocidas por participar con un papel dual en sistemas biológicos, puesto que pueden ser benéficos o dañinos. Los efectos benéficos de las ERO se evidencian en su papel fisiológico en respuestas celulares y en numerosos sistemas de señalización celular como inducción de respuestas mitogénicas. En contraparte, a altas concentraciones, las ERO pueden ser importantes mediadores de daño a diversas estructuras celulares: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los efectos benéficos de las ERO son complementados por la acción de antioxidantes no enzimáticos en adición al sistema enzimático antioxidante. A pesar de la presencia del sistema antioxidante de defensa para combatir el daño oxidativo producido por las ERO, este daño es acumulado durante todo el ciclo de vida de los organismos, ocasionando daño al ADN, a proteínas y a lípidos, por lo que ha sido propuesto que juegan un papel muy importante en el desarrollo de muchas enfermedades, tal como el cáncer, aterosclerosis, artritis, desórdenes neurodegenerativos y otras condiciones (Valko *et al.*, 2006).

I.I.I. Estrés oxidativo

Este término es ampliamente utilizado para referirse al desequilibrio entre la producción de ERO/ERN y los mecanismos de defensa antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1999). El estrés oxidativo es ocasionado por la alta producción de estas especies reactivas o un decremento en la capacidad antioxidante endógena (Roth *et al.*, 2004).

I.1.2. Definición de radical libre

Los radicales libres (RL) pueden ser definidos como moléculas o fragmentos moleculares, capaces de existir independientemente y que contienen uno o más electrones desapareados (Valko *et al.*, 2006; Halliwell y Gutteridge, 1999). Un electrón no apareado es uno que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo. La presencia de electrones no apareados usualmente confiere un considerable grado de reactividad a los RL, pues ocasiona que estos últimos sean atraídos por un campo magnético (paramagnéticos). Los RL pueden generarse por: (a) la pérdida de un electrón de un no radical, (b) la ganancia de un electrón de un no radical o (c) la ruptura homolítica de una molécula.

La presencia de RL derivados de oxígeno representa la fuente más importante de estas especies generadas en sistemas vivos (Valko *et al.*, 2004). Cabe mencionar que la expresión “especies reactivas de oxígeno” es un término colectivo que involucra no sólo los RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno (O₂) y que además son muy reactivos (ver Tabla 1).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.

Radicales	No-radicales
Superóxido (O ₂ ^{•-})	Oxígeno singulete (¹ O ₂) forma ¹ Δ
Hidroxilo (HO [•])	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Peroxilo (RO ₂ [•])	Ozono (O ₃)
Alcoxilo (RO [•])	Anión peroxinitrito (ONOO ⁻)
Hidroperoxilo (HO ₂ [•])	Ácido hipocloroso (HOCl)
Oxígeno singulete (¹ O ₂) forma ¹ Σ	Ácido hipobromoso (HOBr)

Las fuentes de ERO incluyen a la mitocondria, citocromo P450, peroxisomas y activación de células inflamatorias (Inoue *et al.*, 2003). La mitocondria es uno de los sitios que más significativamente genera H₂O₂.

I.1.3. Reducción univalente del oxígeno.

Si un solo electrón es añadido al O₂ en uno de sus orbitales π* el producto es el radical superóxido O₂^{•-}. La adición de otro electrón al O₂^{•-} produce el ión peróxido, (O₂²⁻). Usualmente, en los sistemas biológicos la adición de dos electrones y de dos protones al O₂ genera H₂O₂, finalmente la adición de cuatro electrones y dos protones al O₂ producen agua, la forma completamente reducida del O₂. A esta serie de reacciones se le conoce como vía de reducción univalente del O₂ (Figura 1), lo que contrasta con la reducción tetravalente del O₂ catalizada por la citocromo oxidasa (COX). El H₂O₂ y O₂^{•-} no escapan como intermediarios durante la reducción del O₂ llevada a cabo por la COX (Imlay, 2003).

I.1.4. Formación de ERO

De acuerdo a la Tabla 2, el O₂ es una molécula biatómica que se considera como RL al poseer dos electrones desapareados, cada uno localizado en diferentes orbitales pi antienlace (π*). Estos dos electrones tienen el mismo número cuántico de espín (espines paralelos), estando entonces en un nivel energético estable, es por ello que el O₂ puede actuar como un agente oxidante, aceptando sólo un electrón por evento. Esto que explica porqué el O₂ se comporta como un no RL (Imlay, 2003; Halliwell y Gutteridge, 1999). A continuación se describirá la formación de las ERO.

I.1.4.a. *Oxígeno singulete*. La forma más reactiva de oxígeno es el oxígeno singulete. Existen dos estados: el estado delta (¹Δ) el cual posee una energía de excitación de 93.6 kJ por encima del O₂ y el estado sigma (¹Σ) el cual es el más reactivo y posee una energía de excitación de 157 kJ por encima del O₂, aunque de acuerdo a la tabla 2, la forma ¹Δ, no es un RL (Imlay, 2003; Inoue, 2003; Halliwell y Gutteridge, 1999).

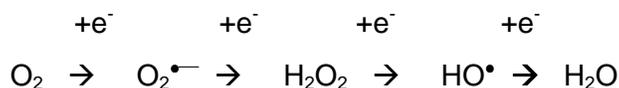
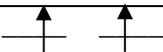
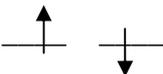


Fig. 1. Reducción univalente del oxígeno

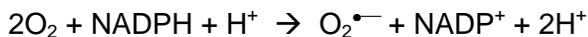
Tabla 2. Configuración electrónica de algunas moléculas de O₂ en el orbital 2π* (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006)

Especie de oxígeno	Configuración electrónica en el orbital 2π*
Dioxígeno (O ₂)	
Oxígeno singulete (¹ O ₂) forma ¹ Σ	

forma $^1\Delta$	
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	

I.1.4.b. *Anión superóxido*: La formación del $O_2^{\bullet-}$ ocurre por la reducción univalente del O_2 ; es decir, cuando el O_2 acepta un electrón. Esta especie es relativamente inestable y se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroperoxilo. El $O_2^{\bullet-}$ tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de O_2) de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en los eventos inmunológicos. Cuando estas células se activan, el complejo enzimático NADPH oxidasa, localizado en la membrana citoplasmática, reduce parcialmente el O_2 de la siguiente forma (Halliwell y Gutteridge, 1999; Winterbourn, 1993; Jamieson, 1989):

NADPH oxidasa



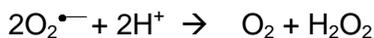
De la misma forma, la xantina oxidasa (XO) es capaz de reducir O_2 para dar el anión radical superóxido de acuerdo a la siguiente reacción:

XO



I.1.4.c. *Peróxido de hidrógeno*: El H_2O_2 es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunque no es un RL, tiene una gran lipofilicidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ en presencia de metales de transición, para generar HO^{\bullet} . Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios.

SOD



I.1.4.d. *Radical hidroxilo*: El HO^{\bullet} es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su vida media corta y alta reactividad, suele actuar en los sitios cercanos a donde se produce. La formación de HO^{\bullet} se puede lograr fácilmente por la reacción de Haber-Weiss entre el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 catalizada por un metal de transición (Halliwell y Gutteridge, 1999).

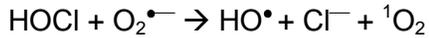
Fe^{2+}/Fe^{3+}



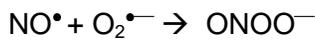
La reacción anterior es la suma de la reacción de Fenton (reacción a) y de la reacción b:



Ahora bien, el HO^\bullet también se puede formar a partir del HOCl:



I.1.4.e. *Anión peroxinitrito (ONOO^-)*: Este anión puede formarse por la combinación del radical óxido nítrico (NO^\bullet) y $\text{O}_2^{\bullet-}$:



El ONOO^- es un potente oxidante que induce la nitración de tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad. Se ha encontrado involucrado en varios estados patológicos (Chirino *et al.*, 2004, 2006). Un exceso en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede contrarrestar los efectos vasodilatadores del NO^\bullet induciendo vasoconstricción.

El NO^\bullet se forma enzimáticamente por medio de la óxido nítrico sintasa (NOS), una familia de enzimas con 3 isoformas producto de 3 genes distintos (Knowles y Moncada, 1994; Alderton *et al.*, 2001; Marguill *et al.*, 2005)

I.1.4.f. *Ácido hipocloroso*: Las peroxidasas son un grupo de enzimas que remueven el peróxido de hidrógeno para oxidar a otro sustrato. Una peroxidasa, en este caso, la mieloperoxidasa (MPO), presente en altas concentraciones en los gránulos de los neutrófilos, cataliza la conversión de H_2O_2 a ácido HOCl de acuerdo a la siguiente reacción:

MPO



La MPO también cataliza la oxidación de los iones Br^- , I^- y SCN^- .

I.1.4.g. *Peroxilo, alcoxilo*: Estos radicales se forman durante la ruptura de los peróxidos orgánicos y durante la reacción de radicales con átomos de carbono con oxígeno (RO_2^\bullet).

I.1.4.h. *Producción de ozono*: El ozono (O₃) es un gas de color azul pálido, protector contra la radiación solar y es abundante en las capas altas de la atmósfera. A diferencia del O₂, el O₃ no es un RL. El O₃ es producido por la fotodisociación del O₂ a dos átomos de O, cada uno de los cuales puede reaccionar con una molécula de O₂ (Halliwell y Gutteridge, 1999):

E



I.1.5. Mecanismos antioxidantes de defensa a nivel celular y extracelular

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Debido a que la producción de ERO ocurre fisiológicamente en los organismos aerobios, se hace necesario la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes de estas especies. Este sistema de defensa para su posterior explicación puede ser dividido en dos partes: agentes antioxidantes de alto peso molecular y agentes antioxidantes de bajo peso molecular. A continuación, se dan sus principales características:

I.1.5.1. *Agentes antioxidantes de alto peso molecular*

I.1.5.1.a. *Superóxido dismutasa (SOD): Cu-Zn SOD y Mn SOD*

Es una enzima que se encuentra en el citoplasma (Cu-Zn SOD), la cual es un homodímero de 32.5 KDa, contiene Cu(II) y Zn (II) en el sitio activo formando un puente con el imidazol o histidina. De la misma forma, se encuentra en la matriz mitocondrial (Mn-SOD), la cual es un homotetrámero de 95 KDa que contiene Mn(II) en su sitio activo. (Elshafey *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 1990; Ohta *et al.*, 1994; Valko *et al.*, 2006; Marklund, 1982).

La SOD, como se mostró anteriormente, cataliza la conversión del O₂^{•-} a H₂O₂.

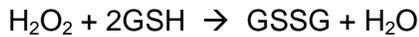
I.1.5.1.b. *Catalasa (CAT)*

Esta enzima es un tetrámero de aproximadamente 240 KDa (Cheng *et al.*, 1981) se encuentra principalmente en las mitocondrias y los peroxisomas, y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua:



I.1.5.1.c. *Glutación peroxidasa (GPx)*

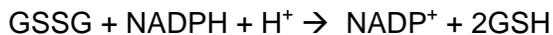
Esta enzima cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutación reducido (GSH). Los productos de la reacción son el glutación oxidado (GSSG) y el agua.



Es una selenoenzima presente como varias isoformas (Brigelius-Flohe, 1999; Chu *et al.*, 2004, Comhair y Erzurum, 2005; Hirota y Yasuhito, 2003): -La GPx citosólica (cGPx, GPx-1) está presente en el citosol de casi todos los tejidos en diferente distribución, funciona como antioxidante en el citosol. La GPx plasmática (pGPx, GPx-3) está presente en los fluidos extracelulares de varios tejidos, aunque es en riñón donde existe en una alta concentración. La GPx de fosfolípidos (PHGPx, GPx-4) está en la membrana y citosol de varios tejidos, funciona como antioxidante en membrana celular, esta isoforma es abundante en testículos. La GPx gastrointestinal (GI-GPx, GPx-2) está presente en el citosol de hígado y tracto intestinal en humanos, funciona como antioxidante en tracto gastrointestinal.

I.1.5.1.d. *Glutación reductasa (GR)*

Es una enzima que se encuentra en citoplasma y tiene a la coenzima FAD^+ en su sitio activo. Esta enzima cataliza la reducción de GSSG empleando la coenzima NADPH:



Las evidencias indican que el NADPH reduce a FAD^+ , el cual transfiere dos electrones a la unión disulfuro (-S-S-) entre dos residuos de cisteína del sitio activo. Los dos grupos -SH formados interactúan entonces con el GSSG reduciéndolo a dos moléculas de GSH. La GR mantiene los niveles adecuados de GSH en la célula (Harris, 1992).

I.1.5.1.e. *Glutación S-transferasa (GST)*

Hasta el momento se han encontrado las isoformas GST citosólicas y GST microsomales. Las GST citosólicas están divididas en cuatro familias principales: α , μ , π y θ , y en cuatro familias minoritarias: ζ , σ , κ y ω). Las GST citosólicas están constituidas por dos subunidades proteínicas idénticas, mientras que las GST microsomales son trímeros (Sharma *et al.*, 2004).

Su función primaria es catalizar la conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos (RX). La reacción general de esta enzima es:



Se ha demostrado que las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente de Se y que estas enzimas también pueden detoxificar al 4-hidroxinonal, un producto de la peroxidación de lípidos.

I.1.5.1.f. *Tiorredoxina (Trx)*

Es un polipéptido con un peso molecular de 12 kDa, especialmente distribuido en el retículo endoplásmico (Nakamura, 2005). Esta proteína contiene dos grupos tiol adyacentes en su forma reducida (SH) que se pueden oxidar a su forma disulfuro (S₂ o S-S):

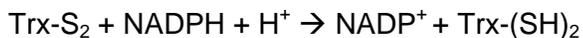


De acuerdo con la reacción anterior, la Trx puede aportar los electrones en diversas reacciones de óxido-reducción, de la misma manera puede reaccionar directamente con el H₂O₂. Por estas razones se considera que la Trx es una proteína antioxidante.



I.1.5.1.g. *Tiorredoxina reductasa (TrxR)*

Es una selenoproteína que contiene en su penúltimo carbono un residuo de selenocisteína, necesario para su actividad catalítica. Existen dos isoformas: la TrxR1 citosólica y la TrxR2 mitocondrial, razón por la cual se ubica principalmente en el citosol y la mitocondria (Nordberg y Arner, 2001). Las dos isoformas son homodiméricas con un FAD⁺ por subunidad, el cual reduce al grupo disulfuro del sitio activo. Su función es catalizar la reducción del polipéptido tiorredoxina (Trx):



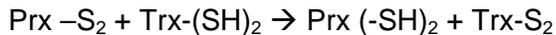
I.1.5.1.h. *Peroxirredoxinas (Prxs)*

Este grupo de enzimas son proteínas diméricas de aproximadamente 23 KDa se caracteriza por poseer residuos de cisteína en su centro catalítico, lo cual las identifica como enzimas antioxidantes específicas para el grupo tiol (Hirotsu *et al.*, 1999).

Están involucradas en la degradación enzimática de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y peroxinitrito, por lo tanto, las Prxs asumen un papel importante contra el estrés oxidativo.



La tioredoxina puede regenerar la forma reducida de las Prx



I.1.5.2. Agentes antioxidantes de bajo peso molecular

Los agentes antioxidantes de bajo peso molecular generalmente se clasifican como hidrosolubles (principalmente vitamina C, GSH y ácido úrico) y como liposolubles (principalmente vitaminas E y A y bilirrubina). Es importante señalar que tanto la vitamina C como la vitamina E se obtienen de la dieta. De la misma manera, se conocen otros antioxidantes que son obtenidos también de algunos alimentos, principalmente frutas y verduras, y que contribuyen a prevenir el estrés oxidativo, por ejemplo, compuestos carotenoides como el licopeno, la luteína y el beta-caroteno, y compuestos fenólicos como los flavonoles, flavonas, flavononas, antocianidinas y fenilpropanoides

I.2. Estrés oxidativo y neurotoxicidad

Existen diversos factores que pueden provocar daño neuronal; entre éstos se encuentra la excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato (N-metil-D-aspartato, NMDA), el daño producido por RL y la privación de un estímulo despolarizante (mimetizada por la ausencia de potasio). Para este estudio, nos enfocaremos en la neurotoxicidad provocada por especies reactivas.

Todos los organismos aerobios son susceptibles al estrés oxidativo, simplemente porque algunas especies semirreducidas de O_2 , tales como el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 , son producidas en la mitocondria durante el proceso respiratorio (Chance *et al.*, 1979). El cerebro es considerado un órgano sumamente sensible al daño oxidativo (Floyd y Carney, 1992) por la facilidad de la peroxidación de lípidos membranales en él (Zaleska y Floyd, 1985). Lo anterior puede explicarse porque contiene una gran cantidad de ácidos grasos fácilmente oxidables (20:4 y 22:6) y además porque no se caracteriza por tener una gran cantidad de defensas antioxidantes (Floyd y Carney, 1992). De hecho, el cerebro posee una baja actividad de CAT, de apenas alrededor del 10% de la actividad de esta enzima encontrada en hígado (Marklund *et al.*, 1982). Adicionalmente, el cerebro contiene una gran cantidad de hierro y en ciertas regiones presenta grandes cantidades de ascorbato; la mezcla hierro/ascorbato se caracteriza, en condiciones isquémicas, por tener un potente efecto prooxidante de membranas en cerebro (Zaleska *et al.*, 1989).

Los efectos mediados por el Ca^{2+} durante la activación de receptores de glutamato que conducen a degeneración neuronal dan lugar a la aparición de estrés oxidativo. La actividad Ca^{2+} -dependiente de fosfolipasa A_2 (PLA_2) mediada por receptores de NMDA libera ácido araquidónico

(AA), el cual genera $O_2^{\bullet-}$ a través de su metabolismo por lipooxigenasas y ciclooxigenasas para la formación de eicosanoides (Singh *et al.*, 2003). El NO^{\bullet} se forma a partir de grandes concentraciones de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). Ésta es una enzima que no requiere de calcio para su actividad, en contraste con las dos NOS constitutivas: eNOS y nNOS.

La formación de NO^{\bullet} de manera sostenida por la glia es neurotóxica, al aumentar la sensibilidad de las neuronas a esta especie reactiva. La acción neurotóxica del NO^{\bullet} se debe probablemente a la formación $ONOO^-$, el cual es formado por la rápida reacción del NO^{\bullet} con $O_2^{\bullet-}$. Además, el $ONOO^-$ puede reaccionar con la tirosina de las proteínas para formar 3-nitrotirosina (Hensley *et al.*, 1997). En condiciones de déficit energético y elevada concentración del Ca^{2+} intracelular, la xantina deshidrogenasa se convierte a XO por proteasas dependientes de Ca^{2+} (calpaína I) generando $O_2^{\bullet-}$. En este ambiente se genera ácido láctico, lo que promueve la liberación de Fe^{2+} y con ello promoverse la reacción de Haber-Weiss (Granger, 1988).

Estas especies reactivas se han encontrado como productos relacionados en procesos neuroinflamatorios en diversas regiones del cerebro (hipocampo, lóbulo parietal inferior y cerebelo) en personas que padecen Alzheimer. Existe además evidencia experimental que indica que el estrés oxidativo acompaña a enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson y Huntington, ya que se ha observado una generación de lipoperoxidación, oxidación de DNA y proteínas, un decremento en la actividad del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa y un almacenamiento excesivo de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (Gibson y Huang, 2004).

Aunque el cerebro es pobre en sustancias antioxidantes, como se mencionó antes, existen algunos compuestos antioxidantes de defensa tal como el ácido ascórbico, el α -tocoferol, el GSH y la GPx (Singh *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) son un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis en neuronas del sistema nervioso central debido a su facilidad de manejo y a la homogeneidad de las células presentes, ya que cultivos primarios de ratón y rata después de 3-8 días *in vitro* (DIV) presentan una proporción mayor al 90% de neuronas granulares (el resto son interneuronas inhibitoras y astrocitos) y desarrollan características correspondientes a las células maduras *in vivo*, como sería la completa maduración de las sinapsis glutamatérgicas desde los 7-9 DIV (Van-Vliet *et al.*, 1989; Currie y Dutton, 1980; Kingsbury *et al.*, 1985; Morán y Patel, 1989). En este tipo celular es posible estudiar la apoptosis ya que para el crecimiento y maduración de estas células es necesario exponerlas a la acción despolarizante del potasio, lo cual mimetiza el efecto de las entradas glutamatérgicas. (Valencia y Morán, 2001).

Ya se ha demostrado la aparición de estrés oxidativo durante la deprivación de potasio en las NGC. Las NGC cultivadas en un medio con 25 mM de potasio durante 6-8 DIV y transferidas a un medio con 5 mM de potasio presentan muerte celular con características apoptóticas. Esta muerte es

prevenida con el uso de Cu/Zn-SOD, CAT, dimetilsulfóxido y manitol, además de que se demostró una disminución en la concentración de Ca^{2+} intracelular seguido de un incremento de ERO a nivel citosólico y mitocondrial (Valencia y Morán, 2001). Asimismo, en otro estudio, estos autores sugirieron que la muerte neuronal apoptótica involucra la participación de $^1\text{O}_2$ y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ activando las caspasas 3 y caspasas 8 y 1, respectivamente, mientras que el H_2O_2 induce su muerte por necrosis (Valencia y Morán, 2004).

Por otro lado, en las neuronas, la activación de los receptores de glutamato seguida de un flujo de calcio a la mitocondria genera ERO, lo que indica que el secuestro de calcio en el interior de la mitocondria favorece la generación de estas especies en esta condición. Cabe mencionar que el mecanismo por el cual aumenta o disminuye la producción de ERO con la presencia de calcio aún no está totalmente dilucidado, aunque una probable explicación a este fenómeno es la formación de poros en la membrana mitocondrial, que puede llevar a la pérdida de citocromo c, de GSH y de aceptores de electrones (tal como NAD^+) en la matriz mitocondrial, favoreciendo el incremento de ERO (Chinopoulos *et al.*, 2006).

I.3. Actividad del yodoacetato

El yodoacetato (IAA) es un agente alquilante (Sperling *et al.*, 2003) que se caracteriza por ser un inhibidor irreversible, lo cual significa que modifica químicamente a la enzima, sin establecer un equilibrio con la enzima libre o con el complejo enzima-sustrato.

El IAA reacciona con los grupos tiol o hidroxilo de las enzimas a través de una interacción covalente (Uto *et al.*, 1995). La exposición de IAA 20 mM inhibe en un 67% la actividad de la glutatión sintasa (Gali y Board, 1997); el IAA a concentraciones de 1 y 10 mM inhibe en un 58 y en un 73%, respectivamente, la actividad de la GPx plasmática de eritrocitos humanos (Awasthi *et al.*, 1975; Mosialou *et al.*, 1993); también se ha observado la inhibición de XO de la leche en presencia de 0.1 mM de xantina y a diferentes concentraciones de IAA (0.09, 0.36 y 0.90 mM); (Green y O'Brien, 1967). La incubación de las células de *E. coli* con (^3H)ácido yodoacético alquila a la Trx en cisteína 32 (en el centro activo de esta enzima se encuentra una cisteína 32 o 35); (Kallis y Holmgren, 1980; Holmgren y Fagerstedt, 1982). También, se ha observado la inhibición de la actividad de GST de hígado de ratón en presencia de 200 mM de ácido yodoacético (40 min) por la alquilación de la cisteína 47 (Vega *et al.*, 1998).

El IAA inhibe irreversiblemente la actividad de la enzima glucolítica GA3PDH, ya que modifica covalentemente al grupo tiol de la cisteína 149 en su sitio activo (Uto *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 1997) produciendo una inhibición metabólica (Uto *et al.*, 1995; Reshef *et al.*, 1998).

I.4. Papel del yodoacetato en la generación de ERO en las neuronas

En cultivos de NGC, Malcolm *et al.* (2000) investigaron el efecto neurotóxico del IAA en cultivos de 6-8 DIV. Los autores observaron que el IAA ocasiona una reducción en la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración con un CI_{50} de $9.8 \mu\text{M}$ (IAA: $1 \mu\text{M}$ - 1mM). Se demostró la generación de ERO al adicionar IAA $30 \mu\text{M}$ (30 min) en los cultivos celulares en presencia de 2,4-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DFCH-DA). Al adicionar posteriormente BHT (hidroxitolueno butilado), U-83836 (compuesto aminoesteroide similar a la vitamina E) y trólox (análogo hidrosoluble de vitamina E), se observó una disminución en la fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF) en los cultivos obteniéndose un incremento en la viabilidad celular. Estos datos sugieren que uno de los mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por el IAA es la generación de especies reactivas. Uto *et al.* (1995) también observaron en forma indirecta la formación de ERO en cultivos neuronales corticales y de neuronas de hipocampo durante la isquemia inducida por IAA 0.1mM (5 min) en cultivos de 8 DIV. Se observó una disminución en la muerte neuronal al adicionar α -tocoferol (atrapador de radical peroxilo) $100 \mu\text{g/mL}$ en los cultivos, ya que se obtuvo un incremento en la viabilidad celular en ambos cultivos. Sperling *et al.* (2003) investigaron el papel de las ERO en la neurotoxicidad inducida por IAA en cultivos de neuronas corticales.

Para examinar el papel de las ERO en la muerte celular, los cultivos se expusieron a diferentes antioxidantes en presencia de IAA $100 \mu\text{M}$ a diferentes tiempos. Se probaron los siguientes antioxidantes: LY231617 $5 \mu\text{M}$ (antioxidante sintético que inhibe la lipoperoxidación dependiente de Fe^{2+}), α -tocoferol $100 \mu\text{M}$, SOD 500UI/mL y melatonina (atrapador de HO^\bullet) 1mM . La presencia de SOD confirió protección solamente después de retirar el tóxico, todos los antioxidantes protegieron en presencia del tóxico y LY231617 fue el único antioxidante que confirió protección antes de la adición del tóxico.

Matthews *et al.* (1997) también han demostrado que la administración intraestriatal de 50nM de IAA durante 60 min produce en las ratas lesiones en el estriado demostrando además la generación de HO^\bullet al determinar la conversión del salicilato a ácido 2,3 y 2,5-dihidroxibenzoico (2,3 y 2,5-DHBA) por HO^\bullet ; (Figura 2). Taylor *et al.* (1996) demostraron la generación de ERO en la línea celular del astrocitoma humano UC-11MG al incubar las células con $75 \mu\text{M}$ de IAA en presencia de $10 \mu\text{M}$ de DCFH-DA durante 5 horas. Los resultados mostraron un incremento máximo en la fluorescencia alrededor de las 3 h de incubación, mientras que durante los primeros 30 min de tratamiento no se observó la formación de ERO. Paralelamente a la producción de ERO; se observó lipoperoxidación de los ácidos grasos, aumento de permeabilidad de la membrana celular y liberación de ácido

araquidónico de la membrana plasmática. Al adicionar los antioxidantes lazaroides (antioxidantes 21-aminoesteroides sintéticos) U74006F 10 μ M, U78517F 1 μ M y el antioxidante NDGA 10 μ M, se inhibió la lipoperoxidación y se atenuó la severidad del daño producido a las células.

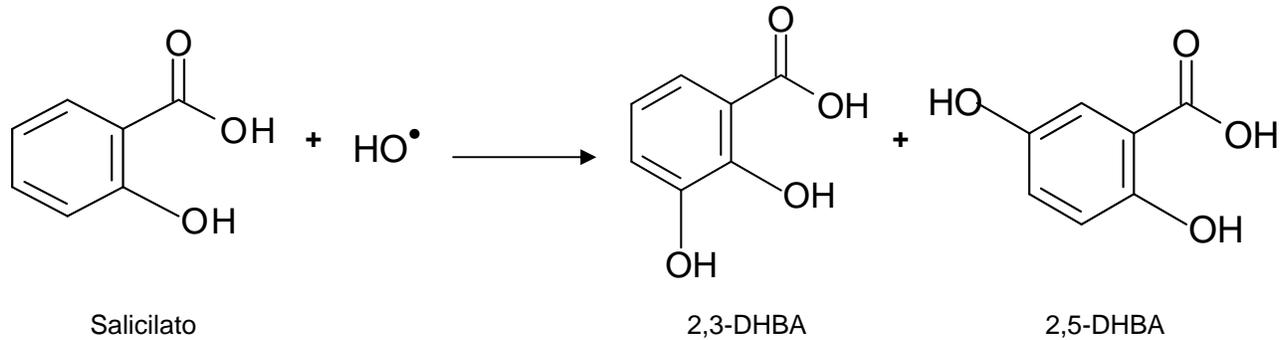


Fig. 2. Reacción del salicilato con el HO•.

1.5. Características del ácido nordihidroguayarático (NDGA)

1.5.1. Introducción

La planta *Larrea tridentata* es una notable fuente de productos naturales ya que aproximadamente hasta un 50% del peso seco de sus hojas está constituido por metabolitos secundarios a los que se les ha encontrado alguna actividad biológica. La resina que cubre sus hojas produce alrededor de 19 agliconas flavonoides así como muchos lignanos, destacando entre estos últimos el antioxidante NDGA (Konno *et al.*, 1990).

Algunos flavonoides glicosilados, sapogeninas, saponinas, aceites esenciales, alcaloides halogenados, terpenoides, cetonas, esteroides y ceras también se aíslan de *Larrea tridentata* (Argueta, 1994; Romo de Vivar, 1985; Xue *et al.*, 1988; Lara y Márquez, 1996). En términos de la química de los productos naturales, esta planta es mejor conocida por la gran cantidad de NDGA que produce la superficie de las hojas (Mabry y Bohnstedt, 1981). Se ha encontrado que entre un 5 al 10% del peso seco de las hojas está constituido por NDGA y 80% de todos los compuestos fenólicos de la planta se encuentran en la resina. En un estudio de la distribución de compuestos fenólicos secundarios se ha descrito que las flores, las hojas, tallos verdes y pequeños tallos leñosos contienen NDGA, con una alta concentración en hojas (38.3 mg/g) y en los tallos verdes (32.5 mg/g) (Hyder *et al.*, 2002).

1.5.2. Descripción botánica, distribución y propiedades medicinales de *Larrea tridentata*

Larrea tridentata es un arbusto de hoja perenne de 1-3 m de altura, bifurcado y nudoso pertenece a la familia Zygophyllaceae (Figura 3). La planta emite un olor penetrante y tiene un sabor amargo. Como es una planta perenne retiene muchas de sus hojas durante las sequías o bien, durante las bajas temperaturas. No es comestible y es usualmente tóxica, algunas veces causa la muerte.

L. tridentata conocida con los nombres de “arbusto del Creosote”, “chaparral”, “gobernadora”, “hediondilla” y “covil” es abundante en las áreas desérticas de México en estados como San Luís Potosí, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora, Zacatecas, Baja California Norte y Sur, y en el suroeste de Estados Unidos (Arizona, California, Nevada, Texas y Nuevo México). Se han encontrado especies similares en zonas áridas de Argentina y Bolivia. Cabe mencionar que la importancia de esta planta también radica en su larga historia de uso en la medicina tradicional. Con respecto a esto último se ha utilizado la infusión de las hojas, ramas y la infusión de la raíz de la planta para el tratamiento de trastornos relacionados con el aparato genitourinario y la diabetes; y la tintura y extractos alcohólicos de la planta y polvo de las hojas para el tratamiento de artritis, reumatismo, diarrea y enfermedades de la piel (Argueta, 1994; Tequida *et al.*, 2002; Verastegui *et al.*, 1996; Segura, 1978; Calzado-Flores *et al.*, 1995; Tyler y Foster, 1999; Lara y Márquez, 1996; Tyler y Foster, 1999; Winkelman, 1989; Arteaga *et al.*, 2005).



Fig. 3. *Larrea tridentata*

1.5.3. Propiedades del NDGA en modelos *in vivo* e *in vitro*

El NDGA es un compuesto que contiene dos grupos *o*-catecoles del grupo de los lignanos. Su nombre químico es 4,4'-(2,3-dimetil-1,4-butanediil)bis[1,2-bencenediol], con un peso molecular de 302.37 g/mol y un punto de fusión de 184.5°C (Figura 4). El NDGA es conocido como un inhibidor no selectivo de la lipooxigenasa (LOX) y por su capacidad antioxidante; sin embargo, este compuesto posee múltiples propiedades benéficas que se resumen en la Tabla 3.

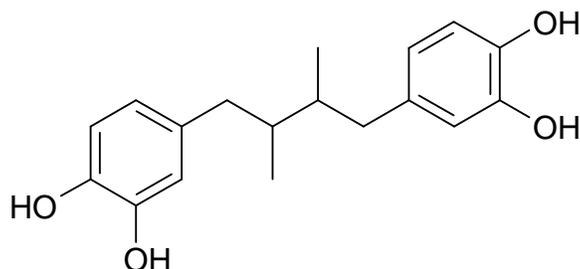


Fig. 4. Estructura del NDGA

1.5.4. Capacidad antioxidante del NDGA en modelos celulares

Se ha demostrado que el NDGA disminuye la toxicidad inducida por H₂O₂ en células de *Salmonella* TA104 y en células de hámster chino V79 (Nakayama, 1994). Se ha descrito una potente actividad antioxidante en las líneas celulares HepG2 y MDA-MB-468 con un CI₅₀ de 5.3 y 1.1 μM, respectivamente, determinado con la inhibición de la oxidación de DCFH por *tert*-butilhidroperóxido (Harper *et al.*, 1999).

En neuronas, se ha demostrado que a una concentración de 0.5 μM el NDGA produce una disminución en la formación de RL inducidos por la presencia de péptido beta-amiloide (5-50 μM) durante 6 días de exposición en neuronas de hipocampo de rata (Lockhart *et al.*, 1994). El NDGA a una concentración de 10 μM evita la disminución en la concentración de GSH inducida por yoduro de metilo en cultivos de neuronas cerebelares y cerebrales (Bonnefoi *et al.*, 1991). El NDGA a concentración de 1 y 10 μM causa un incremento significativo en la viabilidad de un cultivo de células de mesencéfalo expuestas a 5 y 10 μM de L-butionina sulfoximina (BSO); (Mytilineou *et al.*, 1999). El NDGA 0.5 μM preserva la viabilidad celular de cultivos de la parte media del cerebro expuestos a 20 μM de BSO (Canals *et al.*, 2003). Adicionalmente, también se ha encontrado que 2 μM de NDGA protege completamente contra la toxicidad de hierro (10-100 μM), ya que previene la muerte de neuronas de hipocampo (Goodman *et al.*, 1994) y posee un CI₅₀ de 0.1 μM contra la producción de

especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), inducidas por isquemia en cerebro de rata siendo más efectivo que el α -tocoferol (CI_{50} de 0.2 μ M) (Shishido *et al.*, 2001).

Además, se ha encontrado en ensayos *in vitro* que el NDGA es atrapador de los siguientes radicales:

Especie reactiva	CI_{50} (μ M)
$ONOO^-$	4.0 ± 0.9 ⁽¹⁾
1O_2	151 ± 19 ⁽¹⁾
HO^\bullet	0.15 ± 0.02 ⁽¹⁾
$O_2^{\bullet-}$	15 ± 1 ⁽¹⁾ ; 3.0 ⁽²⁾
HOCl	622 ± 42 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Floriano-Sánchez *et al.*, 2006, ⁽²⁾ Kanehira *et al.*, 2003

Tabla 3. Propiedades medicinales del NDGA

Enfermedad / Actividad	Efecto terapéutico de NDGA	Referencia
Cardiopatías	Modula la expresión de eNOS en cultivos de células endoteliales.	Ramasamy <i>et al.</i> , 1999
Hipertensión	Reduce la presión arterial inducida por fructosa en ratas.	Gowri <i>et al.</i> , 1999
Estrogénica	El NDGA es convertido por la microflora intestinal a compuestos que poseen actividad estrogénica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Fujimoto <i>et al.</i> , 2004
Anticancerígena	Inhíbe la multiplicación de un gran número de tipos de cáncer humano tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . Funciona como un agente quimioprotector en diferentes modelos de carcinogénesis	Birkenfeld <i>et al.</i> , 1987. Soriano <i>et al.</i> , 1999; Moody <i>et al.</i> , 1998.
Antiviral	El derivado sintético tetrametil-O-NDGA muestra actividad anti VIH, ya que inhíbe la replicación del virus de herpes simple en células Vero y del virus del papiloma humano	Chen <i>et al.</i> , 1998; Craigo <i>et al.</i> , 2000.
Antiinflamatorias	Inhíbe a la 5 y 12 LOX <i>in vitro</i>	Safayhi <i>et al.</i> , 1992
Antibacteriana	Inhíbe el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (en un 12.5%) y <i>Streptococcus pneumoniae</i> (en un 100%) en conejos con queratitis	Gritz <i>et al.</i> , 1992

II. JUSTIFICACIÓN

La toxicidad inducida por el IAA representa un modelo de inhibición metabólica *in vitro*, ya que inhibe a la enzima glucolítica GA3PDH impidiendo el flujo de su vía y ocasionando una privación de la utilización de glucosa y O₂. Con respecto a lo anterior, ya se ha reportado experimentalmente que un abatimiento del estado energético celular provoca la aparición de ERO (Cordis *et al.*, 1998; Tosaki *et al.*, 1993, Clapp *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1987; Gwag *et al.*, 1995); además, el IAA también podría estar participando en la inhibición de enzimas antioxidantes que contienen en su sitio activo grupos tiol (Uto *et al.*, 1995).

De acuerdo con la revisión realizada, ya se ha demostrado que la neurotoxicidad inducida por el IAA genera daño oxidativo, pero no hay evidencia experimental del efecto de la inhibición metabólica y la capacidad alquilante inducida por este tóxico sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en un modelo neuronal. Por otra parte, ya se ha demostrado que el IAA genera radical HO• (Matthews *et al.*, 1997) y el NDGA es un antioxidante eficaz para atrapar este radical (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

Por otra parte, se podría establecer si además de la capacidad antioxidante del NDGA se previene la inhibición de la GA3PDH.

La determinación de la actividad de algunas enzimas antioxidantes y la evaluación del efecto del NDGA sobre la neurotoxicidad *in vitro* del IAA en las NGC también ayudará a explicar o aportar evidencia sobre el mecanismo de generación de especies reactivas que induce el tóxico.

III. HIPÓTESIS

En los cultivos primarios de NGC se modifica la actividad de algunas enzimas antioxidantes en presencia de IAA y el NDGA, por sus propiedades antioxidantes intrínsecas, es capaz de atenuar la neurotoxicidad inducida por IAA.

IV. OBJETIVOS

- ✓ Evaluar el efecto del IAA sobre la actividad de algunas enzimas antioxidantes en cultivos de NGC.
- ✓ Determinar el efecto del NDGA sobre el daño inducido por IAA en cultivos de NGC.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. REACTIVOS Y MÉTODOS

V.1.1. REACTIVOS

La albúmina sérica bovina (ASB), la tripsina, la desoxirribonucleasa tipo I (DNAsa I), la citosina arabinósida, la glutamina, el 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), la glucosa, la gentamicina, el medio mínimo basal Eagle (MBE), el yodoacetato (IAA), el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bifenil tetrazolio (MTT), la azida de sodio (NaN_3), la glutatión reductasa (GR), la nicotinamida dinucleótido fosfato (NADPH), la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD^+), el ácido pirúvico, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P), el arsenato de potasio (KH_2ASO_4), el fluoruro de sodio (NaF), la fenolsulfonftaleína (rojo de fenol), el ácido málico, el isocitrato trisódico, el cloruro de manganeso (MnCl_2), la L-cisteína, el clorhidrato de (Tris[hidroximetil]aminometano) (TRIZMA[®]), el (t-octilfenoxipoli-etoxietanol) (Tritón X-100), las tabletas de amortiguador de fosfato, el glutatión reducido (GSH), el glutatión oxidado (GSSG), el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), el ácido nordihidroguayarático (NDGA), el dimetilsulfóxido (DMSO), el Ciocalteu's fenol (Folín) y la poli-L-lisina se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). El carbonato de sodio (Na_2CO_3), el hidróxido de sodio (NaOH), el sulfato de magnesio (MgSO_4), el cloruro de sodio (NaCl), el bicarbonato de sodio (NaHCO_3), el fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido etilendiamintetracético (EDTA), el citrato de sodio dihidratado y el fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) se adquirieron en JT Baker (México, D.F.). El inhibidor de tripsina, la penicilina-estreptomicina, el azul tripano y el suero fetal bovino (SFB) se adquirieron en Gibco (México, D.F.). El tartrato de sodio y de potasio ($\text{KNaC}_2\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), el cloruro de potasio (KCl) y el alcohol isopropílico se adquirieron en Mallinckrodt (México, D.F.). El cloruro de calcio (CaCl_2) se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

V.1.2. MÉTODOS

V.1.2.1. ***Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo.***

El procedimiento de extracción celular se realizó en una campana de flujo transversal marca Nuair[®] calentando previamente los medios utilizados durante la extracción de las células en un baño marca Riosga[®] a 37°C por 20 min. Los cultivos de NGC se obtuvieron de 7 ratas Wistar con 7 días de

edad postnatal (Van-Vliet *et al.*, 1989; Currie y Dutton, 1980; Kingsbury *et al.*, 1985). Los cerebelos se disectaron haciendo uso de un monocular Cole-Parment Instrument[®], se disociaron químicamente (37°C/10 min) con 0.248 mg/mL de tripsina y en forma mecánica, con una membrana, haciendo uso de una centrífuga marca Heraeus[®]. Las células se cultivaron en cajas de plástico de 24 pozos de Corning Incorporated[®] USA y en cajas de 60x15 mm de Nunc[™] (previamente cubiertas con poli-L-lisina filtrada 0.005 mg/mL por lo menos 12 h antes) utilizando 10 mL de MBE suplementado con SFB al 10%, penicilina-estreptomicina 1% y 0.029% de L-glutamina a una densidad celular de 2×10^5 células/cm² (1.2×10^6 células/pozo/mL de medio). Adicionalmente, para el cultivo se realizó una cuenta de células vivas realizando una suspensión con 10 µL de azul tripano y de 10 µL de suspensión celular haciendo uso de una cámara de Neubauer de Brand GMBH[®], Alemania y de un microscopio marca Nikon Eclipse TS100[®].

Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de O₂ y 5% de CO₂ haciendo uso de una incubadora marca Nuaire[®].

Se adicionó citosina arabinósida a una concentración final de 10 µM y glucosa a una concentración final de 1 mM a las 24 y 96 h después de iniciar el cultivo celular, respectivamente. Las células se usaron a los 9 DIV. Se realizó un estudio microscópico para observar el estado morfológico de las neuronas durante este tiempo.

V.1.2.2. **Experimento de neurotoxicidad**

Las células de 9 DIV cultivadas en cajas de 24 pozos (para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de IAA en la viabilidad celular) y en cajas de 60 x 15 mm (para evaluar el efecto del IAA en la actividad enzimática y el efecto del NDGA en las NGC) se incubaron por 30 min a 37°C en medio KRB (134 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM KCl, 20 mM HEPES, 3.9 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.2 mM glucosa, pH=7.4) y se adicionó IAA a concentraciones de 5-40 µM. Posteriormente, las células se incubaron nuevamente con el medio de cultivo inicial por 24 h. La densidad celular empleada fue de 1.2×10^6 células/ mL.

V.1.2.3. **Evaluación de la viabilidad celular**

Reducción del MTT

El porcentaje de células vivas se determinó por la transformación de MTT después de 2, 4, 6 y 24 h del tratamiento de las células con IAA. El MTT (color amarillo) en presencia de reductasas mitocondriales se reduce a formazán (color púrpura). Se adicionó MTT (1 mg/mL) a los cultivos de NGC en el medio de cultivo inicial por 1 h a 37°C. Después del periodo de incubación, se eliminó el

medio de cultivo y el formazán formado se removió con isopropanol ácido al 4% y se cuantificó espectrofotométricamente a la longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de células viables se calculó De la siguiente manera:

$$\% \text{Células viables} = (A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

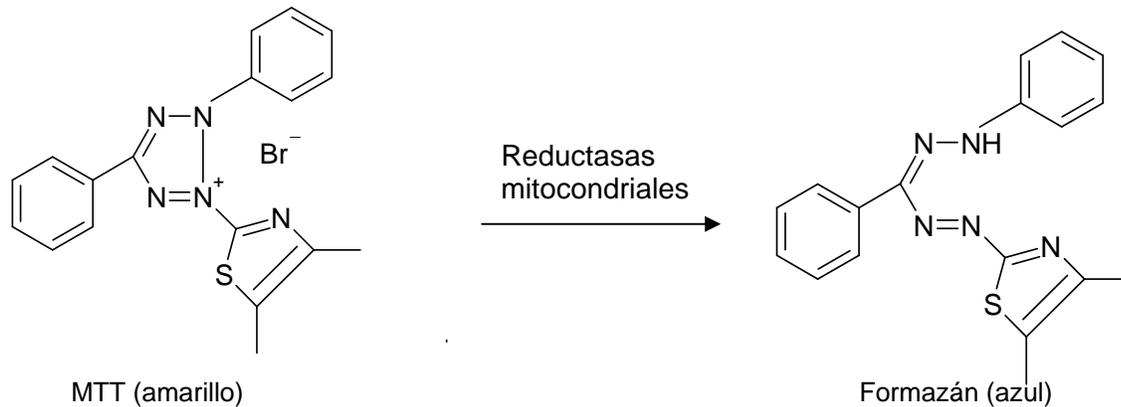


Fig. 5. Fundamento de la reducción de MTT

V.1.2.4. **Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes**

V.1.2.4.a. *Obtención del homogenado celular*

Las células de 9 DIV se lavaron con 500 μL de solución salina isotónica tres veces en forma consecutiva, se rasparon en presencia de 50 μL de amortiguador de lisis con inhibidor de proteasas a una dilución 1:50. El homogenado celular se sonicó por 3 s a una velocidad de 1 y se centrifugó a 1000 x g por espacio de 5 min utilizando el sobrenadante. La determinación de la actividad enzimática se realizó 2, 4 y 6 h después de retirar el IAA de las células.

V.1.2.4.b. *Catalasa (CAT)*

El método utilizado para evaluar la actividad de la catalasa se basa en la determinación espectrofotométrica de la desaparición del H_2O_2 de una solución con 30 mM de H_2O_2 en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 a 25°C y a una longitud de onda 240 nm (Aebi, 1984). La reacción comenzó con la adición de 30 μg de proteína del homogenado celular a 240 μL de H_2O_2 . Bajo estas condiciones, la descomposición de H_2O_2 por CAT contenida en la muestra sigue una cinética de primer orden durante 30 s dada por la ecuación $k=2.3/t \log A_0/A$ donde k es la constante de la

reacción de pseudoprimer orden, t es el tiempo en que disminuye la cantidad de H_2O_2 debido a la actividad de CAT y A_0/A es la densidad óptica a los tiempos 0 y 15 s, respectivamente. Los resultados se expresaron en $k/$ mg de proteína.

V.1.2.4.c. *Glutación peroxidasa (GPx)*

El método utilizado para evaluar la actividad de glutación peroxidasa se basó en la determinación espectrofotométrica de la formación de $NADP^+$ a 340 nm en un ensayo acoplado con glutación reductasa; cuando la GPx descompone el H_2O_2 se produce GSSG el cual es reducido por GR con la oxidación concomitante del NADPH (Lawrence y Burk, 1976). La mezcla de reacción utilizada consistió de un amortiguador de fosfatos 50 mM pH=7.0, EDTA 1 mM, NaN_3 1 mM, NADPH 0.2 mM, GR 1 U/mL y GSH 1 mM. Se adicionaron 30 μ g de proteína del homogenado celular a 160 μ L de la mezcla de reacción seguido de una incubación de 5 min a temperatura ambiente antes de iniciar la reacción. La reacción se inició con la adición de 6 μ L de H_2O_2 2.5 mM. La absorbancia registrada se obtuvo a 340 nm cada minuto durante 3 min. La actividad se calculó tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar (E) del NADPH es $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En el blanco de reacción, la muestra se reemplazó con 50 μ L de amortiguador de fosfatos. Los resultados se expresaron como U /mg de proteína, donde una unidad de proteína se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto.

V.1.2.4.d. *Glutación reductasa (GR)*

El método utilizado para evaluar la actividad enzimática de GR se basó en la determinación espectrofotométrica de la desaparición de NADPH (Carlberg y Mannervik, 1975). La mezcla de reacción contiene EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM, NADPH 0.1 mM en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH=7.6 a 25°C y la fuente de la enzima. Se adicionaron 15 μ g de proteína del homogenado celular a 190 μ L de la mezcla de reacción. La absorbancia registrada se obtuvo a 340 nm cada min durante 3 min. La actividad se calculó como μ moles de NADPH oxidado por minuto tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar (E) del NADPH es $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como U /mg de proteína.

V.1.2.4.e. *Glutación-S-transferasa (GST)*

El método utilizado para evaluar la actividad de GST se basó en la determinación espectrofotométrica de la aparición de un aducto conjugado con GSH y CDNB catalizado por GST

(Habig *et al.*, 1974). La mezcla de reacción contiene GSH 0.05 M, CDNB 0.02 M en 182 μL de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 6.5 con la fuente de la enzima. Se adicionaron 20 μg de proteína del homogenado celular a la mezcla de reacción anterior. La actividad se calculó como μmoles del aducto conjugado por min durante 3 min tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar (E) del aducto es $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

V.1.2.4.f. *Determinación de proteínas totales por el método de Lowry.*

El método de Lowry se basó en la reacción del nitrógeno contenido en el enlace peptídico de los aminoácidos, con los iones Cu^{2+} en condiciones alcalinas y, posteriormente, en la reducción del reactivo de Folín (fosfomolibdato y fosfotungsteno) a heteropolimolibdeno por la oxidación catalizada por el cobre unido al átomo de nitrógeno de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano. Bajo estas condiciones, el Folín reducido es de color azul y detectable espectrofotométricamente en un rango de 500 a 750 nm (Lowry *et al.*, 1951). Se preparó una curva estándar de ASB al 0.05%. Se prepararon 200 μL de muestra diluida 1:50 adicionando para cada muestra una solución de sulfato de cobre en condiciones alcalinas incubando por espacio de 10 min para, posteriormente, adicionar 1 mL del reactivo de Folin incubando por 30 min. Pasado el tiempo de incubación, el reactivo de Folin reducido en cada muestra se detectó a 660 nm frente a la curva estándar.

V.1.2.5. ***Determinación de la presencia de estrés oxidativo y de la inhibición metabólica inducida por yodoacetato.***

V.1.2.5.a. *Determinación de la actividad enzimática de aconitasa y fumarasa.*

El método utilizado para evaluar la actividad de aconitasa se basó en la determinación espectrofotométrica de la formación de cis-aconitato a partir de isocitrato a 240 nm (Hausladen y Fridovich, 1996). La mezcla de reacción contiene 20 mM de isocitrato y 0.5 mM de MnCl_2 en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4. El homogenado celular se obtuvo con un amortiguador de homogenización con citrato de sodio 1 mM, cisteína 1 mM, Tritón X-100 1%, inhibidor de proteasas dilución 1:50 y MnCl_2 0.5 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. Se adicionaron 30 μg de proteína del homogenado celular a 200 μL de la mezcla de reacción anterior. El blanco en todos los casos fue la mezcla de reacción. La actividad se calculó como μmoles del producto formado por minuto tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar (E) del producto es $3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ siguiendo un

incremento en la densidad óptica cada min durante 2 min a 240 nm. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

El método utilizado para evaluar la actividad de fumarasa se basó en la determinación espectrofotométrica de la formación de fumarato a partir de malato a 240 nm (Racker, 1950). La actividad de esta enzima se determinó en el mismo homogenizado utilizado para determinar la actividad de aconitasa en una mezcla de reacción con ácido málico 55 mM en amortiguador de fosfatos 30 mM, pH 7.4. Se adicionaron 30 µg de proteína del homogenado celular a 200 µL de la mezcla de reacción anterior. El blanco en todos los casos fue la mezcla de reacción. La actividad se calculó como µmoles del producto formado por min tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar (E) del producto es $1.639 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ siguiendo un incremento en la densidad óptica cada 15 s durante 45 s a 240 nm. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

V.1.2.5.b. *Determinación de la actividad enzimática de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH).*

La determinación de la actividad de GA3PDH se basó en la determinación espectrofotométrica de la formación de NADH a partir de la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a 3-fosfoglicerato, reacción catalizada por GA3PDH (Ikemoto *et al.*, 2003) en presencia de arsenato. Durante esta reacción se genera el intermediario 1 arseno-3 fosfoglicerato que es muy inestable. La mezcla de reacción contiene 1.7 mM de arsenato de potasio, 20 mM de NaF, 1 mM de NAD^+ y 5 mM de KH_2PO_4 en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 8.5. Se adicionaron 30 µg de proteína del homogenado celular a 300 µL de la mezcla de reacción anterior. El blanco en todos los casos fue la mezcla de reacción, la reacción se inició con la adición de G3P 1 mM y el homogenado celular. La actividad se calculó como µmoles del producto formado por min tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar (E) del producto es $2.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ siguiendo un incremento en la densidad óptica cada 10 s durante 30 s a 340 nm. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

V.1.2.6. ***Evaluación del efecto alquilante del IAA en la actividad de GR y GST.***

Se obtuvo el homogenado celular de cultivos con 9 DIV. La determinación de la actividad enzimática se realizó como previamente se describió para ambas enzimas, incubando IAA 10, 20 o 30 µM en la mezcla de reacción por espacio de 5 min antes del inicio de la cinética.

V.1.2.7. ***Evaluación del efecto del NDGA en la neurotoxicidad inducida por IAA.***

El experimento se llevó a cabo en células de 9 DIV. Primeramente, se realizó una preincubación con NDGA 20 μ M por espacio de 30 min. Posteriormente, se llevó a cabo el protocolo indicado en el experimento de neurotoxicidad en presencia de IAA a concentraciones de 10, 18.4, 25 y 30 μ M coincubando con NDGA 20 μ M. Una vez eliminado el tóxico, se adicionó nuevamente en el medio de cultivo NDGA a la misma concentración. Posteriormente se determinó la viabilidad celular.

V.1.2.8. **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía o de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni o una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, según el caso. Se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism versión 3.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, EUA. Todos los resultados se presentan como la media \pm error estándar. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

VI. RESULTADOS

VI. 1. *Efecto de la toxicidad inducida por IAA en la viabilidad de los cultivos de NGC.*

Para evaluar el efecto tóxico del IAA en los cultivos de NGC, se realizó una curva con diferentes concentraciones del tóxico para monitorear su efecto sobre la viabilidad celular. Como se observa en la Figura 6, el IAA ocasiona una disminución en la transformación de MTT en forma dependiente con la concentración, lo que es indicativo de la disminución de la viabilidad celular donde a partir de 20 μM de IAA la muerte celular es estadísticamente significativa. Se calculó con 4-7 experimentos independientes una CI_{50} de 18.4 μM . Con 30 μM de IAA se obtiene la muerte de aproximadamente el 70% de la población celular 24 h después de retirar el tóxico. Para asegurar la presencia de un efecto del IAA sobre las células, se utilizó esta concentración de tóxico para medir la actividad de las enzimas antioxidantes.

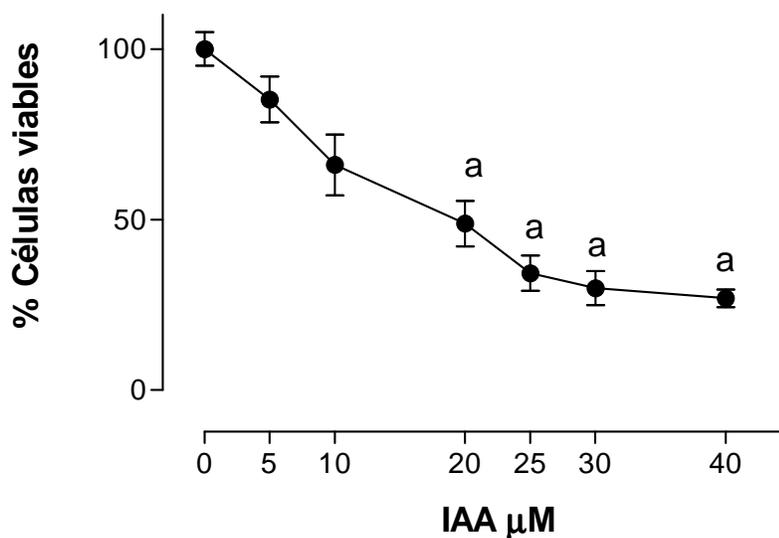


Fig. 6. Curva concentración-respuesta de la neurotoxicidad inducida por IAA en cultivos de NGC 24 h después de retirar el tóxico. La viabilidad celular se determinó por la transformación de MTT. Los datos representan el promedio \pm EEM de la viabilidad celular obtenida para cada concentración de IAA. ^a $P < 0.001$ vs. control (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett). $n=7$ (0-25 μM), 4 (30 μM) y 5 (40 μM).

VI. 2. Efecto de la toxicidad inducida por IAA en la actividad de enzimas antioxidantes de los cultivos de NGC.

En el presente trabajo, las actividades enzimáticas de CAT, GPx, GR y GST se midieron a las 2, 4 y 6 h después de retirar el IAA 30 μM de los cultivos en 5-6 experimentos independientes (Figura 7). La actividad de CAT incrementó un 15% y en un 72.6% en forma significativa a las 2 h y a las 4 h posteriores a la exposición al tóxico, respectivamente. Es posible observar que dicho incremento se sostuvo, aunque no en forma significativa, a las 6 h representando un 44.7% de aumento en la actividad en comparación con la actividad obtenida para el control. La actividad de GPx aumentó un 117% en forma significativa hasta las 6 h; sin embargo, fue posible observar un incremento en la actividad de aproximadamente 27% desde las 2 h. La actividad de GR no cambió en forma significativa a lo largo de las 6 h. La actividad de GST incrementó en forma significativa hasta las 6 h y en un 16, 39 y 71% a las 2, 4 y a las 6 h, respectivamente. Es posible observar que la actividad de todas las enzimas antioxidantes, a excepción de GR, presentaron un incremento significativo a partir de las 4 h y que el incremento en GPx y GST ocurrió en el mismo tiempo. Cabe mencionar que la viabilidad celular en los tiempos del análisis disminuyó aproximadamente un 20%, a lo largo de las 6 h después de retirar el tóxico de acuerdo con el método de la reducción del MTT (Figura 8).

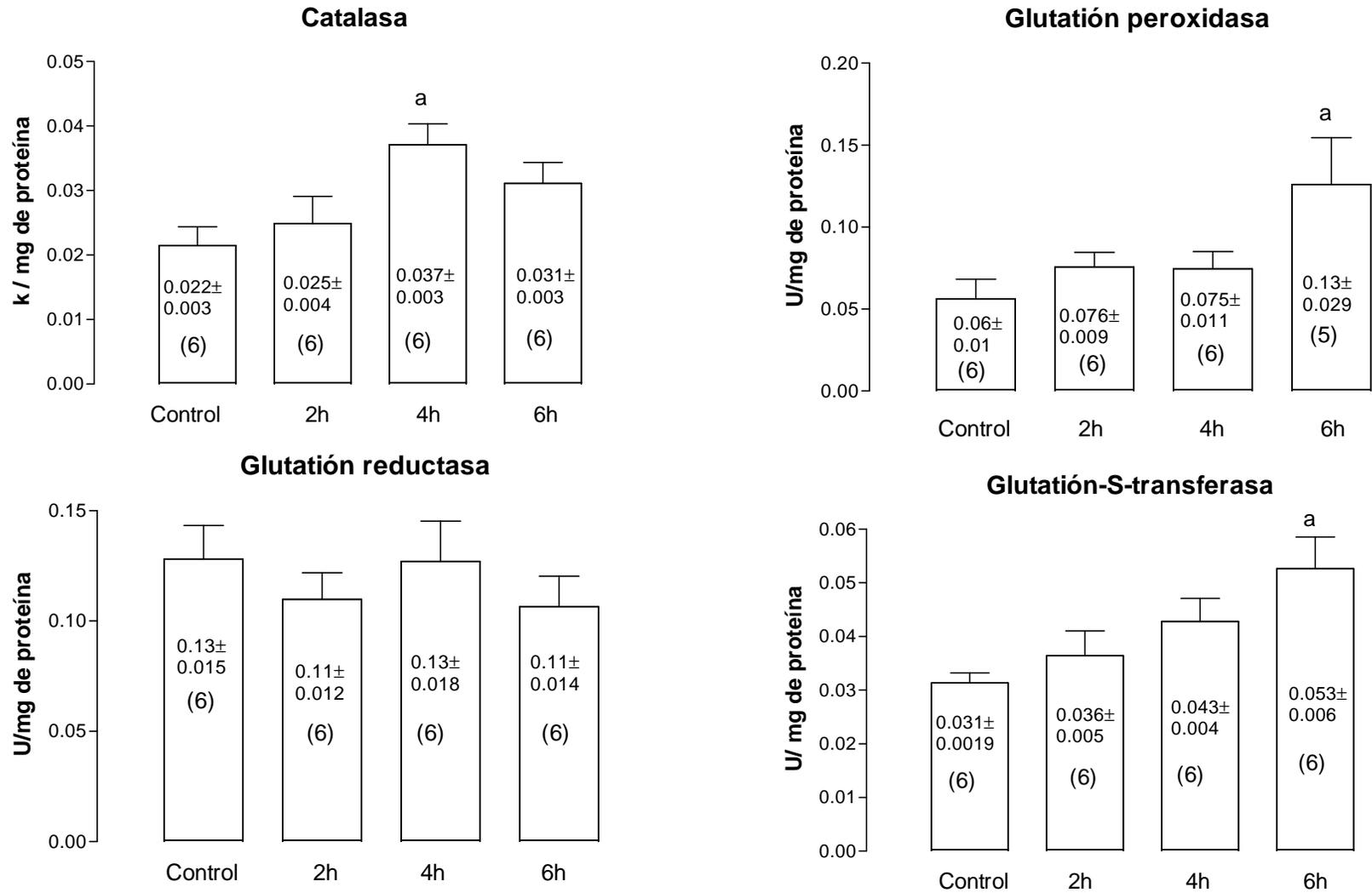


Fig. 7. Curso temporal de la actividad enzimática en cultivos de NGC posterior a la inhibición metabólica inducida por IAA 30 μ M durante 30 min. Los datos están presentados como promedio \pm EEM. El número de experimentos independientes se muestra dentro de cada barra. ^aP<0.05 vs. control (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni).

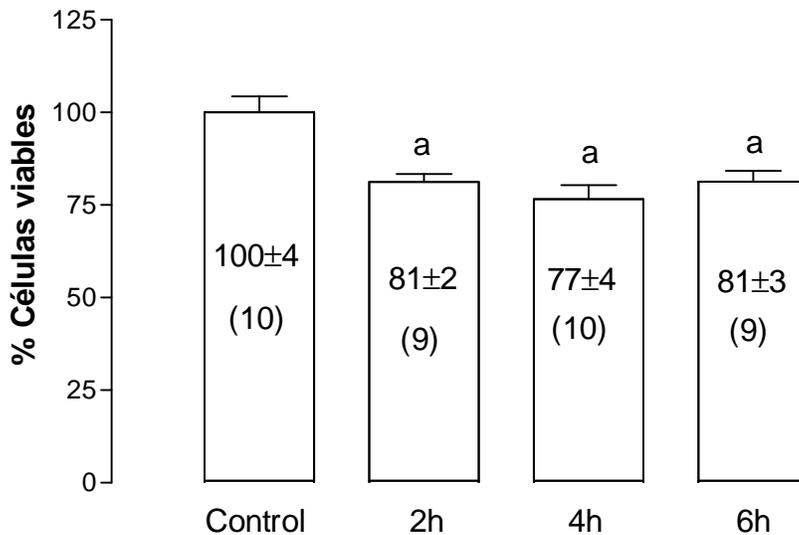


Fig. 8. Evaluación de la viabilidad celular en cultivos de NGC durante las 2, 4 y 6 h posteriores a la incubación con IAA 30 μ M durante 30 min por el método de la reducción de MTT. El número de experimentos independientes se muestra dentro de cada barra. ^aP<0.001 vs. control (ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett).

VI. 3. *Evaluación del efecto alquilante del IAA en GR y GST.*

El IAA además de bloquear la actividad de GA3PDH y ser un inhibidor de la glucólisis, también puede inhibir la actividad de otras enzimas por ser un agente alquilante al reaccionar con grupos tiol o hidroxilo. En la presente investigación se evaluó la capacidad alquilante de este neurotóxico sobre la enzima GR debido a la presencia de dos cisteínas (posición 58 y 63) en su sitio activo (Tabatabaie y Floyd, 1994); y sobre la enzima GST isoforma A4 (presente en cerebelo de rata) que presenta un residuo de tirosina (posición 212) en su sitio activo, cuyo grupo fenólico interacciona electrostáticamente con S-(2-yodobencil) glutatión (Bruns *et al.*, 1999). No se observó un cambio significativo en la actividad antioxidante al adicionar 10, 20 y 30 μ M de IAA en el medio de reacción, por lo que a estas concentraciones, el IAA no ejerce una actividad inhibidora directa sobre la actividad enzimática (Figura 9).

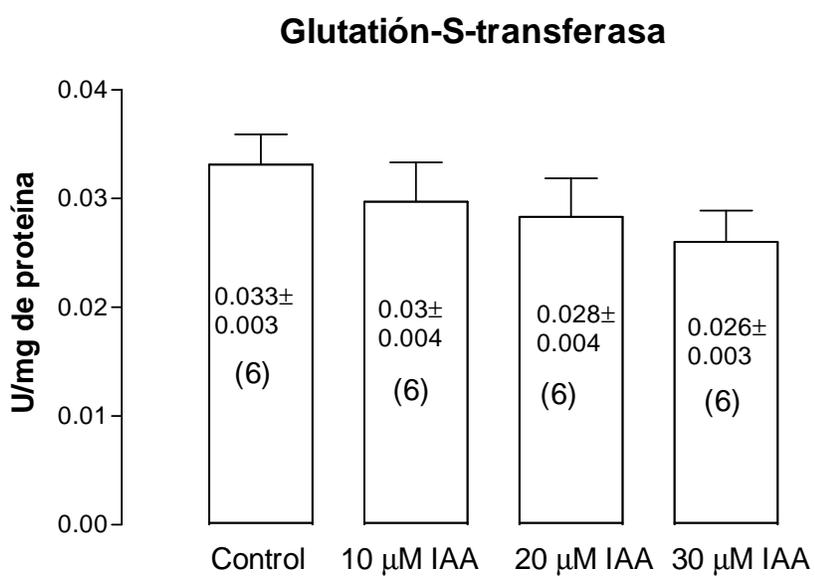
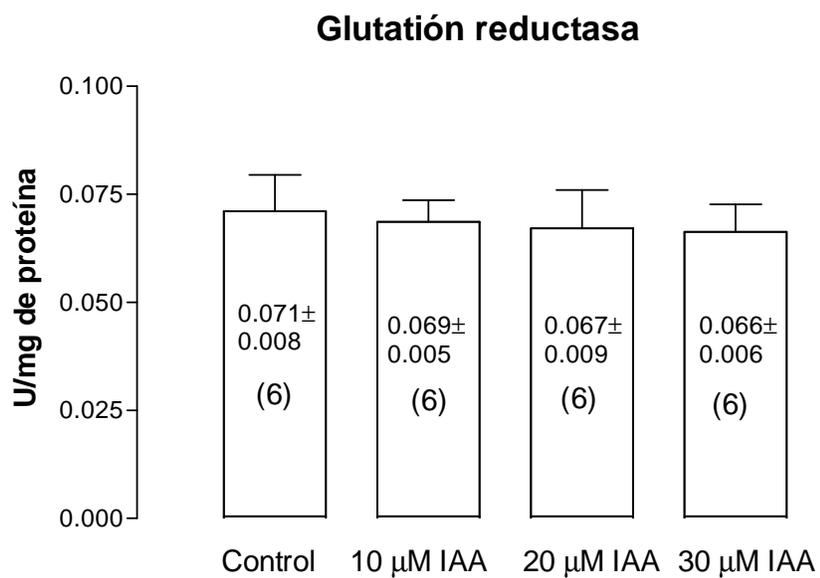


Fig. 9. Evaluación del efecto alquilante de IAA 10, 20 y 30 μM en GR y GST. Los datos mostrados son promedio \pm EEM. El número de experimentos independientes se muestra dentro de cada barra. P=n.s. (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni)

VI. 4. *Efecto del NDGA sobre la toxicidad inducida por el IAA en los cultivos de NGC.*

El NDGA se caracteriza, entre otros efectos benéficos, por ser un agente antioxidante; por esta razón y tomando en cuenta que en la literatura ya se ha reportado que el IAA induce la generación de especies reactivas se decidió evaluar el efecto de la presencia de NDGA en la viabilidad celular de los cultivos de NGC expuestos a diferentes concentraciones de IAA. Primero, se evaluó el efecto de varias concentraciones de este compuesto (10, 30, 45, 75 y 100 μM) en la viabilidad celular de las NGC. Se observó que a partir de una concentración de 45 μM disminuyó la viabilidad celular y, por lo tanto, a partir de esta concentración, el NDGA resulta tóxico (datos no mostrados). Por otro lado, con base al resultado anterior, se evaluó el efecto del NDGA a concentraciones menores (5-30 μM) y se encontró que a concentraciones de 5-25 μM son biocompatibles, es decir, no se afectó la viabilidad celular (Figura 10). De acuerdo con lo anterior, se decidió utilizar una de las máximas concentraciones donde el NDGA es aún biocompatible (20 μM) para asegurar la ausencia de efecto tóxico y un posible efecto protector del NDGA sobre la toxicidad inducida con la concentración de IAA correspondiente a la CI_{50} , una concentración menor y dos concentraciones mayores a este valor.

Para todas las concentraciones de IAA utilizadas, se observó que el NDGA preservó la viabilidad celular; sin embargo, el NDGA protege en forma significativa contra 18.4, 25 y 30 μM de IAA, la primera concentración correspondiente a la CI_{50} del IAA, aumentando la viabilidad en un 47.2, 38.4 y 20.2% respectivamente, con respecto a los controles con las mismas concentraciones de tóxico en ausencia del NDGA (Figura 11).

Por otra parte, debido al efecto protector del NDGA que se observó preincubando a las células con el mismo, se decidió observar si el NDGA presentaba algún efecto sobre el abatimiento energético inducido por el IAA, ya que si bien el NDGA es un antioxidante al ser un compuesto reductor, su efecto protector bien podía ser explicado por la alquilación de sus grupos hidroxilo por el IAA impidiendo que una proporción de este último ingresara en las células, para ello, se decidió evaluar el efecto del NDGA sobre la actividad de la GA3PDH en presencia de 18.4 y 25 μM del tóxico, concentraciones en las cuales el NDGA previno la muerte celular. En la Figura 12 es posible observar que, aunque exista la posibilidad de interacción entre ambas moléculas, el NDGA no logra prevenir la inhibición metabólica inducida por ambas concentraciones de IAA. Lo anterior indica que posiblemente el NDGA protege a las células por inducir algún(os) factor(es) protector(es) antes del reto neurotóxico o por provocar con su preincubación una mejor difusión del mismo al interior celular y con ello mejorar el sistema antioxidante neuronal o ejercer un efector protector vía inhibición de la LOX.

Ahora bien, dado el efecto protector del NDGA no puede atribuirse a la reducción del abatimiento energético inducido por el IAA se decidió observar si el NDGA ejercía un efecto antioxidante en las NGC, para ello, se decidió utilizar como marcador de estrés oxidativo la comparación de la actividad de aconitasa con la actividad de fumarasa a las 8 y 24 h, a 18.4 y 25 μM de IAA donde el NDGA mostró proteger en forma significativa. Cabe mencionar que recientemente la aconitasa, una enzima del ciclo de Krebs que posee un centro [4Fe-4S], ha sido considerada como un marcador válido de la aparición de ERO intracelulares (Tabuchi *et al.*, 2003; Gardner y Fridovich, 1992). La aparición de estas especies afecta en forma selectiva la actividad de aconitasa pero no la de fumarasa, ya que esta última no posee un centro Fe-S, esas diferentes respuestas han sido utilizadas como un buen indicador para la generación de estrés oxidativo en mitocondria (Gardner *et al.*, 1994; Tabuchi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 1996; Liang y Patel, 2000). En la Figura 13 se pueden observar las actividades de aconitasa y fumarasa que sugiere que la presencia del NDGA abate el estrés oxidativo generado ante el estímulo tóxico. En la Figura 14 se observa que el NDGA parece prevenir la aparición de estrés oxidativo inducido por IAA 18.4 y 25 μM a las 8 h, mientras que, a las 24 h protege parcialmente contra 18.4 y 25 μM de IAA.

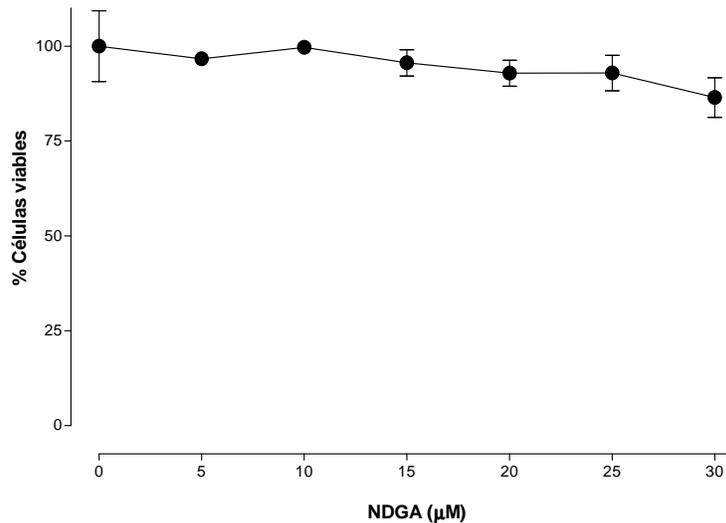


Fig. 10. Efecto del NDGA sobre la viabilidad celular en cultivos de NGC 24 h después de la incubación con 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μM del NDGA. Los datos están presentados como promedio \pm EEM. P=n.s. (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett). n=6 (0-25 μM de NDGA), n=4 (30 μM de NDGA).

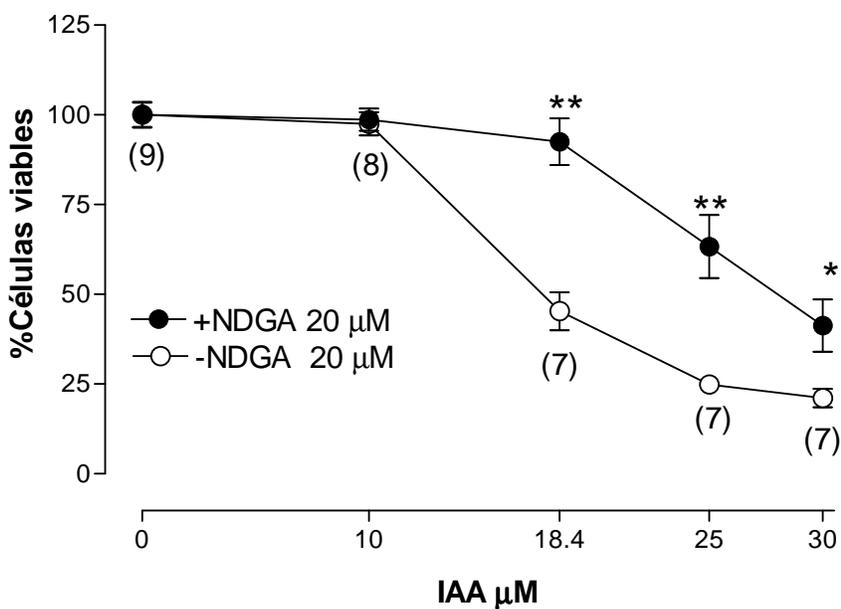


Fig. 11. Efecto del NDGA sobre la viabilidad celular en cultivos de NGC 24 h después de la incubación con 10, 18.4, 25 y 30 μM de IAA durante 30 min. Los datos están presentados como promedio \pm EEM. ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. IAA sin NDGA 20 μM (ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni). $n=8$ (0 y 10 μM de IAA), $n=7$ (18.4 y 25 μM de IAA) y $n=7$ (30 μM de IAA).

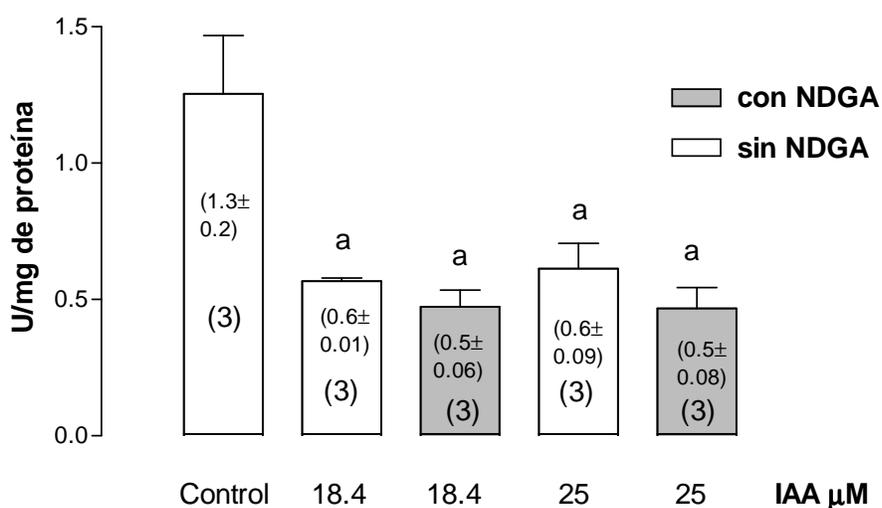


Fig. 12. Efecto del NDGA sobre la actividad de GA3PDH 24 h después de la incubación con 10, 18.4, 25 y 30 μM de IAA durante 30 min en presencia o ausencia de NDGA 20 μM . Los datos están presentados como promedio \pm EEM. El número de experimentos independientes se muestra dentro de cada barra. ^a $P < 0.001$ vs. control (ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett).

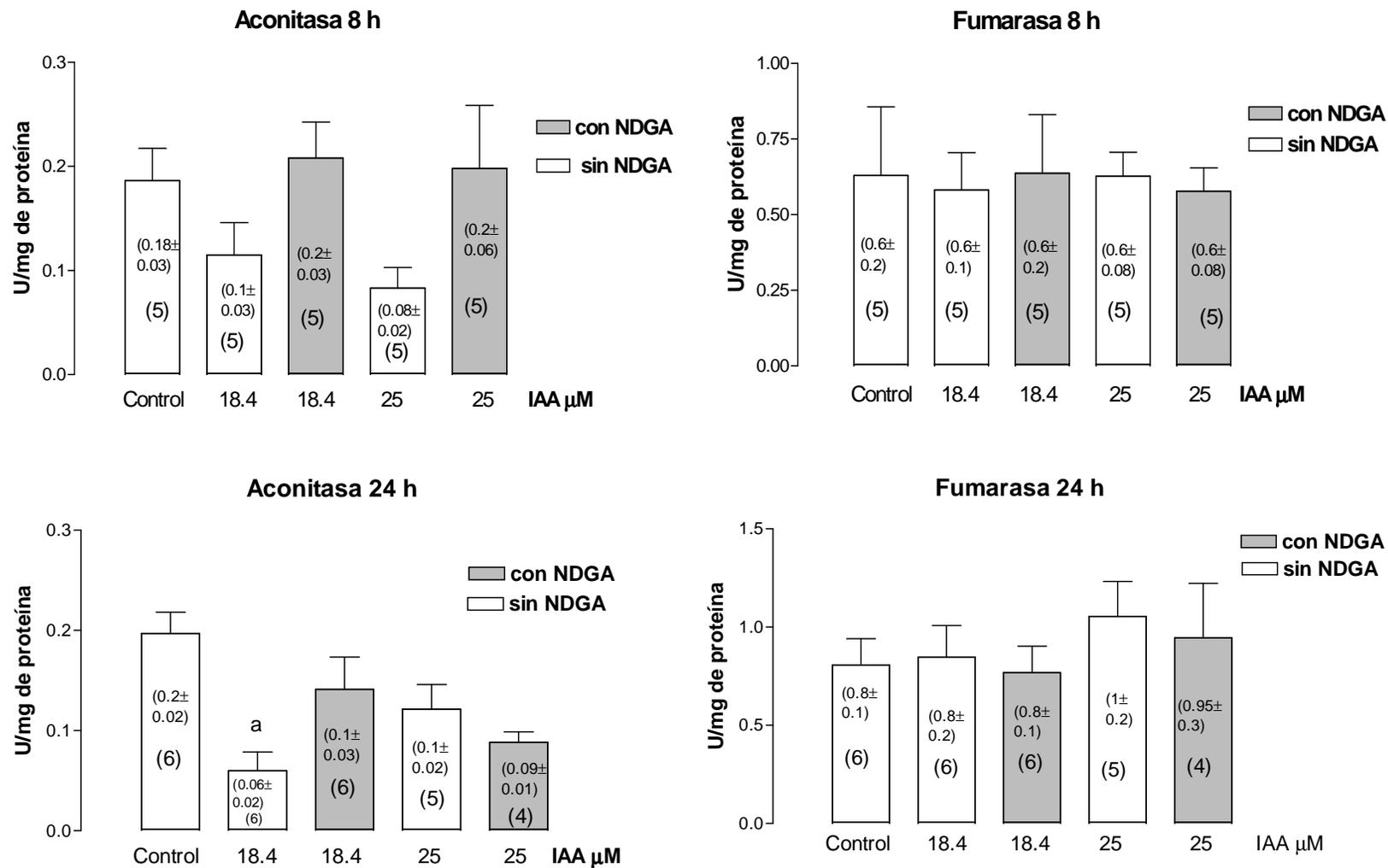


Fig. 13. Evaluación de la actividad enzimática de aconitasa y fumarasa en cultivos de NGC a las 8 y 24 h posteriores a la inhibición metabólica inducida por IAA 18.4 y 25 μM durante 30 min en presencia o ausencia de NDGA 20 μM. Los datos mostrados son promedio ± EEM. El número de experimentos independientes se muestra dentro de cada barra. ^aP<0.05 vs. control (ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni).

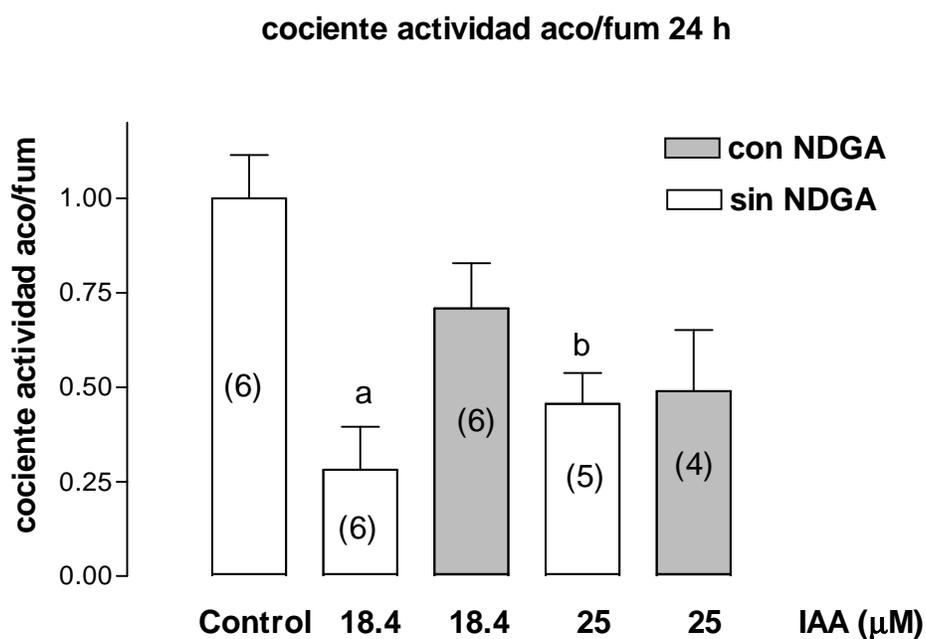
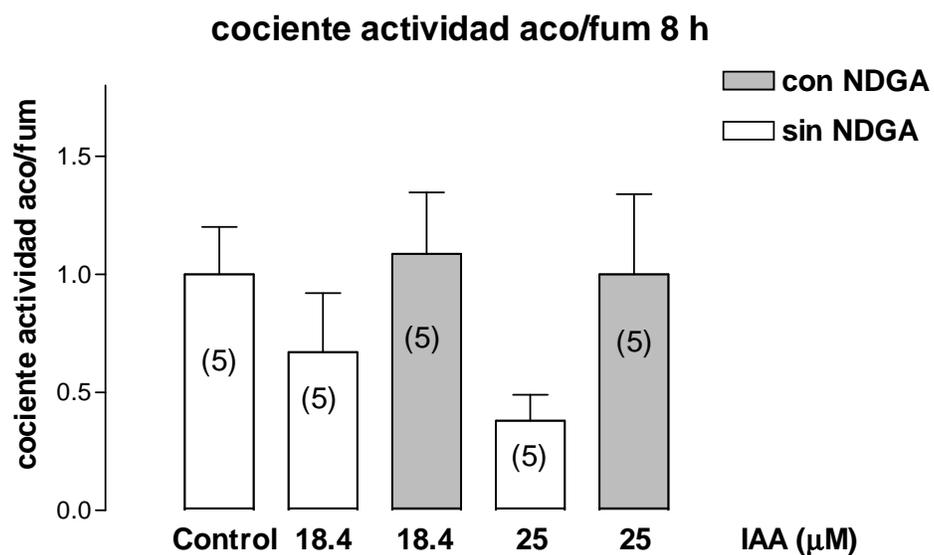


Fig. 14. Evaluación de la actividad de aconitasa en función de la actividad de fumarasa en cultivos de NGC a las 8 h y 24 h posteriores a la inhibición metabólica inducida por IAA 18.4 y 25 μM durante 30 min en presencia o ausencia de NDGA 20 μM . Los datos están presentados como promedio \pm EEM. El número de experimentos independientes se muestra dentro de cada barra. ^aP<0.01 vs. control, ^bP<0.05 vs. control (ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.).

VII. RESUMEN DE RESULTADOS

El IAA causa un decremento en la viabilidad celular en forma dependiente de la concentración con una CI_{50} de 18.4 μ M después de 30 min de incubación con el tóxico. El IAA a una concentración de 30 μ M ocasionó un incremento en las actividades de la CAT a las 4h, de la actividad de GPx a las 6 h y de la actividad de GST a las 6 h mientras que la actividad de GR no sufrió cambio alguno, aunque si se observó una disminución significativa de la viabilidad celular a estos tiempos. El IAA no ejerció un efecto alquilante directo en GR y GST, ya que no se modificó su actividad. El NDGA no modificó en forma significativa la viabilidad celular a concentración de 5-30 μ M y utilizando una concentración de 20 μ M previno significativamente la muerte celular inducida por 18.4, 25 y 30 μ M de IAA. El NDGA no es capaz de prevenir la disminución en la actividad de GA3PDH en presencia de 18.4 y 25 μ M de IAA; sin embargo, a esas concentraciones de IAA, parece prevenir la aparición de estrés oxidativo a las 8 y 24 h posteriores a la incubación de las células con el tóxico.

VIII. DISCUSIÓN

De acuerdo a la respuesta obtenida en la curva concentración-viabilidad celular al adicionar IAA a cultivos primarios de NGC de 9 DIV, se puede observar que el IAA causa un decremento en la viabilidad celular (cuantificado como índice de reducción del MTT, ver Figura 6) en forma de decaimiento exponencial y dependiente de la concentración. Se obtuvo con 4-7 ensayos independientes una CI_{50} de 18.4 μ M, observándose además que con una concentración de 40 μ M se obtiene la muerte de 73% de las células, lo que indica que para estos cultivos y de acuerdo con las condiciones de trabajo, se necesitan más de 40 μ M de IAA para ocasionar la muerte del total de la población celular. Existe evidencia experimental de que el IAA genera estrés oxidativo en cultivos neuronales, el cual es disminuido por diversos antioxidantes como BHT, U-83836E, trólox, α -tocoferol, LY231617, SOD, melatonina, U74006F y U78517F. Además, durante la privación de O_2 y glucosa en la línea celular humana de neuronas NT2-N se observó un incremento en las ERO el cual es inhibido por los antioxidantes trólox, quercetina y por MK-801 (Almaas et al., 2001). Lo anterior parece indicar que la aparición de especies reactivas está comprometida durante la inhibición metabólica que produce el tóxico. Además, el IAA exagera el daño inducido por el péptido beta-amiloide (Arias et al., 2002; Montiel et al., 2006) y por la liberación de aminoácidos excitadores, lo cual es revertido por la presencia de vitamina E, lo que sugiere la participación del estrés oxidativo (Mejía-Toiber et al., 2006; Montiel et al., 2006).

Con respecto a la explicación del origen de estos radicales, Lafón-Cazal *et al.* (1993a,b) observaron la formación de $O_2^{\bullet-}$ en cultivos primarios de NGC en los cuales se estimuló el receptor

de glutamato con glicina y NMDA, Culcasi *et al.*, (1994) observaron el mismo resultado, aunque en este caso se indujo un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ por la activación de la NOS cuando los cultivos tenían deficiencia de L-arginina. Dugan *et al.*, 1997 también observaron que al exponer cultivos de células neocorticales fetales de ratón a 300 μ M de NMDA por espacio de 2 horas genera radical HO^{\bullet} .

Ya se ha observado que la inhibición de la glucólisis ocasiona muerte celular por alterar el almacenamiento del calcio intracelular, entre otros mecanismos tales como la excitotoxicidad (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1990). El déficit energético e hipoxia en la célula provocado en condiciones de inhibición metabólica, trae como consecuencia la despolarización de la membrana, y ocasiona la acumulación de calcio intraneuronal al interferir con la función de la ATPasa de Ca^{2+} e intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico, además de provocar la activación de los receptores de NMDA (Goldberg *et al.*, 1987; Leppanen y Stys, 1997; Hernández y Massieu, 2005; Mejía-Toiber *et al.*, 2006; Almaas *et al.*, 2001; Camacho *et al.*, 2006; Massieu *et al.*, 2000). También se produce la liberación excesiva de glutamato de las terminales presinápticas y fallas en la recaptación en los astrocitos (excitotoxicidad); (Bakken *et al.*, 1998). Los receptores de NMDA parecen ser los principales responsables del incremento de calcio intraneuronal, lo cual induce la producción de RL como $O_2^{\bullet-}$ y HO^{\bullet} . Un incremento de Ca^{2+} intraneuronal por los mecanismos anteriores resulta en la traslocación de PLA_2 al interior de la membrana plasmática trayendo como consecuencia la liberación de ácido araquidónico (AA) entre otros ácidos grasos (Williams *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1995; Saluja *et al.*, 1997). El AA es precursor de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, con la producción concomitante de $O_2^{\bullet-}$ (Kramer y Sharp, 1997; Sapirstein y Bonventre, 2000; Bonventre, 1997). Por otro lado, se ha observado que una acumulación de Ca^{2+} citosólico a través de los receptores de glutamato trae como resultado un incremento de calcio en la mitocondria que provoca la inhibición de la fosforilación oxidativa y del potencial de membrana (White y Reynolds, 1997; Peng *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000) que resulta en un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y caspasas, acidificación y la producción de ERO (Earnshaw *et al.*, 1999; Siesjo *et al.*, 1996).

La acumulación de calcio intraneuronal vía receptores de glutamato, también produce la activación de la nNOS y eNOS, XO, calpaínas y endonucleasas, además se favorece la reacción de Fenton (Matsuyama *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 1995).

Ya se ha demostrado que el uso de algunos sustratos tal como la fructosa 1,6-bifosfato, piruvato, lactato, aspartato y acetoacetato en cultivos neuronales con abatimiento energético inducido por IAA, protege contra la inhibición metabólica (Izumi *et al.*, 2003; Izumi *et al.*, 1994; Leppanen y Stys, 1997; Bakken *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1996; Donohoe *et al.*, 2001; Massieu *et al.*, 2003; Mejía-Toiber *et al.*, 2006; Izumi *et al.*, 1997); el IAA a altas concentraciones también posee el efecto

de inhibir a las enzimas antioxidantes aisladas GPx, Trx y GST además de interferir con la síntesis de GSH y como se mencionó anteriormente, el uso de algunos antioxidantes previene la disminución en la viabilidad celular durante la neurotoxicidad inducida por IAA. Lo anterior conduce a pensar que el IAA al ser un inhibidor metabólico responsable de la producción hipoglucemia en las células y con ello de la producción de especies reactivas trae como consecuencia la aparición del estrés oxidativo.

Con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes se pudo observar que a partir de las 4 h después de la exposición de las NGC a IAA 30 μ M aumentó la actividad de CAT, GPx y GST con respecto al control después de retirar el tóxico. La presencia de CAT, GPx y GR ya ha sido reportada en astrocitos y neuronas granulares (Huang y Philbert, 1995). Existen además estudios *in vitro* e *in vivo* expuestos a una inhibición metabólica (isquemia/reperfusión, hipoxia/reoxigenación o deprivación de glucosa y de O₂), lo cual podría mimetizarse en cierta medida con el efecto del IAA. La mayoría de los estudios reportados coinciden que la actividad de CAT incrementa durante alguna fase de la inhibición metabólica. Bas *et al.* (2007) observaron un incremento en la actividad de CAT en el hipocampo de ratas en la etapa de reperfusión; Danielisová *et al.* (2005) demostraron que la actividad de CAT incrementa significativamente en corteza, hipocampo y estriado de cerebro de rata durante la etapa de reperfusión. Todo lo anterior, parece indicar que durante un evento de inhibición metabólica, particularmente en el periodo de reoxigenación, se producen peróxidos, razón por la cual, CAT incrementa su actividad para detoxificarlos lo que parece proteger a la membrana celular de la lipoperoxidación. Estos eventos pueden explicar porqué la actividad de CAT se incrementó después de la adición del tóxico. En los resultados obtenidos, la actividad de CAT incrementó 2 h antes que la de GPx. Comparada con GPx, se ha visto que CAT es más reactiva para atrapar el H₂O₂ formado en respuesta a la hipoxia en las células neuronales, especialmente después de una privación de oxígeno (Café *et al.*, 1995) lo que parece indicar una producción de H₂O₂ en las NGC en este periodo. Sin embargo, la actividad de GPx aumentó aproximadamente 2 veces, en comparación con CAT a las 6 h; aunque en la literatura se ha descrito que CAT y GPx son responsables de la remoción de peróxidos en las células (Dringen *et al.*, 2005) el resultado obtenido en el presente estudio parece indicar que un mayor incremento en la actividad de GPx podría significar que se produce una mayor cantidad de hidroperóxidos después de 4 h de retirar el IAA en las NGC ya que esta enzima es la principal responsable de la detoxificación de peróxidos orgánicos, además de H₂O₂, en condiciones fisiológicas (Aebi, 1984). Además, podemos observar en los resultados que la actividad de GPx también incrementó en el periodo posterior a la adición del tóxico lo que coincide con lo encontrado también por Lievre *et al.* (2001) quienes observaron que la actividad de GPx incrementó después del periodo hipóxico.

Tamura *et al.* (1998) observaron que la actividad de CAT y GPx no cambia en una línea celular derivada de hipocampo de rata (HV16-4) expuesta a RL generados por el sistema hipoxantina/XO a lo largo de 1 h; a pesar de lo anterior, ellos observaron incremento de TBARS, hinchamiento

mitocondrial, vacuolización y degeneración de la membrana celular, por lo que los autores sugerían que la oxidación tenía pequeños efectos en los procesos celulares. Lo anterior podría sugerir que para las NGC sucede algo similar, ya que en todas las actividades de las enzimas antioxidantes, a excepción de GR, se observaron incrementos significativos después de ese tiempo, lo que indica una gran resistencia y capacidad reductora de este tipo de neuronas ante el efecto oxidante de una alta concentración del tóxico, como lo es 30 μM donde se observó aproximadamente la muerte del 70% de la población celular a las 24 h después de retirar el tóxico. Con respecto a esto último, Lievre *et al.* (2001) también determinaron los cambios en la generación intracelular de ERO utilizando los marcadores fluorométricos dihidrorodamina 123 (DHR-123) y DCFH-DA. En general, observaron que la intensidad en la fluorescencia de DHR-123 incrementó en el periodo de reoxigenación obteniendo un pico máximo las 6 y 48 h; en el caso de la DCFH-DA se observó un incremento significativo en la fluorescencia a las 6 y 24 h a lo largo de todo el periodo de reoxigenación. Jiang *et al.* (2004) también observaron un incremento significativo de estrés oxidativo en las neuronas de hipocampo a las 4 h después de inducir una privación de glucosa y O_2 utilizando el marcador DCFH-DA. Lo anterior también confirma la existencia de ERO al menos al principio de un evento de inhibición metabólica. Como se puede observar, en ambos estudios, se obtuvo un incremento en la producción de ERO en el periodo de reoxigenación, particularmente a las 6 h, lo anterior podría explicar porqué en las NGC incrementa la actividad enzimática de GPx y de GST después de 6 h de retirar el tóxico y en CAT a las 4 h (aunque aún se mantiene un incremento no significativo a las 6 h).

Con respecto a la actividad de GR Vexler *et al.* (2003) observaron que la actividad de GR disminuyó en un 73% durante el periodo de la reoxigenación de cultivos de neuronas corticales sometidas a hipoxia mientras que, Ramanathan *et al.*, 2005 observaron un incremento significativo en la actividad de GR en el cerebelo de ratas después de ser expuestas a hipoxia. La variabilidad en la actividad de GR ante este tipo de evento sugiere que es una enzima clave cuando está presente el estrés oxidativo en un sistema vivo, ya que es esencial para el mantenimiento de los niveles de GSH en las células por lo que la respuesta de las células ante el estrés oxidativo va a depender de su capacidad reductora. Como se ha mencionado, el cerebro posee una habilidad muy limitada para combatir el estrés oxidativo. El mayor sistema antioxidante endógeno en este tejido lo conforma el ciclo redox del glutatión. El GSH actúa como un atrapador nucleofílico de compuestos tóxicos y la concentración de este compuesto depende del tiempo de su utilización, su síntesis y la regeneración de su forma oxidada. El GSH también actúa como sustrato de la GPx y GST razón por la cual las capacidades antioxidantes de las neuronas dependen significativamente de este compuesto para la eliminación de hidroperóxidos. Todo lo anterior indica que la actividad de GR regula la concentración de GSH/GSSG en la célula. En el cultivo de NGC, la actividad de la enzima no cambió a lo largo de 6 h después de retirar el tóxico, lo cual explica que no hayan disminuido las actividades de GPx y GST durante ese mismo periodo en comparación con las células que no se expusieron al tóxico. Hay que

tomar en consideración que estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* indican que la concentración de GSH es más alta en células gliales que en neuronas (Philbert *et al.*, 1991; Pileblad *et al.*, 1991; Sagara *et al.*, 1993). También se ha demostrado en cultivos que las células gliales (astrocitos) proveen a las neuronas de los precursores necesarios para la síntesis de GSH (Sagara *et al.*, 1993), por lo que se hubiera esperado que ante la escasez de glia (característica de los cultivos primarios de NGC), las neuronas no hubieran mantenido suficiente nivel de GSH para garantizar la efectividad del sistema antioxidante ligado a este compuesto. Esto sigue reafirmando la idea de la resistencia ante el estrés oxidativo y la gran capacidad antioxidante en este tipo de cultivos en presencia de IAA.

Con respecto a la actividad de GST se observó un comportamiento similar a GPx. Con respecto a lo anterior, Sarkar *et al.* (2006) y Ansari *et al.* (2004) observaron una disminución en la actividad de GST en el cerebro de ratas a las que se les indujo isquemia. Los resultados anteriores se contraponen a lo obtenido en este modelo de estudio, donde la inhibición de la oxidación de la glucosa inducido por IAA conducen a un incremento en la actividad de GST. Como se mencionó anteriormente, los resultados anteriores confirman que tanto la actividad de GST como la de GR está ligada al estado de la relación GSH/GSSG en la célula. Cabe mencionar que todas las especies eucariotas poseen diversas isoenzimas de GST en el citosol o unidas a la membrana y está presente tanto en las neuronas como en la glia. Con la excepción de la isoenzima θ todas las otras familias de GST conjugan 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) a GSH. Existen evidencias que sugieren que la expresión de GST es importante para determinar la sensibilidad de las células a un amplio espectro de tóxicos; además se ha sugerido la regulación postranscripcional de GST por ERO (Hayes y Pulford, 1995). La GST juega un papel crítico en la protección contra agentes xenobióticos electrofílicos (drogas, pesticidas, carcinógenos, etc) y contra productos del estrés oxidativo (hidroperóxidos lipídicos); cataliza la conjugación de sustratos endógenos como el colesterol α -óxido, prostaglandinas, leucotrieno A₄, ácidos biliares, hormonas esteroides y neurotransmisores (Mannervik y Danielson, 1988; Meyer y Ketterer, 1982; Burgess *et al.*, 1987; Mannervik *et al.*, 1984; Tsuchida *et al.*, 1987; Arias *et al.*, 1980; Homma *et al.*, 1986; Maruyama y Listowsky, 1984; Abramowitz *et al.*, 1988). Con respecto a esto último, la GST podría estar participando en la detoxificación del IAA en las NGC por lo cual podría estar aumentando su actividad, ya que en el cerebelo de rata se encuentran las isoenzimas GSTA4 y GSTP1 (Martínez-Lara *et al.*, 2003). La primera enzima está involucrada principalmente en la detoxificación de alquenes y la segunda en la eliminación de agentes alquilantes (Bruns *et al.*, 1999; Oakley *et al.*, 1997; Waxman, 1990), entre éstos, compuestos haluros de alquilo derivados del yodo como el yodometano, yodoetano y yodopropano (Habig *et al.*, 1974).

Finalmente, se puede mencionar que parte de la resistencia de las NGC a una inhibición metabólica y los fenómenos relacionados a ésta, se deba a que en este tipo de células se encuentra

un buen mecanismo antioxidante de defensa después de retirar el tóxico, particularmente refiriéndonos a las enzimas CAT, GR, GPx y GST en conjunto con las vías metabólicas asociadas a síntesis de glutatión.

En este estudio también se determinó la capacidad del IAA en alquilar a las enzimas GR y GST. GR contiene un puente disulfuro formado por Cys 58 y Cys 63 en su sitio catalítico (Tabatabaie y Floyd, 1994). Con respecto a GST ya se ha demostrado que en la isoforma A4 el S-(2-iodobencil) glutatión puede interactuar electrostáticamente con el grupo fenólico de Tyr 212, este residuo se encuentra comprometido en el sitio de unión electrofílico de la enzima (sitio H), particularmente para la conjugación con el sustrato (productos de la lipoperoxidación) (Bruns *et al.*, 1999). De acuerdo con lo anterior, el IAA podría ejercer un efecto inhibitor en ambas enzimas. En los resultados se observó que el tóxico a concentraciones de 10, 20 y 30 μM no inhibió en forma significativa la actividad de estas enzimas lo que indica que, al menos bajo las condiciones de este estudio, el IAA no induce la producción de ERO por su efecto alquilante, solamente en concentraciones del orden de mM el IAA ejerce un efecto alquilante en estas enzimas, de acuerdo con los datos reportados en la literatura.

Con respecto a la respuesta del NDGA ante el efecto neurotóxico del IAA, se observó una recuperación significativa en la viabilidad y en la morfología celular a las 24 h posteriores a la incubación durante 30 min con 18.4, 25 y 30 μM del tóxico. Este efecto, de acuerdo con los resultados obtenidos, posiblemente puede atribuirse a dos propiedades del NDGA: a) a su capacidad antioxidante y a b) por ser un inhibidor de la LOX. Con respecto a la primera propiedad, como se mencionó antes, ya se demostró *in vitro* que el NDGA es un atrapador de varias especies reactivas pero además evita la disminución en la concentración de GSH en cultivos neuronales. Se ha demostrado además que la presencia de NDGA 10 μM promueve un incremento de alrededor del 40% en la viabilidad celular en la excitotoxicidad inducida por NMDA en cultivos de NGC de 9 DIV (Beaman-Hall *et al.*, 1998); lo anterior sugiere que la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos podría estar relacionada con los eventos de daño morfológico hasta la muerte neuronal observada con el IAA. Ahora bien, con respecto a la propiedad del NDGA de inhibir a la LOX también está vinculada a la aparición de especies reactivas ya que el AA presente en las células se puede metabolizar a leucotrienos vía 12-LOX con la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Con respecto a esto último, Kwon *et al.* (2005) demostraron que la adición de 5 μM de NDGA protege contra la muerte neuronal y disminuye la aparición de ERO ambos eventos inducidos por la presencia de AA en un cultivo de neuronas corticales. Además, ya se ha demostrado que el NDGA inhibe a la 15-LOX del frijol de soya y de eritrocitos humanos con una CI_{50} de 12 y 6.3 μM , respectivamente (Gleason *et al.*, 1995). Todo lo anterior sugiere que en las NGC la LOX está comprometida con la aparición de especies reactivas durante la inhibición metabólica. Por otro lado, se descarta que parte de la protección del NDGA

sobre los cultivos de NGC pudiera deberse a la interacción del IAA con los grupos hidroxilo del NDGA, ya que no evitó el abatimiento energético inducido por el IAA.

El NDGA parece prevenir la aparición de estrés oxidativo inducida por IAA, lo que indica que protege por su efecto antioxidante directo a las NGC. La inactivación de aconitasa observada en presencia de IAA, pero no la de fumarasa, es por sí misma un indicador de que la muerte celular está relacionada con la generación de estrés oxidativo mitocondrial en las neuronas (Tabuchi *et al.*, 2003). Cabe mencionar que existen dos isoformas de aconitasa: mitocondrial y citosólica; el cerebro posee un 15-25% de la primera y un 75-85% de la segunda isoforma (Li *et al.*, 2001) por lo que la aconitasa mitocondrial sería la principal afectada por el estrés oxidativo en las NGC. Dentro de los posibles fenómenos generados en el estado de inhibición metabólica inducida por el IAA se encuentra la generación de $O_2^{\bullet-}$, ya que la aconitasa es extremadamente sensible a la inactivación por esta especie reactiva e inclusive también pueden estar involucrados el H_2O_2 , $ONOO^-$ y NO^{\bullet} aunque la enzima sea menos sensible a estas especies (Fridovich, 1997; Gardner y Fridovich, 1992; Gardner *et al.*, 1994,1995; Hausladen y Fridovich, 1994). El $O_2^{\bullet-}$ oxida el centro $[4Fe-4S]^{2+}$ de la aconitasa dando como resultado un centro $[3Fe-4S]^+$ inactivo además de la liberación de Fe^{2+} que puede participar en la reacción de Fenton.

La pérdida de actividad de aconitasa, tomando en cuenta que es inactivada esencialmente por $O_2^{\bullet-}$, podría también sugerir que en las NGC expuestas a IAA estaría ocurriendo una sobreactivación del receptor de NMDA (donde se ha demostrado la producción de este radical) o una pérdida de la actividad de SOD.

En resumen, la aplicación de IAA en las NGC se traduce en cambios en la relación de actividades entre aconitasa y fumarasa lo que sugiere la producción de especies reactivas después de retirar el IAA, se puede pensar particularmente en la generación de HO^{\bullet} ya que el NDGA ha demostrado ser un buen atrapador de esta ERO (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006). Es posible que el efecto protector dado por el NDGA frente al IAA se deba a su capacidad antioxidante directa o a través de la inhibición de la LOX (Gleason *et al.*, 1995).

IX. CONCLUSIONES

El IAA a una concentración de 30 μM no inhibe la capacidad antioxidante celular al menos durante las primeras 6 h posteriores a la incubación durante 30 min con el tóxico. Asimismo, no ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de GR y GST, lo que sugiere que la inhibición de las enzimas antioxidantes, en este periodo, no es un mecanismo por medio del cual el IAA induce la aparición de estrés oxidativo.

Como se observó, la preincubación con NDGA 20 μM previene de la muerte celular a las NGC expuestas a IAA aunque no evita la disminución energética inducida por el tóxico, por lo que hasta el momento, los resultados encontrados sugieren que el mecanismo por el cual actúa el NDGA como un agente citoprotector es por su capacidad antioxidante directa.

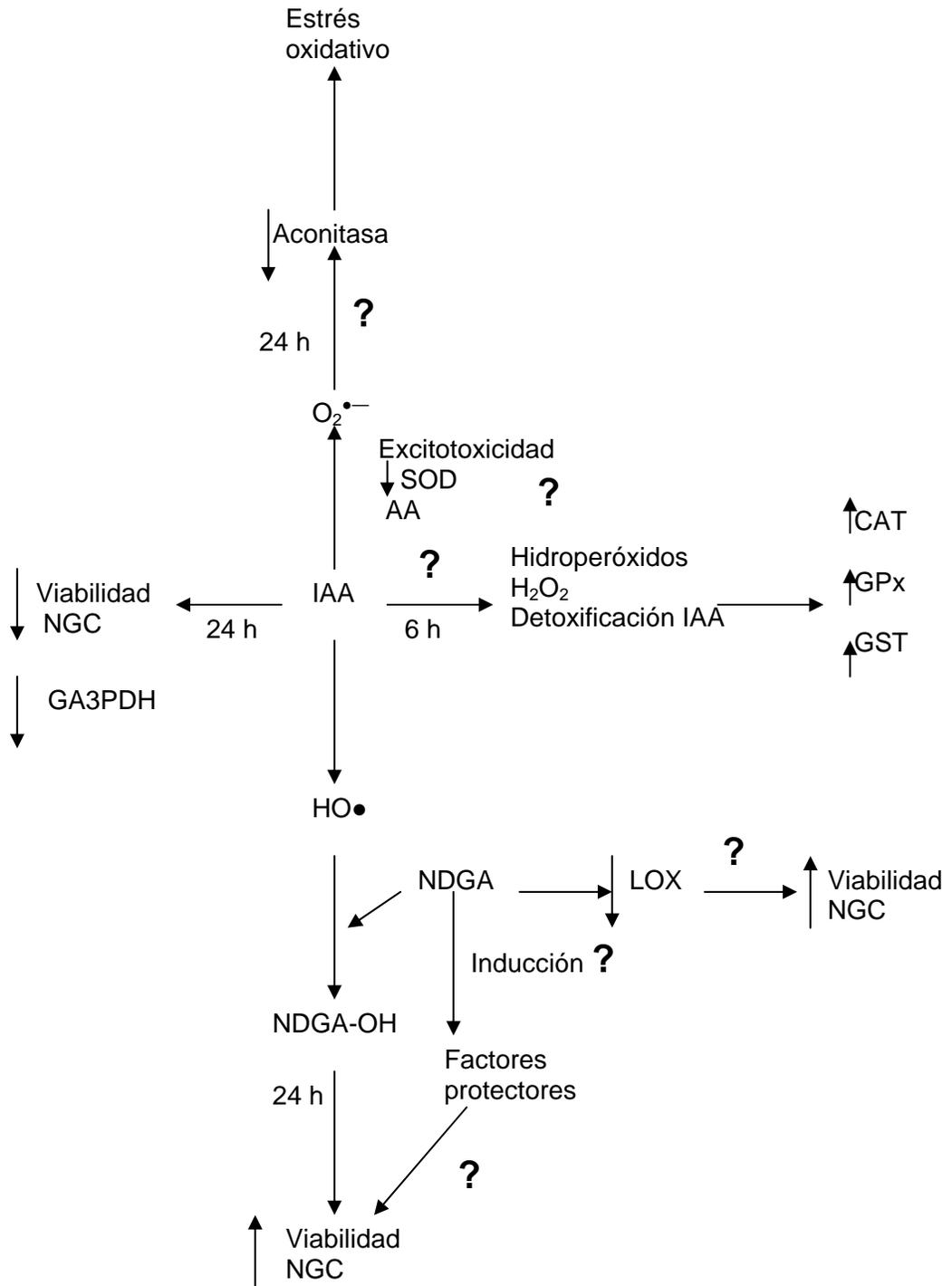
X. PERSPECTIVAS

Determinar, mediante un curso temporal, la aparición de especies reactivas de oxígeno durante y después de la exposición de las NGC a IAA.

Determinar en forma específica el tipo de especies reactivas inducidas por IAA y con ello demostrar la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO^\bullet .

Demostrar si el NDGA es capaz de inducir algún(os) factor(es) protector(es) en las NGC de tal manera que esto aporte una explicación más profunda sobre el mecanismo por el cual el NDGA es capaz de proteger contra la neurotoxicidad inducida por el IAA.

Mecanismo sugerido sobre el efecto del IAA y del NDGA en las NGC



XI. REFERENCIAS

- Abramowitz M**, Homma H, Ishigaki S, Tunsey F, Cammer W, Listowsky I. 1988. Characterization and localization of glutathione S-transferases in rat brain and binding of hormones, neurotransmitters, and drugs. *J. Neurochem.* 50:50-57.
- Aebi H**. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- Alderton W**, Cooper C, Knowles R. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357(Pt 3):593-615.
- Almaas R**, Saugstad D, Pleasure D, Rootwelt T. 2002. Neuronal formation of free radicals plays a minor role in hypoxic cell death in human NT2-N neurons. *Pediatr. Res.* 51:136-143.
- Ansari M**, Ahmad A, Ahmad M, Salim S, Yousuf S, Ishrat T, Islam F. 2004. Seleniun protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. *Biol. Trace Elem. Res.* 101:73-86.
- Argueta, V.** (Ed.) 1994. Atlas de Plantas Medicinales Tradicionales Mexicanas, vol. II. Instituto Nacional Indigenista, México, p.p: 669-670.
- Arteaga S**, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote Bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J. Ethnopharmacol.* 98:231-239.
- Arias C**, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. 2002 beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus *in vivo* and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 176:163-174.
- Awasthi Y**, Beutler E, Srivastava S. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 250:5144-5149.
- Bakken I**, White L, Aasly J, Unsgard G, Sonnewald U. 1998. [^{13}C]Aspartate metabolism in cultured cortical astrocytes and cerebellar granule neurons studied by NMR spectroscopy. *Glia* 23:271-277.
- Bas O**, Songur A, Sahin O, Mollaoglu H, Ozen O, Yaman M, Eser O, Fidan H, Yagmurca M. 2007. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochem. Int.* 50:548-554.
- Beaman-Hall C**, Leahy J, Benmansour S, Vallano M. 1998. Glia modulate NMDA-mediated signaling in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 71:1993-2005.
- Birkenfeld S**, Zaltsman Y, Krispin M, Zakut H, Zor U, Kohen F. 1987. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors. *Dis. Colon Rectum* 30:43-46.

- Bonnefoi M, Davenport C, Morgan K.** 1991. Metabolism and toxicity of methyl iodide in primary dissociated neural cell cultures. *Neurotoxicology* 12:33-46.
- Bonventre J.** 1997. Roles of phospholipases A2 in brain cell and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 16:199-208.
- Brigelius-Flohe R.** 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27:951-965.
- Bruns C, Hubatsch I, Ridderstrom M, Mannervik B, Tainer J.** 1999. Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.* 288:427-439.
- Burgess J, Yang H, Chang M, Rao M, Tu C, Reddy C.** 1987. Enzymatic transformation of PGH2 to PGF2 alpha catalyzed by glutathione S-transferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142:441-444.
- Café C, Torri C, Bertorelli L, Tartara F, Tancioni F, Gaetani P, Rodríguez Y, Baena R, Marzatico F.** 1995. Oxidative events in neuronal and glial cell-enriched fractions of rat cerebral cortex. *Free Rad. Biol Med.* 19:853-857.
- Calzado-Flores C, Segura-Luna J, Guajardo-Touche E.** 1995. Effects of chaparrin, nordihydroguaiaretic acid and their structural analogues on *Entamoeba histolytica* cultures. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 38:105-106.
- Camacho A, Montiel T, Massieu L.** 2006. The anion channel blocker, 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonic acid prevents neuronal death and excitatory amino acid release during glycolysis inhibition in the hippocampus in vivo. *Neuroscience* 142:1005-1017.
- Canals S, Casarejos M, de Bernardo S, Rodríguez-Martín E, Mena M.** 2003. Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 278:21542-21549.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri, J.** 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.
- Cao W, Carney J, Duchon A, Floyd R, Chevion M.** 1988. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci. Lett.* 88:233-238.
- Carlberg I, Mannervik B.** 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol Chem.* 250: 5475-5480.
- Chance B, Sies H, Boveris A.** 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527-605.
- Chen H, Teng L, Li J, Park R, Mold D, Gnabre J, Hwu J, Tseng W, Huang R.** 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J. Med. Chem.* 41:3001-3007.
- Cheng L, Kellog E, Packer L.** 1981. Photoinactivation of catalase. *Photochem. Photobiol.* 34:125-129.

- Chinopoulos C**, Adam-Vizi V. 2006. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* 273:433-450.
- Chirino Y**, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* 4:20.
- Chirino Y**, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. 2006. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Rev. Invest. Clin.* 58:350-358.
- Chu F**, Esworthy R, Doroshov J. 2004. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1481-1495.
- Clapp L**, Klette K, DeCoster M, Bernton E, Petras J, Dave J, Laskosky M, Smallridge R, Tortella F. 1995. Phospholipase A2-induced neurotoxicity *in vitro* and *in vivo* in rats. *Brain Res.* 693:101-111.
- Comhair S**, Erzurum S. 2005. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. *Antioxid. Redox Signal.* 1:72-79.
- Cordis G**, Maulik G, Bagchi D, Riedel W, Das D. 1998. Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:1939-1944.
- Craig J**, Callahan M, Huang R, DeLucia A. 2000. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 47:19-28.
- Culcasi M**, Lafon-Cazal M, Pietri S, Bockaert J. 1994. Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J. Biol. Chem.* 269:12589-12593.
- Currie D**, Dutton G. 1980. [³GABA] uptake as a marker for cell type in primary cultures of cerebellum and olfactory bulb. *Brain Res.* 199:473-481.
- Danielisova V**, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. 2005. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem. Res.* 30:559-565.
- Dawson T**, Dawson V, Snyder S. 1992. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical nitric oxide. *Ann. Neurol.* 32:297-311.
- Donohoe P**, Fahlman C, Bickler P, Vexler Z, Gregory G. 2001. Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during *in vitro* hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res.* 917:158-166.
- Dringen R**, Pawlowski P, Hirrlinger J. 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.* 79:157-165.
- Dugan L**, Sensi S, Canzoniero L, Handran S, Rothman S, Lin T, Goldberg M, Choi D. 1997. Mitochondrial Production of Reactive oxygen species in cortical neurons following species exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15:6377-6386.

- Earnshaw W**, Martins L, Kaufmann S. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:383-424.
- Elshafey A**, Lanyon W, Connor J. 1994. Identification of a new missense point mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) gene in family with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 3:363-364.
- Floriano-Sánchez E**, Villanueva C, Medina-Campos O, Rocha D, Sánchez-González J, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic. Res.* 40:523-533.
- Floyd R**, Carney J. 1992. Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* 32:S22-S27.
- Fridovich I**. 1997. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutases and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 25071-25076.
- Fujimoto N**, Kohta R, Kitamura S, Honda H. 2004. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). *Life Sci.* 74:1417-1425.
- Gali R**, Board P. 1997. Identification of an essential cysteine residue in human glutathione synthase. *Biochem. J.* 321:207-210.
- Gardner P**, Nguyen D, White W. 1994. Aconitase is a sensitive and crucial target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:122248-122252.
- Gardner P**, Raineri I, Epstein L, White C. 1995. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270:13399-13405.
- Gardner P**, Fridovich I. 1992. Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 8757-8763.
- Gibson G.**, Huang H. 2004. Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36:335-339.
- Gleason M**, Rojas C, Learn K, Perrone M, Bilder G. 1995. Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase. *Am. J. Physiol.* 268: C1301-C1307.
- Goldberg M**, Weiss J, Pham P, Choi D. 1987. N-methyl-D-Aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243:784-791.
- Goodman Y**, Steiner M, Steiner S, Mattson M. 1994. Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid β -peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* 654:171-176.
- Green R**, O'Brien P. 1967. Xanthine oxidase inactivation by reagents that modify thiol groups. *Biochem. J.* 105:585-589.

- Gowri M**, Reaven G, Azhar S. 1999. Masoprocol lowers blood pressure in rats with fructose-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* 12:744-746.
- Granger D**, 1988. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 255: H1269-H1275.
- Gritz D**, Kwitko S, Trousdale M, Gonzalez V, McDonnell P. 1992. Recurrence of microbial keratitis concomitant with antiinflammatory treatment in an animal model. *Cornea* 11:404-408.
- Gwag B**, Lobner D, Koh D, Wie M, Choi D. 1995. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation *in vitro*. *Neuroscience* 68:615-619.
- Habig W**, Pabst M, Jakoby W. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139.
- Halliwell B**, Gutteridge M. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. USA. 3^a Edición.
- Harper A**, Kerr D, Gescher A, Chipman J. 1999. Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radic. Res.* 31:149-160.
- Harris D**. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6:2675-2683.
- Hausladen A**, Fridovich I. 1994. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitase, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* 269:29405-29408.
- Hausladen A**, Fridovich I. 1996. Measuring nitric oxide and superoxide: rate constants for aconitase reactivity. *Methods Enzymol.* 269:37-41.
- Hayes J**, Pulford D. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445-600.
- Hensley K**, Maitt M, Pye Q, Stewart C, Wack M, Tabatabaie T, Floyd R. 1997. Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal. Biochem.* 251:187-195.
- Hernández-Fonseca K**, Massieu L. 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 82:196-205.
- Hirota I**, Yasuhito N. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2:145-169.
- Hirotsu S**, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, Hakoshima T. 1999. Crystal structure of multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12333-12338.
- Hyder P**, Fredrickson E, Rick E, Estell R, Tellez M, Gibbens R. 2002. Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). *Biochem. Syst. Ecol.* 30:905-912.

- Holmgren A, Fagerstedt M.** 1982. The *in vivo* distribution of oxidized and reduced thioredoxin in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 257:6926-6930.
- Homma H, Maruyama H, Niitsu Y, Listowsky I.** 1986. A subclass of glutathione S-transferases as intracellular high-capacity and high-affinity steroid-binding proteins. Biochem. J. 235:763-768.
- Huang J, Philbert M.** 1995. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. Brain Res. 680:16-22.
- Ikemoto A, Bole D, Ueda T.** 2003. Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. J. Biol. Chem. 278:193-203.
- Imlay J.** 2003. Pathways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol. 57:395-418.
- Inoue M, Sato E, Nishikawa M, Park A, Kira Y, Imada I, Utsumi K.** 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Curr. Med. Chem. 10:2495–2505.
- Izumi Y, Benz A, Zorumski C, Olney J.** 1994. Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. Neuroreport 5:617-620.
- Izumi Y, Benz A, Katsuki H.** 1997. Endogeneous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. J. Neurosci. 17:9448-9457.
- Izumi Y, Benz A, Katsuki H, Matsukawa D, Clifford D, Zorumski C.** 2003. Effects of fructose-1,6-biphosphate on morphological and functional neuronal integrity in rat hippocampal slices during energy deprivation. Neuroscience 11:465-475.
- Jacobson P, Schrier D.** 1993. Regulation of CD11b/CD18 expression in human neutrophils by phospholipase A2. J. Immunol. 151:5639-5652.
- Jamieson D.** 1989. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. Free Radic. Biol. Med. 7:87-108.
- Jeong G, Oh G, Pae H, Jeong S, Kim Y, Shin M, Seo B, Han S, Lee H, Jeong J, Koh J, Chung H.** 2006. Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression: ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection. Exp. Mol. Med. 38:393-400.
- Jiang X, Mu D, Manabat C, Koshy A, Christen S, Tauber M, Vexler Z, Ferriero D.** 2004. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation. Exp. Neurol. 190:224-232.
- Kallis G, Holmgren A.** 1980. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255:10261-10265.

- Kanehira** T, Takekoshi S, Nagata H, Matzusaki K, Kambayashi Y, Osamura R, Homma T. 2003. A novel and potent biological antioxidant, Kinobeaon A, from cell culture of safflower. *Life Sci.* 74:87-97.
- Kim** D, Rordorf G, Nemenoff R, Koroshetz W, Bonventre J. 1995. Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures. *Biochem. J.* 310:83-90.
- Kingsbury** A, Gallo V, Woodhams P, Balász R. 1985. Survival, morphology and adhesion properties of cerebellar interneurons cultured in chemically defined and serum-supplemented medium. *Brain Res.* 17:17-25.
- Knowles** R, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298 (Pt 2):249-258.
- Kondo** Y, Ogawa N, Asanuma M, Ota Z, Mori A. 1995. Regional differences in late onset iron deposition, ferritin, transferrin, astrocyte proliferation, and microglial activation, after transient forebrain ischemia in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15:216-226.
- Konno** C, Lu Z, Xue H, Erdelmeier C, Meksuriyen D, Che C, Cordell G, Soejarto D, Waller D, Fong H. 1990. Furanoids lignans from *Larrea tridentata*. *J. Nat. Prod.* 53:396-406
- Kramer** R, Sharp J. 1997. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett.* 410:49-53.
- Kwon** K, Jung Y, Lee S, Moon C, Baik E. 2005. Arachidonic acid induces neuronal death through lipoxygenase and cytochrome P450 rather than cyclooxygenase. *J. Neurosci. Res.* 81:73-84.
- Lafon-Cazal** M, Culcasi M, Gaven F, Pietri S, Bockaert J. 1993a. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 32:1259-1266.
- Lafon-Cazal** M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993b. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Lara** F, Márquez C, 1996. *Plantas Medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica.* UNAM, México, p.p:59-61.
- Lawrence** R, Burk R. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:952-958.
- Leppanen** L, Stys P. 1997. Ion transport and membrane potential in CNS myelinated axons. II, Effects of metabolic inhibition. *J. Neurophysiol.* 78:2095-2107.
- Li** Q, Pedersen C, Day B, Patel M. 2001. Dependence of excitotoxic neurodegeneration mitochondrial aconitase inactivation. *J. Neurochem.* 78:746-755.
- Liang** L, Patel M. 2000. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 101:563-570.
- Lievre** V, Becuwe P, Bianchi A, Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Franck P, Nicolas M, Dauca M, Vert P, Daval J. 2001. Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying

enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. *Neuroscience* 105:287-297.

- Lockhart B**, Benicourt C, Junien J, Privat A. 1994. Inhibitors of free radical formation to attenuate direct beta-amyloid₂₅₋₃₅ peptide-mediated neurotoxicity in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* 39:494-505.
- Lowry O**, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Malcolm C**, Benwell K, Lamb H, Bebbington D, Porter R. 2000. Characterization of iodoacetate-mediated neurotoxicity in vitro using primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Free Radic. Biol. Med.* 28:102-107.
- Mannervik B**, Danielson U. 1988. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem.* 22:283-337.
- Mannervik B**, Jensson H, Alin P, Orning L, Hammastrom S. 1984. Transformation of leukotriene A₄ methyl ester to leukotriene C₄ monomethyl ester by cytosolic rat glutathione transferases. *FEBS Lett.* 174:289-293.
- Margail I**, Plotkine M, Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39:429-443.
- Marklund S**, Westman N, Lundgren E, Ross G. Copper-and zinc- containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42:1955-1961.
- Martinez-Lara E**, Siles E, Hernández R, Canuelo A, Luisa del Moral M, Jiménez A, Blanco S, Lopez-Ramos J, Esteban F, Pedrosa J, Peinado M. 2003. Glutathione S-transferase isoenzymatic response to aging in rat cerebral cortex and cerebellum. *Neurobiol. Aging* 24:501-509.
- Maruyama H**, Listowsky I. 1984. Preferential binding of steroids by anionic forms of rat glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* 259:12449-12455.
- Massieu L**, Haces M, Montiel T, Hernández-Fonseca K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365-378.
- Massieu L**, Gomez-Roman N, Montiel T. 2000. *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate. *Exp. Neurol.* 165:257-267.
- Matsuda Y**, Higashiyama S, Kijima Y. 1990. Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity. *Eur. J. Biochem.* 194:713-720.

- Matsuyama S**, Llopis J, Deveraux Q, Tsien R, Reed J. 2000. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2:318-325.
- Matthews R**, Ferrante R, Jenkins B, Browne S, Goetz K, Berger S, Chen Y, Flint Beal M. 1997. Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J. Neurochem.* 69:285-289.
- Mejia-Toiber J**, Montiel T, Massieu L. 2006. D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochem. Res.* 31:1399-1408.
- Meyer D**, Ketterer B. 1982. 5 alpha,6 alpha-epoxy-cholestan-3 beta-ol (cholesterol alpha-oxide): A specific substrate for rat liver glutathione transferase B. *FEBS Lett.* 150:499-502.
- Mytilineou C**, Kokotos Leonardi E, Kramer B, Jamindar T, Olanow W. 1999. Glia Cells Mediate Toxicity in Glutathione-Depleted Mesencephalic Cultures. *J. Neurochem.* 73:112-119.
- Montiel T**, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. 2006. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp. Neurol.* 200: 496-508.
- Morán J**, Patel A. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes, *Brain Res.* 486: 5-25
- Moody T**, Leyton J, Martinez A, Hong S, Malkinson A, Mulshine J. 1998. Lipoxygenase inhibitors prevent lung carcinogenesis and inhibit non-small cell lung cancer growth. *Exp. Lung Res.* 24:617-628.
- Mosialou E**, Ekstrom G, Adang A, Morgenstern R. 1993. Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 45:1645-1651.
- Mytilineou C**, Kokotos Leonardi E, Kramer B, Jamindar T, Olanow W. 1999. Glia Cells Mediate Toxicity in Glutathione-Depleted Mesencephalic Cultures. *J. Neurochem.* 73:112-119.
- Nakayama T**. 1994. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res.* 54:1991s-1993s.
- Nordberg J**, Arner E. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1287-1312.
- Oakley A**, Lo Bello M, Battistoni A, Ricci G, Rossjohn J, Villar H, Parker M. 1997. The structures of human glutathione and various inhibitors at high resolution. *J. Mol. Biol.* 274:84-100.
- Ohta H**, Adachi T, Hirano K. 1994. Internalization of human extracellular-superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 16:501-507.
- Patel M**, Day B, Crapo J, Fridovich I, McNamara J. 1996. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 16:345-355.

- Pellegrini-Giampietro D**, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.* 10:1035-1041.
- Peng T**, Jou M, Sheu S, Greenamyre J. 1998. Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp. Neurol.* 149:1-12.
- Philbert M**, Beiswanger C, Waters D, Reuhl K, Lowndes H. 1991. Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and o-phthalaldehyde-induced histofluorescence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107:215-227.
- Pileblad E**, Eriksson P, Hansson E. 1991. The presence of glutathione in primary neuronal and astroglial cultures from rat cerebral cortex and brain stem. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 86:43-49.
- Pugazhenti S**, Akhov L, Selvaraj G, Wang M, Alam J. 2007. Regulation of Heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI 3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse beta cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E645-E655.
- Racker E**. 1950. Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 4:211-214.
- Ramanathan L**, Gozal D, Siegel J. 2005. Antioxidant responses to chronic hypoxia in the rat cerebellum and pons. *J. Neurochem.* 93:47-52.
- Ramasamy S**, Drummond G, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison D. 1999. Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 56:116-123.
- Ramoner R**, Rieser C, Bartsch G, Thurnher M. 1998. Nordihydroguaiaretic acid blocks secretory and endocytic pathways in human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 64:747-752.
- Rego A**, Santos M, Oliveira C. 2000. Glutamate mediated inhibition of oxidative phosphorylation in cultured retinal cells. *Neurochem. Int.* 36:159-166.
- Reshef A**, Sperling O, Zoref-Shani E. 1998. Opening of ATP-sensitive potassium channels by cromakalim confers tolerance against chemical ischemia in rat neuronal cultures. *Neurosci. Lett.* 250:111-114.
- Romo de Vivar A**. 1985. *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Limusa, México, 56 pp.
- Roth E**, Manhart N, Wessner B. 2004. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7:161-168.
- Safayhi H**, Mack T, Sabieraj J, Anazodo M, Subramanian L, Ammon H. 1992. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261:1143-1146.

- Sagara J**, Miura K, Bannai S. 1993. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J. Neurochem.* 61:1672-1676.
- Saluja I**, Song D, O'Regan M, Phillis J. 1997. Role of phospholipase A2 in the release of free fatty acids during ischemia-reperfusion in the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 233:97-100.
- Sapirstein A**, Bonventre J. 2000. Phospholipase A2 in ischemic and toxic brain injury. *Neurochem. Res.* 25:745-753.
- Sarkar S**, Das N. 2006. Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia-reperfusion induced oxidative damage in rat brain. *Mech. Ageing Dev.* 127:391-397.
- Satoh T**, Hosokawa M. 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:257-288.
- Scapagnini G**, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella M, Green C. 2002. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol. Pharmacol.* 3:554-561.
- Segura J**. 1978. Effects of nordihydroguaiaretic acid and ethanol on the growth of *Entamoeba invadens*. *Arch. Invest. Méd. (Mex)* 9:157-162.
- Sharma R**, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi Y. 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antiox. Redox Signal.* 6:289-291.
- Shishido Y**, Furushido M, Hashimoto S, Yokokura T. 2001. Effect of nordihydroguaiaretic acid on behavioral impairment and neuronal cell death after forebrain ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69:469-474.
- Siesjo B**, Katsura K, Kristian T, Li P, Siesjo P. 1996. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir. Suppl (Wien)* 66:8-14.
- Singh P**, Mann K, Mangat H, Kaur G. 2003. Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. *Mol. Cell. Biochem.* 243:139-145.
- Soriano A**, Helfrich B, Chan D, Heasley L, Bunn P, Chou T. 1999. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 59:6178-6184.
- Sperling O**, Bromberg Y, Oelsner H, Zoref-Shani E. 2003. Reactive oxygen species play an important role in iodoacetate-induced neurotoxicity in primary rat neuronal cultures and in differentiated PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 351:137-140.
- Tabatabaie T**, Floyd R. 1994. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 314:112-119.
- Tabuchi A**, Funaji K, Nakatsubo J, Fukuchi M, Tsuchiya T, Tsuda M. 2003. Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. *J. Neurosci. Res.* 71:504-515.

- Tamura S**, Takanoashi A, Bonkobara M, Matsuki N, Onodera T, Ono K. 1998. Lipid peroxidation, antioxidative enzyme activities, and cytosolic free calcium levels in rat hippocampus-derived cells exposed to free radicals. *J. Vet. Med. Sci.* 60:63-69.
- Tanaka E**, Niiyama S, Sato S, Yamada A, Higashi H. 2003. Arachidonic acid metabolites contribute to the irreversible depolarization induced by *in vitro* ischemia. *J. Neurophysiol.* 90:3213-3223.
- Taylor B**, Fleming W, Benjamin C, Wu Y, Mathews W, Sun F. 1996. The mechanism of cytoprotective action of lazaroids I: Inhibition of reactive oxygen species formation and lethal cell injury during periods of energy depletion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 29:1224-1231.
- Tequida M**, Cortez R, Rosas B, Lopez S, Corrales M. 2002. Effect of alcoholic extracts of wild plants on the inhibition of growth of *Asperillus flavus*, *Aspergillus Níger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium poae* moulds. *Revista Iberoamericana de Micología* 19:84-88 (edición en español).
- Tosaki A**, Bagchi D, Hellegouarch A, Pali T, Codis G, Das D. 1993. Comparisons of ESR and HPLC methods for the detection of OH. radicals in ischemic/reperfused hearts. A relationship between the genesis of free radicals and reperfusion arrhythmias. *Biochem. Pharmacol.* 45:961-969.
- Tsuchida S**, Izumi T, Shimizu T, Ishikawa T, Hatayama I, Satoh K, Sato K. 1987. Purification of a new acidic glutathione S-transferase, GST-Yn1Yn1, with a high leukotriene-C4 synthase activity from rat brain. *Eur. J. Biochem.* 170:159-164.
- Tyler V**, Foster S. 1999. *Tyler's Honest Herbal: A sensible guide to the use of herbs and related remedies.* Haworth Herbal Press, New York, p.p:109-111.
- Uto A**, Dux E, Kusumoto M, Hossmann K. 1995. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J. Neurochem.* 64:2185-2192.
- Valko M**, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C, Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266:37-56.
- Valko M**, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.Biol. Interact.* 160:1-40.
- Valencia A**, Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granele neurons. *J. Neurosci.* 64:284-297.
- Valencia A**, Morán J. 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1112-1125.
- Van-Vliet B**, Sebben M, Dumuis A, Gabrion J, Bockaert J, Pin J. 1989. Endogenous amino acid release from cultured cerebellar neuronal cells: Effect of tetanus toxin on glutamate release. *J. Neurochem.* 52:1229-1239.
- Vega M**, Walsh S, Mantle T, Coll M. 1998. The three-dimensional structure of cys-47-modified mouse liver glutathione S-transferase P1-1. Carboxymethylation dramatically decreases the affinity for

glutathione and is associated with a loss of electron density in the aB-3₁₀B region. J. Biol. Chem. 273:2844-2850.

Verastegui M, Sánchez C, Heredia N, García J. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. J. Ethnopharmacol. 52:175-177.

Vexler Z, Wong A, Francisco C, Manabat C, Christen S, Tauber M, Ferriero D, Gregory G. 2003. Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress. Brain Res. 960:90-98.

Waxman D. 1990. Glutathione S-transferases: Role in alkylating resistance and possible target for modulation chemotherapy-A review. Cancer Res. 50:6449-6454.

White R, Reynolds I. 1997. Mitochondria accumulate Ca²⁺ following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurons. J. Physiol. 408:31-47.

Williams R, Maus M, Stella N, Glowinski J, Premont J. 1996. Reduced glucose metabolism enhances the glutamate-evoked release of arachidonic acid from striatal neurons. Neuroscience 74:461-468.

Winkelman M. 1989. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. Med. Antrophol. 11: 255-268

Winterbourn C. 1993. Superoxide as an intracellular radical sink. Free Radic. Biol. Med. 14: 85-90.

Xue H, Lu Z, Cono C, Soejarto D, Cordell G, Fong H, Hodgson W. 1988. 3β-(3,4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3β-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. Phytochemistry 27:233-235.

Zaleska M, Floyd R. 1985. Regional lipid peroxidation in rat brain *in vitro*: Possible role of endogenous iron. Neurochem. Res. 10:397-410.

Zaleska M, Nagy K, Floyd R. 1989. Iron-induced-lipid peroxidation and inhibition of dopamine synthesis in striatum synaptosomes. Neurochem. Res. 14:597-605.