



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS.

EXPRESIÓN Y EFECTO DE LA
MODULACIÓN DE LA HEMO
OXIGENASA-1 SOBRE LA
NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR
YODOACETATO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Q. A. SUSANA GONZÁLEZ REYES

TUTOR: DR JOSE PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

2008



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.

Reconocimientos

Esta tesis de maestría fue asesorada por el Dr. José Pedraza Chaverri, y el trabajo se realizó en el laboratorio 209 del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.

El comité tutorial estuvo formado por:

Dr José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se agradece al CONACYT (48812), por el apoyo financiero otorgado durante la realización de esta tesis.

El examen de maestría estuvo conformado por:

PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
VOCAL	Dr. Alejandro Zantella Dehesa
SECRETARIO	Dra. Clorinda Arias Alvarez
SUPLENTE	Dra. Lourdes Massieu Trigo
SUPLENTE	Dra. Marina Macias Silva

Agradecimientos

A Dios, por el gran regalo de la vida

A mis papas, Carmen y Cuco, por el inmenso amor y la confianza que siempre me han mostrado.

A la familia González Reyes, por ser mi gran familia.

A la Dra Sílvia Guzmán Beltrán, por la guía, la inspiración y la gran amistad que me has brindado.

Al Dr. Pedraza-Chaverrí, por la gran persona que es.

A mis compañeros de laboratorio, los que fueron, los que son y los que serán parte del lab 209, por los gratos momentos compartidos.

A mis amigas entrañables, Valentina Andrade y Verónica Jurado, por ser parte de esta larga carrera y por su invaluable amistad.

A todas aquellas personas que me acompañaron en las situaciones difíciles y así como en las más felices, de este periodo de mi vida...

ABREVIATURAS

HO	Hemo oxigenasa
BV	Biliverdina
BR	Bilirrubina
BVR	Biliverdina reductasa
CO	Monóxido de carbono
Fe	Hierro
IAA	Yodoacetato
GPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
NGC	Neuronas granulares de cerebelo
MC	Medio de cultivo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
DIV	Días in vitro
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CoPP	Protoporfirina de cobalto
SnMP	Mesoporfirina de estaño
OH•	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
O ₂ ^{•-}	Radical anión super óxido
LPS	Lipopolisacárido
NMDA	N-metil-D-ácido aspartico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
Carboxi-DCF	5-(y 6-)carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceina diacetato

Contenido

	Página
Resumen	1
Antecedentes	
Estrés oxidante	2
Hemo-oxigenasas (HO)	4
Inducción y regulación de HO-1	7
Función de los productos obtenidos en la degradación del grupo hemo por HO.	9
Neurotoxicidad por ERO	
El yodoacetato: actividad neurotóxica vs neuroprotectora.	15
Justificación	
Objetivos	19
Hipótesis	19
Materiales y métodos	20
Resultados	28
Discusión	38
Resumen de resultados	42
Conclusiones	42
Bibliografía	43

ANTECEDENTES

Estrés oxidante

El estrés oxidante es una consecuencia de un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (ERN) y la habilidad de la célula para defenderse contra ellos. Así pues el estrés oxidante puede ocurrir cuando se incrementa la producción de ERO/ERN, cuando hay una disminución en la cantidad de atrapadores de ERO/ERN, o cuando ocurren ambas condiciones [Halliwell & Gutteridge, 1999]. Este desbalance resulta en un aumento de moléculas que pueden causar disfunción celular y muerte celular. Las ERO, especialmente el radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) y el anión peroxinitrito (ONOO^-), pueden producir alteraciones funcionales en los lípidos, proteínas y DNA. La incorporación de oxígeno molecular a los ácidos grasos poliinsaturados inicia reacciones en cadena en las que se forman ERO como $\text{OH}\bullet$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales alcoxilo y peroxilo [Hansberg, 2000]. El daño oxidante a los lípidos produce una pérdida progresiva de la fluidez de la membrana, reduce el potencial de membrana y aumenta la permeabilidad de iones como Ca^{2+} [Sirnonianl & Coyle, 1996].

La amenaza continua del daño que causan las ERO/ERN a la célula, los tejidos y en general en organismos vivos, disminuye por la existencia de sistemas de defensa celular.

En cuanto a los mecanismos antioxidantes, se tienen por un lado, compuestos de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico que limita las reacciones en cadena de radicales libres por donación de átomos de hidrógeno y α -tocoferol (vitamina E), que reacciona con radicales peroxilo para formar radicales de vitamina E que son poco reactivos y así se evita la peroxidación de la membrana [Halliwell & Gutteridge, 1999]. Los carotenoides (β -caroteno) que evitan el daño fotosensible, debido a las dobles ligaduras coordinadas que tienen son excelentes desactivadores del $^1\text{O}_2$. Los

carotenos también reaccionan con los radicales peroxilo y el NO_2^\bullet , generando un radical estable que puede ser reducido por el ascorbato. Otros atrapadores de ERO/ERN son la albúmina, fenoles, flavonoides, melanina y las proteínas secuestrantes que unen iones metálicos de tal forma que sean incapaces de acelerar las reacciones con ERO.

De forma similar actúan las enzimas con actividad antioxidante. Ejemplos de éstas son las superóxido dismutasas (Cu-Zn SOD y Mn SOD) que como su nombre lo indica dismutan el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 y lo hacen de manera muy eficiente e independiente del pH [Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001].

Las peroxirredoxinas son una familia de peroxidases que descomponen el H_2O_2 y otros peróxidos a través de un sistema de óxido/reducción de grupos tioles. La mayoría de la peroxirredoxinas dependen de la tiorredoxina como donador de electrones, aunque algunas pueden recibir electrones de otros tioles o de otras proteínas específicas que en una parte son semejantes a la tiorredoxina [Hoffmann, 2002].

La glutatión peroxidasa (GPx) reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor, aunque la de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tiorredoxina, glutaredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor.

La glutatión S-transferasa (GST) y el glutatión reducido, son necesarios para evitar la lipoperoxidación por ERO. La catalasa (CAT) dismuta el H_2O_2 en O_2 y H_2O y lo hace con una gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11; protege a las células de la acumulación de H_2O_2 utilizándolo como aceptor de electrones. Las enzimas catalasas/peroxidases como su nombre lo indica tienen ambas funciones, aunque en algunos casos es más eficiente una de ellas [Zámocky, 2000].

Las hemo-oxigenasas (HO) rompen el anillo pirrólico del grupo hemo. En presencia de O_2 , las hemoproteínas producen $\text{O}_2^{\bullet-}$ y por ende H_2O_2 . El grupo hemo se oxida con el H_2O_2 y se puede liberar junto con el hierro (Fe). Además el grupo hemo, siendo hidrofóbico, se incorpora a las membranas y en presencia de luz genera oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$); el Fe libre genera HO^\bullet y así ambos contribuyen a la lipoperoxidación de las membranas celulares [Bainbridge, 2005].

Hemo-oxigenasas

La familia de enzimas HO (EC 1.14.99.3; donador de hidrógeno-hemo:oxígeno oxidoreductasa) median el catabolismo del grupo hemo [Schipper et al., 2004]. La HO cataliza el primer paso que es limitante en la degradación del grupo hemo b (Fe-protoporfirina-IX) para formar la cadena abierta de tetrapirrol biliverdina-IX (BV). La reacción de la HO muestra regioespecificidad para la molécula del hemo, con lo que solo un isómero de BV es producido [Kikuchi et al., 2005]. La BV es subsecuentemente convertida a bilirrubina-IX (BR) por la biliverdina reductasa (BVR) dependiente de NADPH. La degradación del grupo hemo por la HO libera Fe^{2+} y monóxido de carbono (CO). La actividad enzimática de la HO requiere tres moles de O_2 por molécula de hemo oxidada y equivalentes reducidos de NADPH:citocromo *P*-450 (citocromo *c*) reductasa (NADPH: hemoproteína reductasa, EC 1.6.2.4) [Ryter et al., 2006; Maines & Gibbs, 2005]

Se tienen al menos dos isoformas de la HO: la HO-1 es la enzima que se encontró primero y es inducible, la HO-2 es la isoforma constitutiva [Maines, 1988; Ewing & Maines, 1991]. Se ha detectado otra isoforma, HO-3 que tiene baja actividad, sin embargo, es muy parecida a la HO-2 por lo que se sugiere sea un pseudogen [Hayashi et al., 2004].

La HO-1 y HO-2 de humanos comparten el 43% de identidad en aminoácidos. La HO-1 de humano está constituida de 288 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 32 kDa y comparte un 80% de identidad en secuencia de aminoácidos con la HO-1 de rata [Yoshida et al., 1988]. La HO-1 carece de péptido señal, pero contiene un segmento hidrofóbico de 22 aminoácidos en su extremo carboxilo, el cual puede ser importante para la inserción de esta enzima en el retículo endoplásmico (RE). Tanto la HO-1 de humanos como de ratas no tienen residuos de cisteínas, en tanto que la HO-2 tiene 316 aminoácidos con un peso molecular de 36 kDa y cuenta con tres residuos de cisteína [Shibahara, 2003].

La HO-2 tiene un extremo amino extendido y en el extremo carboxilo presenta una región hidrofóbica. Esta isoforma presenta dos sitios de unión a grupo hemo el cual

es un dipéptido de cisteína-prolina, que no está implicado en la degradación del grupo hemo [Mc Coubrey et al, 1997], sin embargo, se cree que funciona como secuestrador del grupo hemo para mantener los niveles intracelulares del grupo hemo o de reducir el estrés oxidante mediado por ese grupo.

Sin la presencia de HO-2, la función no es necesariamente compensada por HO-1. Por ejemplo, en un modelo in vivo, utilizando ratones Knock out de HO-2 se observó que en pulmones expuestos a hiperoxia, la HO-1 se indujo alrededor de 3 veces con respecto a los ratones silvestres, sin embargo, ese aumento en el contenido de enzima no mejoró las condiciones oxidantes [Dennery et al., 1998].

La HO-1 se encuentra en altos niveles de expresión en el bazo y otros tejidos que degradan eritrocitos senescentes, incluidas las células especializadas del sistema reticuloendotelial del hígado y de la médula ósea. La HO esta presente en las células hematopoyéticas de la médula ósea, donde ésta puede inhibir la diferenciación celular al bajar la concentración intracelular de grupo hemo, un factor de diferenciación de estas células. La HO también se encuentra en el parénquima del hígado, que es un sitio de ingesta y degradación del grupo hemo plasmático, hemoglobina y metemalbúmina (complejo molar 1:1 de grupo hemo y albúmina). En condiciones de hemólisis, la actividad de HO aumenta en el parénquima del hígado, riñón y macrófagos en respuesta a los altos niveles de hemoglobina circulante.

En muchos otros tejidos no involucrados en el metabolismo de eritrocitos o hemoglobina, la HO-1 se encuentra en niveles casi indetectables, esto es, en niveles basales, pero se activa transcripcionalmente de manera rápida con diversos estímulos químicos o físicos, como luz ultravioleta, H₂O₂, estrés oxidantes entre otros.

La mayor expresión de la isoenzima constitutiva HO-2, es en los testículos, aunque es ubicua en otros tejidos sistémicos, incluidos cerebro, vasculatura, hígado, riñón e intestino. La HO-2 no responde a activación transcripcional por condiciones de estrés pero responde a regulación por glucocorticoides en el cerebro [Abraham & Kappas, 2005].

La HO-1 se ha caracterizado por ser una proteína asociada al RE debido a su abundante detección en la fracción microsomal. Sin embargo, las HO-1 y HO-2 contienen un segmento de 22 residuos de aminoácidos en su extremo carboxilo que tiene características hidrofóbicas y por este motivo se sugiere una compartimentalización general de membrana. Estudios recientes sugieren la presencia de HO-1 en el núcleo y la membrana plasmática. La función potencial de compartimentalización subcelular de las HO está orientada hacia la función específica de los metabolitos provenientes de la degradación del grupo hemo por estas enzimas, por ejemplo la BR como potente sistema antioxidante [Ryter et al., 2006].

En estudios recientes, se ha descrito una asociación funcional de la HO-1 con la membrana plasmática de la caveola en células endoteliales [Kim et al, 2004]. Las células endoteliales de pulmones de ratón, fueron expuestas a varios inductores conocidos de HO-1, incluidos LPS, grupo hemo e hipoxia, y posteriormente los lisados fueron sometidos a separación fraccional por gradientes de sacarosa. En ausencia de estimulación química, la HO-1 fue localizada en la fracción que contenía el retículo endoplásmico. Sin embargo, el tratamiento de las células endoteliales con los inductores de HO-1, mostró un aumento en la expresión de la enzima y además una redistribución subcelular. El LPS causó una traslocación de la HO-1 a las fracciones que contenían citocromo c, sugiriendo una localización mitocondrial [Kim et al, 2004]. De la misma manera, el efecto de otros inductores genera especulaciones acerca de la posible función de la HO en las caveolas, en donde se sugiere que la caveolina-1 puede fungir como un freno en el mecanismo de señalización involucrado en segundos mensajeros gaseosos que se originan en las caveolas [Ryter et al, 2006; Kim et al, 2004].

La función de la HO nuclear aún no está clara, sin embargo, se ha localizado a la BVR en este sitio como respuesta a estrés de endotoxinas en el riñón de rata. Además de la función principal aceptada de la BVR como una enzima soluble metabólica, se ha sugerido un posible papel funcional en otros procesos celulares y nucleares, por ejemplo, en la regulación de la fosforilación de proteínas, en la actividad de unión a ADN y en la regulación transcripcional nuclear [Maines & Gibbs, 2005].

Inducción y regulación de HO-1

Aún cuando el grupo hemo es el típico inductor de la HO-1, existen estímulos que pueden inducir a la HO, entre estos se incluyen radiación ultravioleta, endotoxinas, metales pesados, oxidantes como el H₂O₂ [Otterbein & Choi, 2000], entre otros. En la tabla 1 se encuentra una lista de inductores así como la línea celular utilizada.

Tabla 1 Inducción de HO-1 por estrés físico y químico [Ryter et al., 2006].

Inductor	Línea celular	
H ₂ O ₂	Sistemas generadores de ERO	
	Fibroblasto dermal (humano)	
Menadiona	Fibroblasto dermal (humano)	
Radiación UVA	Fibroblasto dermal (humano)	
Terapia fotodinámica	Fibroblasto (hámster chino)	
Arsenito de sodio	Sustancias tiol reactivas	
	Astrocitos (rata)	
	Embrión hepatocito (ave)	
	Hepatoma (rata)	
	Fibroblasto dermal, colón (humanos)	
	Macrófago peritoneal (ratón)	
Óxido de fenilarsenito	Células epiteliales (ratón)	
	Embrión hepatocito (ave)	
	Dietilmaleato	Fibroblasto fetal (ratón)
	Yodoacetoamida	Fibroblasto dermal (humanos)
		Melanoma (humanos y ratón)
	Cloruro de cadmio	Metales pesados
Hepatoma (humano)		
Oocito (hámster)		
Melanoma (humanos y ratón)		
Fibroblasto dermal (humano)		
HeLa, HL60 (humano)		
Cloruro de cobalto	Embrión de fibroblasto (ratón)	
	Embrión de hepatocito (pollo)	
Cloruro de estaño	Hepatoma (humano)	
Hemo	Metaloporfirinas	
	Macrófagos (humano)	
	Hepatoma (ratón y humano)	
	Epitelio renal (rata)	
CoPPiX	Células inmortales de neuronas hipocampo.	
	Hepatoma (humano)	
ZnPPiX	Células endoteliales vasculares de cerebro (puercos)	
	Hepatoma (humano)	

Donador de NO	Óxido nítrico y derivados
	Células endoteliales aórticas (puerco)
	Endotelio pulmonar (oveja)
	HeLa (humano)
NO (gas)	HeLa (humano)
Peroxinitrito	Célula endotelial aórtica (bovino)
	Adenocarcinoma colorectal (humano)
Hipoxia	Tensión O ₂
	Oocitos (hámster chino)
	Cardiomiocitos (rata)
	Astroцитos
Hiperoxia	Macrófagos
Curcumina	Antioxidantes, flavonoides y compuestos fenolicos
	Célula endotelial aortica (bovino)
	Célula epitelial renal (rata, puerco)
Resveratrol	Cultivos primarios de neuronas
LPS	Tóxicas
	Microglia
Galantamina	Inhibidor de la acetil colina esterasa
	Células endoteliales microvasculares de cerebro (rata)

El análisis de secuencia y la organización de la HO-1 humana, de rata, de ratón y de pollo, muestran que el control transcripcional de esta enzima, está dado por los elementos regulatorios localizados en la región 5' del promotor del gen de HO-1. Dentro de esta región se encuentran dos enhancers, E1 a -4 kb y E2 a -10 kb del sitio de inicio de la transcripción +1 [Alam et al., 1995]. Ambos enhancers contienen elementos que responden al estrés (StRE) y actúan de manera *cis*, la secuencia consenso es T/CGCTGAGTCA. Los StRE contienen secuencias consenso intrínsecas llamadas ARE (elementos de respuesta antioxidante), además de elementos de reconocimiento Maf que están sobrelapados con los ARE (MARE) y sitios de unión AP-1 [Inamdar et al., 1996]. Asimismo, la región promotora de *ho-1* contiene diferentes elementos que responden a hipoxia (HRE) [Ryter & Choi, 2005].

Los elementos regulatorios mencionados con anterioridad, son sitios de unión para diferentes factores de transcripción sensibles al estado redox de la célula, algunos de estos factores son: NF-κB, AP-1/2, factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1), Nrf2, entre otros [Alam et al, 1994].

El factor de transcripción AP-1, es una combinación dimérica de proteínas básicas de cremallera de leucinas de las familias Fos y Jun. Estudios recientes, han

demostrado que la inducción de HO-1 por estrés oxidante como el producido por: el grupo hemo, arsenito de sodio, cloruro de cobalto, LPS, partículas respirables generadas de la combustión incompleta de combustibles fósiles y protoporfirina de cobalto, está mediada por la activación de la vía de AP-1 [Prawan et al., 2005]. Se sabe que el uso de antioxidantes, como la N-acetilcisteína puede atenuar la inducción de HO-1 por AP-1 [Camhi et al., 1998], y por ello es posible que las ERO esten implicadas de manera importante en la ruta de transducción de señales que permite la transcripción del gen de HO-1 dependiente de AP-1.

Aunque las secuencias ARE fueron inicialmente consideradas que respondían al estrés por la interacción con el factor de transcripción AP-1, se ha demostrado que esas mismas secuencias interactúan con otro factor de transcripción, Nrf2 [Alam et al., 1999].

El factor Nrf2 es una proteína de 66 kDa, es un miembro de la familia de los Cap'n'Collar, de los factores de transcripción básicos de cremallera de leucinas y tiene un papel esencial en la expresión de genes inducibles por estrés, enzimas antioxidantes y de desintoxicación de fase II, incluidas NADPH:quinona oxidoreductasa, γ -glutamylcisteína sintasa, glutatión S-transferasa, HO-1 y tioredoxina, entre otros [Itoh et al., 1997; Srisook et al., 2005]. En condiciones normales, este factor se encuentra en estado inactivo, secuestrado en el citoplasma por su represor citosólico Keap1. Cuando se da una estimulación por agentes que causan estrés oxidante, los residuos -SH que contiene Keap1 son oxidados y la retención de Nrf2 dependiente de Keap1 es inactivada. De esta forma, Nrf2 es liberado, activado y transportado al núcleo. En el núcleo, Nrf2 se une a diferentes elementos de respuesta como son MAREs, AREs, XREs y StREs en asociación con pequeñas proteínas nucleares Maf, para activar la transcripción de varios genes blanco de Nrf2; fig. A [Prawan et al., 2005; Srisook et al., 2005].

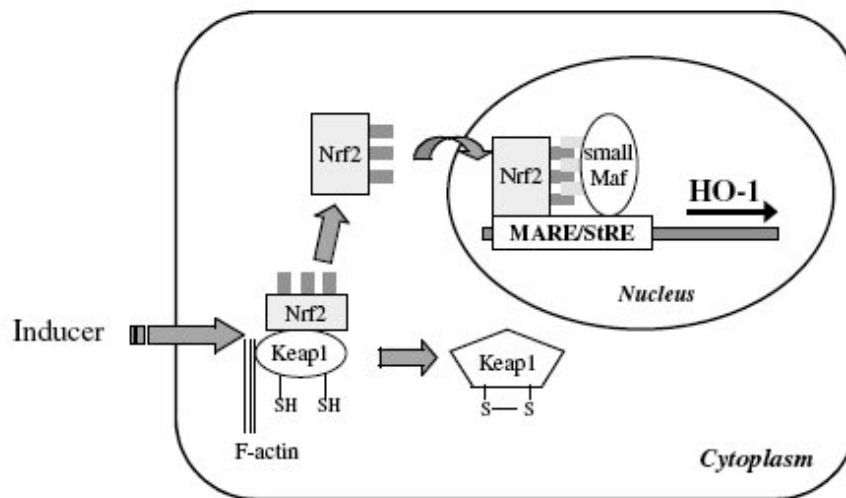


Fig. A. Mecanismo propuesto para la inducción de la expresión de HO-1 por la activación de la vía de Nrf2, y su traslocación al núcleo para unirse a MARE/StRE en conjunto con proteínas Maf nucleares.

La expresión de HO-1 puede ser modulada por el grupo hemo, que se une al represor transcripcional Bach 1 e interfiere con la unión al DNA. El dipéptido C-P que se encuentra en Bach 1, es un motivo regulador conservado del grupo hemo (HRM), y media la interacción hemo-Bach 1. La unión del grupo hemo al HRM en Bach 1, ocasiona modificaciones estructurales e inhabilita a Bach 1 para unirse a secuencias MARE. En ausencia de grupo hemo libre, Bach 1 forma heterodímeros con proteínas nucleares Maf, para que ese complejo Bach 1-Maf se una a las secuencia MARE y reprima la transcripción de *ho-1* de una manera dependiente de MARE [Oyake et al., 1996].

En presencia del grupo hemo o en la ausencia de la represión causada por Bach 1, las secuencias MARE pueden unirse a otros factores heterodiméricos dependientes de Maf, por ejemplo, Nrf2 y AP-1, involucrados en la activación transcripcional de *ho-1*; fig. B [Srisook et al., 2005].

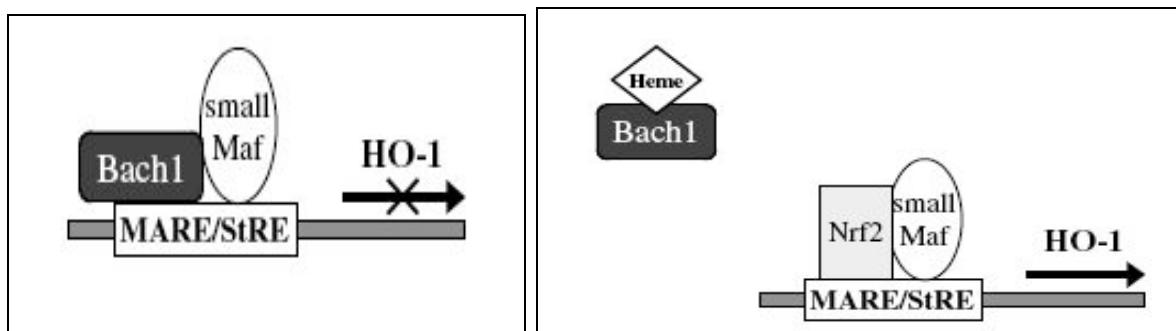


Fig. B. Modelo esquemático que muestra la desrepresión de Bach 1 por el grupo hemo.

La función del represor Bach 1, el cual contiene HRM, es regular específicamente la disponibilidad del grupo hemo, el sustrato fisiológico de HO-1 que es liberado en condiciones de estrés oxidante [Srisook et al., 2005].

La regulación de la expresión de la HO-1, es un tema amplio por la diversidad de estímulos que activan a diferentes factores de transcripción. En años recientes, se ha mostrado la capacidad de la BVR de fungir como un factor de transcripción implicado en la inducción de la HO-1. La BVR, es una reductasa que tiene requerimientos de pH y cofactores dual, es decir, usa NADH en rango de pH ácido (pico de actividad a pH ~6.7), mientras que con NADPH es utilizado en rango básico (pico de actividad a pH ~8.7). La BVR es codificada por una solo copia del gen y es modificada postranscripcionalmente [Kutty & Maines, 1981]. Además, es una fosfoproteína que se autofosforila de forma reversible, y esta forma es esencial para la actividad de la BVR de reducir BV a BR [Salim et al., 2001].

Por otro lado, a parte de su actividad de reductasa, se ha mostrado su función como cinasa de residuos de serina/treonina, que es activada por radicales de oxígeno y se transloca al núcleo en respuesta a estrés oxidante y cGMP [Ahmad et al., 2002]. Las BVRs humana y de rata comparten un 84% de identidad de secuencia de aminoácidos. La BVR humana, tiene una región con residuos característicos conservados en proteínas con dominio de dimerización cremallera de leucinas. Este motivo consiste de cinco leucinas repetidas (L1-L5), separadas por seis aminoácidos. Otra característica estructural de los dominios de dimerización, incluye la estructura secundaria que en la mayoría de los casos esta conformada por el modelo

hélice-giro-hélice, y una región básica invariable que comienza exactamente a siete residuos de aminoácidos del extremo amino a L1 y que es flanqueado por un residuo de alanina. La región básica, es el dominio de unión al DNA. Una estructura secundaria α/β con leucinas repetidas, también forma un dominio de alta afinidad para la interacción de proteínas-proteínas [Kobe & Deisenhorfer, 1993].

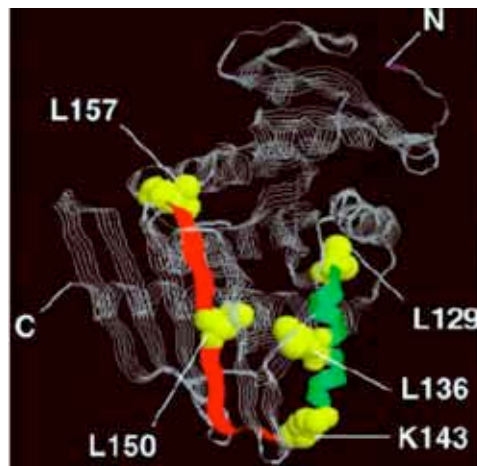


Fig. C. Predicción estructural tridimensional de la BVR humana.

Debido a que BVR es una proteína bzip, que se puede unir a elementos AP-1 y las proteínas Maf, puede heterodimerizar con la familia de los factores de transcripción AP-1, la formación del complejo entre BVR y Maf podrían bloquear la actividad de represión de Bach 1 y permitir la inducción de la expresión de HO-1, consistente con lo visto en el daño de isquemia y reperfusión en células renales [Mayer et al., 2003].

La BVR también puede regular la expresión del gen de *ho-1*, usando un sitio de la BVR para unir metaloporfirinas distintas de esas del sitio de unión de la biliverdina. Dependiendo del metal quelado, la metaloporfirina puede activar o inhibir BVR [Bell & Maines, 1988], el hierro de las hematoporfirinas fue caracterizado por ser un inhibidor de la reductasa, mientras que la protoporfirina de cobalto es un activador de la reductasa; los complejos de las metaloporfirinas regulan la expresión de *ho-1*, así como también una gran número de genes, incluidos la ALA sintasa enzima limitante en la síntesis de grupo hemo [Maines, 2005].

Función de productos obtenidos en la degradación del grupo hemo por HO.

Las HO son las únicas enzimas que pueden catabolizar el grupo hemo. Los tres productos que se obtienen de esta degradación son: CO, Fe y BV.

CO. Inicialmente el CO proveniente de la acción de la HO se consideraba como un compuesto de desecho sin una función fisiológica importante. De hecho, en concentraciones elevadas el CO muestra una unión competitiva por los sitios del oxígeno en la hemoglobina. Sin embargo, el CO comparte propiedades comunes con el NO. El CO, es soluble tanto en sistemas acuosos como en solventes orgánicos, y es relativamente estable en sistemas biológicos [Cuadrado & Rojo, 2008]. El mecanismo de acción del CO no está completamente entendido, aunque se relaciona con la activación de la guanilato ciclasa con niveles incrementados de guanosina 3-5 monofosfato (cGMP). Los primeros indicios que muestran una función de señalización del CO, surgen de la observación de que este compuesto puede estimular a la guanilato ciclasa in vitro por unión al grupo hemo para producir cGMP, que actúa como segundo mensajero y juega un papel substancial en procesos fisiológicos incluyendo vasodilatación y transducción de señales neuronales; así como también estimula la producción de cGMP al ser aplicado directamente en las vasculaturas de las células de músculo liso [Kim et al., 2006].

Además, se ha implicado al CO en la inhibición de la agregación plaquetaria y en la relación de la vasculatura en el músculo liso [Brüne & Ullrich, 1987; Utz & Ullrich, 1991].

El CO a bajas concentraciones muestra diferentes efectos protectores, algunos de ellos son: anti-inflamatorios, antiapoptóticos y antiproliferativos en cultivos celulares y en sistemas en vivo, por modular rutas de señalización intracelular [Ryter et al., 2007]. En la fig. D, se muestra una representación de las vías que son activadas por CO, para conferir protección celular.

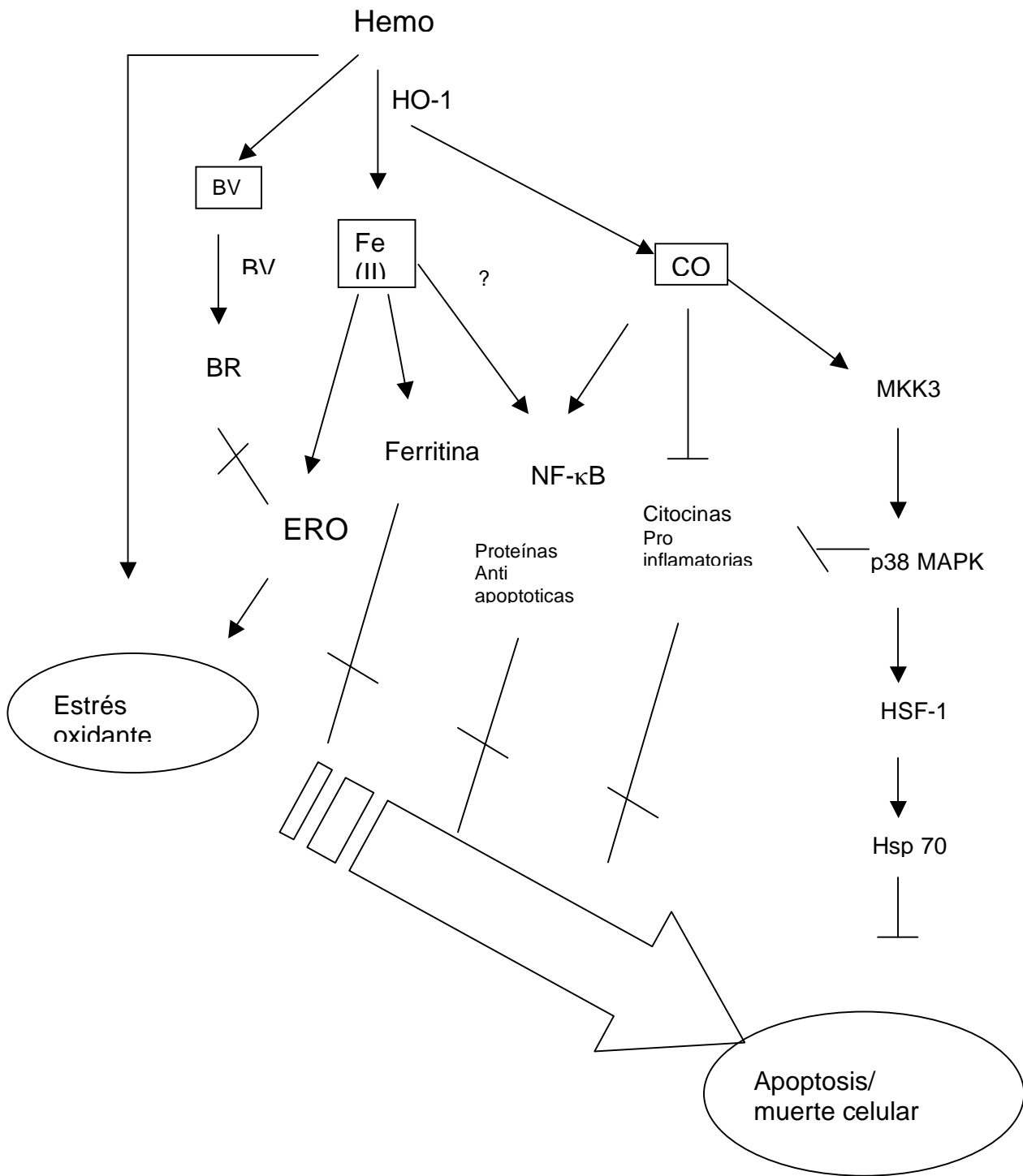


Fig. D. Modelo esquemático del potencial de protección del sistema de HO/CO. El CO protege a células endoteliales de la apoptosis, al modular la activación de la proteína cinasa cinasa-3 (MKK3) y por la ruta de la proteína cinasa mitógeno activada p38 (MAPK/p38). Esta ruta ha estado implicada, en efectos antiapoptóticos y anti-inflamatorios (por ejemplo regulando negativamente la producción de citocinas), así también en el incremento secundario de las proteínas de estrés térmico, por ejemplo la Hsp 70, que contribuye a la protección celular.

Los niveles fisiológicos de CO son producidos endógenamente por el sistema de HO, pero la administración exógena de este compuesto, produce efectos protectores similares en sistemas in vitro y en modelos animales. La introducción de moléculas liberadoras de CO denominadas CO-RM, que tienen diferentes metales de transición en el centro, coordinados con los grupos carbonilo, han dado paso a la herramienta terapéutica para elucidar las funciones del CO en los sistemas probados [Motterlini et al., 2005].

La administración sistémica de CORM-A1, liberó CO al cerebro lo que provocó vasodilatación y efectos protectores en la circulación cerebral, y protegió los cerebros de puercos neonatos de daño cerebrovascular causado por un ataque epiléptico [Zimmermann et al., 2007]

Fe. El Fe liberado de la degradación del grupo hemo por la HO puede ser considerado como hierro “lábil” o “quelable”, donde puede estar disponible para procesos celulares que dependen de este elemento. Existe una hipótesis acerca del destino del hierro liberado, ésta indica que el Fe está transitoriamente disponible para la producción de ERO intracelular. La reacción potencial en donde el Fe puede jugar un papel catalítico incluye, pero no está limitado a, la multiplicación de la reacción en cadena de oxidación de lípidos, la nitrosilación de tioles mediada por NO[•] y la reacción de Haber-Weiss la cual genera HO[•] en donde el H₂O₂ está implicado. Se ha propuesto que la actividad de HO no es benéfica pues libera el Fe del grupo hemo para dar lugar a reacciones oxidativas, aunque la evidencia in vitro es limitada debido a que los experimentos se realizaron en condiciones de cantidades muy elevadas de sustrato (hemo) o de Fe [Ryter et al., 2006].

En estudios realizados en el sistema endotelial, se muestra que en condiciones de estrés oxidante, se promueve la inducción de los niveles de mRNA, tanto de la HO-1, como de la ferritina. Después de unas horas, la cantidad de HO-1 y ferritina se aumentaron de manera considerable, proporcionando con ello protección en células expuestas a H₂O₂ [Balla et al., 1992]. Se propone, que la ferritina es la molécula protectora, pues cuando se realizaron experimentos con mutagénesis dirigida sobre la cadena pesada de la ferritina, se observó que se perdió la actividad de

ferrooxidasa y tiene capacidad deficiente de almacenar Fe, y con ello se causó daño celular [Balla et al., 1992].

Ferris y col. [1999] demostraron que la HO-1, es necesaria y suficiente para proteger a las células de fibroblastos, de la toxicidad ocasionada por la deprivación de suero, mostrando la función protectora de la HO-1. La ausencia de HO-1, permite la acumulación de Fe en el hígado de ratones carentes de esa enzima y aumenta el Fe celular en cultivos de fibroblastos expuestos a condiciones de deprivación de suero, mientras que la sobreexpresión de HO-1 disminuye el nivel celular de Fe, se sugiere que la movilización del Fe es debido a la actividad de HO-1 [Ferris et al., 1999].

La manera en como el Fe es secuestrado, puede o no depender de la expresión de la ferritina. Se ha detectado la presencia de una bomba ATP-asa dependiente de Fe, que puede fungir como mecanismo para movilizar el Fe que es liberado, para ser transportado hasta el lugar donde esta la transferrina [Barañano et al., 2000]. La inducción y la actividad de la HO-1 y de la bomba ATP-asa dependiente de Fe es simultánea; por otra parte, la localización subcelular de estos dos componentes es la membrana del retículo endoplasmático, esto es, la bomba de Fe está muy ligada a la presencia de HO-1 [Ferris et al., 1999; Barañano et al., 2000].

Biliverdina. Es el primer producto del corte del grupo hemo producido por la HO, la BV es un pigmento soluble, verdoso. Su reducción enzimática por la BVR origina BR, un pigmento hidrofóbico, amarillento que puede estar en la fase lipídica por partición. La BR producida endógenamente es excretada de células y tejidos y pasa a través del suero sanguíneo en asociación con proteínas séricas como la albúmina. La BR es removida del suero exclusivamente por el hígado, donde es metabolizado a mono y diglucuronidos por la fase II hepática UDP:glucuroniltransferasas. La glucuronidación solubiliza la BR y previene su reabsorción en el intestino. La BR conjugada pasa del hígado a las heces a través de la bilis. En las heces es posteriormente degradada a urobilinógenos por un proceso reductivo de microorganismos intestinales [Ryter et al., 2006].

Aún cuando en condiciones de elevadas concentraciones de BV o BR se presentan daños sobre todo en niños neonatos, se han identificado propiedades antioxidantes de la BR que es un atrapador del 1O_2 en disolventes orgánicos, y por ello previene la

fotooxidación de hidrocarburos [Stevens & Small, 1976]. La BV y la BR pueden funcionar como potentes antioxidantes con posibles implicaciones fisiológicas. Esto sugiere que la actividad antioxidante de la HO puede estar mediada por estos compuestos. Esto es, la BV y la BR probablemente ejerzan su efecto protector (incluido el anti-apoptótico) por sus propiedades antioxidantes. La descripción de un ciclo en el cual BV es convertida en BR por la BVR, y donde la BR es reciclada a BV sugiere un mecanismo para amplificar efectos anti-oxidantes [Otterbein et al, 2003].

Funciones neuroprotectoras de HO-1.

Las células neuronales y no neuronales del cerebro muestran una rápida capacidad a sobre regular a la HO-1 a nivel transcripcional en respuesta a estímulos nocivos. La rápida degradación del grupo hemo por hemoproteínas y la generación de pigmentos biliares antioxidantes puede ser la base para la neuroprotección observada, asociada con un aumento en la actividad de HO [Schipper, 2004]. Algunos de los efectos protectores de la HO-1 in vivo pueden deberse a la liberación de CO en el curso del catabolismo del grupo hemo. En pacientes con hemorragia subaracnoide, por ejemplo, se ha postulado que el CO, proveniente del grupo hemo, disminuye los vasoespasmos cerebrales por promover la relajación vascular del músculo liso [Suzuki et al., 2003].

Se ha demostrado neuroprotección, en ratones transgénicos que sobreexpresaban HO-1, los cuales fueron sometidos a daño isquémico, pues hubo una disminución de los marcadores de productos finales de la peroxidación, aumentaron los niveles del factor anti-apoptótico Bcl-2 en las neuronas y un menor volumen de lesión comparativamente con los ratones silvestres [Panahian et al., 1999].

La neuroprotección atribuida a la expresión de la HO-1 en la glia ha sido demostrada en modelos animales con daño traumático en el cerebro. En estudios in vitro con neuronas granulares de cerebelo obtenidas de ratón transgénico que sobre expresaba HO-1, fueron relativamente resistentes al daño oxidante por glutamato relacionado con H₂O₂ [Chen et al., 2000]. Además, se ha observado que la HO-1 puede proteger al cerebro de excitotoxicidad aguda generada por NMDA (N-metil-D-

ácido aspártico). La inyección de este compuesto en el estriado causa una rápida y localizada lesión excitotóxica, acompañada de un gran aumento en la producción de radicales libres, lo cual aumenta en la ausencia de HO-1 [Ahmad et al., 2006].

Estudios con la línea HT22 (línea celular inmortal de neuronas de hipocampo de ratón), han demostrado que la administración de cuadraticusxantona A (CTXA) a los cultivos, previno la muerte celular ocasionada por glutamato. El CTXA indujo la expresión y la actividad de HO-1 de forma dependiente de la concentración y del tiempo. Y el aumento en la cantidad de la enzima suprimió la generación de ERO provocada por el glutamato [Jeong et al., 2008].

Por otra parte, se ha visto que el ácido rosmérico (RA), ha protegido a cultivos de células dopaminérgicas humanas, de la neurotoxicidad inducida por el H₂O₂. La inducción de la HO-1 por el RA, han atenuado significativamente la generación ERO y la muerte celular por apoptosis [Lee et al., 2008].

Neurotoxicidad inducida por ERO.

La células eucariontes están sometidas a daño oxidativo derivado al menos de tres fuentes: metabolismo anaerobio, respuesta inmune y toxinas. Mientras que el oxígeno molecular es requerido de manera crítica, la respiración mitocondrial en los organismos superiores constantemente genera ERO. Además del metabolismo, las neurotoxinas ambientales también alteran el estado redox de la célula [Cuadrado & Rojo, 2008].

Cuando la producción de ERO, no puede ser controlada, el daño oxidativo a las macromoléculas resulta en la activación de rutas apoptóticas o de necrosis, ocasionando la muerte celular. Las neuronas, son particularmente sensibles al estrés oxidante por diversas razones: i) las necesidades energéticas están provista en su mayoría por la cadena respiratoria; ii) el parénquima del cerebro contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, los que son susceptibles de daño por peroxidación [Floyd & Carney, 1992]; iii) algunas enzimas antioxidantes, incluida catalasa, no son abundantes en el cerebro [Marklund et al., 1982]; iv) una

gran cantidad de sinapsis excitatoria usa glutamato u otros aminoácidos excitatorios como neurotransmisores. Una activación excesiva de los receptores de glutamato da paso a la excitotoxicidad, generación de ERO y muerte celular; v) la presencia de metales que pueden ser usados para reacciones de oxidación, como es el Fe que genera la reacción de Fenton [Cuadrado & Rojo, 2008].

El yodoacetato: actividad neurotóxica vs neuroprotectora.

El yodoacetato (IAA) es un inhibidor de la glucólisis. Este compuesto actúa principalmente sobre la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) la cual cataliza la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a un compuesto de alta energía como es el 1,3-bifosfoglicerato con la reducción de NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$. El IAA reacciona irreversiblemente con el grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína en el sitio activo de la enzima con lo que evita la formación del tiohemiacetal. Se ha encontrado que este compuesto alquilante también inhibe a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) enzima clave en la ruta de las pentosas fosfato [Fahim et al., 2003].

Aunque la glucólisis solo proporciona una pequeña parte de la energía total disponible como glucosa, es esta ruta la que proporciona intermediarios clave para el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa vía la cadena de transporte de electrones. De esta manera la glucólisis es una ruta crítica para mantener las funciones metabólicas de las neuronas [Malcolm et al., 2000].

De manera interesante, a concentraciones nanomolares, el IAA ha mostrado tener efectos neuroprotectores asociados con la preservación del potencial de membrana en la mitocondria. En cultivos expuestos a Fe^{2+} hay incremento en los niveles de ERO mitocondrial. Las neuronas de hipocampo pre-tratadas con IAA (2-200 nM), se protegen contra la toxicidad del glutamato y Fe^{2+} , un metal que induce la producción de HO^{\bullet} y peroxidación de los lípidos de las membranas [Guo et al., 2001].

Se ha sugerido que el IAA puede prevenir la apoptosis. Las neuronas expuestas a condiciones oxidantes y apoptóticas mostraron estabilización de funciones mitocondriales y la supresión de la producción de ERO. Estos datos sugieren que el mecanismo por el cual el IAA protege a las neuronas involucra la sobre regulación de ciertas proteínas chaperonas y la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Los niveles de Hsp70, Hsp90 y Bcl-2 se incrementaron significativamente dentro de las primeras 6-12 h de exposición a IAA y esos niveles permanecieron altos al menos hasta las 24 h de exposición al IAA [Guo et al., 2001].

A altas concentraciones el IAA, tiene un efecto inhibitorio de enzimas que contienen grupo tiol, por ejemplo, de la glutatión peroxidasa plásmatica de eritrocitos humanos [Awasthi et al., 1975], glutatión sintasa [Gali & Board, 1997], glutatión S-transefasa de hígado de ratón [Vega et al., 1998], glutatión reductasa, glutatión S-transferasa y catalasa de cultivos de neuronas de hipocampo [Hernández-Fonseca et al., 2008] las cuales tienen un papel crucial en el atrapamiento de radicales libres.

Por otro lado, la administración sistémica del IAA, se ha usado ampliamente como modelo químico de estado hipoglicémico y también como isquemia química, en diferentes cultivos celulares, incluidos, hepáticos, renales y neuronales [Nicotera et al., 1989; Lash et al., 1996; Gores et al., 1989; Rego et al., 1999; Montiel et al., 2006; Massieu et al., 2000; Sperling et al., 2003]. La isquemia química mimetiza dos características del daño hipóxico: estrés reductivo y deficiencia de ATP [Gores et al., 1989b].

La homeostasis de calcio, esta muy ligada a la inhibición sustancial del metabolismo glucolítico, ya que se pueden desestabilizar los mecanismos de entrada y salida de calcio dependientes de ATP, favoreciendo la producción de ERO [Massieu et al., 2003]. Asimismo, se ha observado que en cultivo de neuronas de hipocampo, la muerte neuronal inducida por una concentración de 50 μ M de IAA, se relaciona con la alteración en el almacenamiento de calcio debido a una baja en los niveles de ATP [Hernández-Fonseca & Massieu, 2005].

Se ha observado que el daño neuronal está relacionado con la presencia de ERO. Hernández-Fonseca y col. [2008], mostraron que en cultivos de neuronas de hipocampo expuestas a 50 μM IAA, la producción de ERO es en gran medida dependiente de la presencia de calcio extracelular y de los receptores de NMDA, sugiriendo que el flujo de calcio a través de estos receptores, promueve la generación de ERO. Sin embargo, con 100 μM de IAA que mimetiza un estado de hipoglicemia severa, el déficit energético es muy elevado y el flujo de calcio a través de los receptores de NMDA no está involucrado en la generación de ERO.

En estudios realizados con neuronas granulares de cerebelo de rata de 6-8 DIV, se observó que los cultivos expuestos a 30 μM de IAA, no son sensibles a los antagonistas de los receptores de glutamato MK-801 o NBQX, por lo que se ha sugerido que en la muerte celular, están implicados mecanismos distintos a la excitotoxicidad. En este sentido, se probó la capacidad de diferentes antioxidantes, para prevenir el daño generado por el IAA, y se observó que el BHT, Trolox y el U-83836E (análogo aminoesteroide de la vitamina E) fueron eficaces en proteger a los cultivos de neuronas granulares de cerebelo; estos datos sugieren que la presencia de ERO está implicada en el daño causado por el IAA [Malcolm et al., 2000].

Uto y col. [1995] mostraron que en cultivos corticales y en neuronas de hipocampo no se disminuyó el daño generado por el IAA, cuando se removió el Ca del medio o por el uso de antagonistas de los receptores de glutamato NMDA o MK-801, sugiriendo que la excitotoxicidad no es el principal mecanismo en este evento. Sin embargo, la vitamina E adicionada a los cultivos tuvo la capacidad de aminorar el daño celular, por lo que se sugiere que el daño provocado por el IAA está mediado en gran medida por la presencia de ERO.

En estudios in vivo, se mostró que la administración de IAA al estriado causó un incremento en la generación de radical $\text{HO}\cdot$ y se aumentó la concentración de 3-nitrotirosina que es un indicativo de una mayor producción de ONOO^- [Matthews et al., 1997].

En células de astrocitoma humano, se observó que la administración de 75 μM de IAA indujo una rápida disminución de ATP y de los niveles de glutatión intracelular. Además, hubo acidosis, flujo de calcio, pérdida de las funciones de membrana, ERO y eventualmente muerte celular. Sin embargo, la pre-incubación con los antioxidantes ácido nordihidroguaiayaretico (NDGA) y de la troxolamina U-78517F, eliminó la acumulación de los ERO, y retrasó el inicio de la muerte celular; con ello se sugiere que la formación de ERO, es un punto importante durante el daño celular que conduce a muerte causado por déficit energético [Wu et al., 1996].

Justificación.

La hemo oxigenasa-1, es una enzima que ha mostrado tener funciones protectoras en condiciones de estrés oxidante. La participación de esta enzima en diferentes líneas celulares ha sido demostrada, sin embargo, en cuanto a estudios en el sistema nervioso central aún, es un tema poco estudiado. Con este trabajo se pretende evaluar el papel de HO-1 en la defensa antioxidante en el cerebro, utilizando para ello cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata, ya que son de fácil obtención y de gran homogeneidad celular. La administración del IAA a los cultivos, provee características que mimetizan eventos de daño, por ejemplo isquemia química e hipoglicemia.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la participación de la HO-1 en cultivos de neuronas granulares de cerebelo al ser expuestos a IAA.

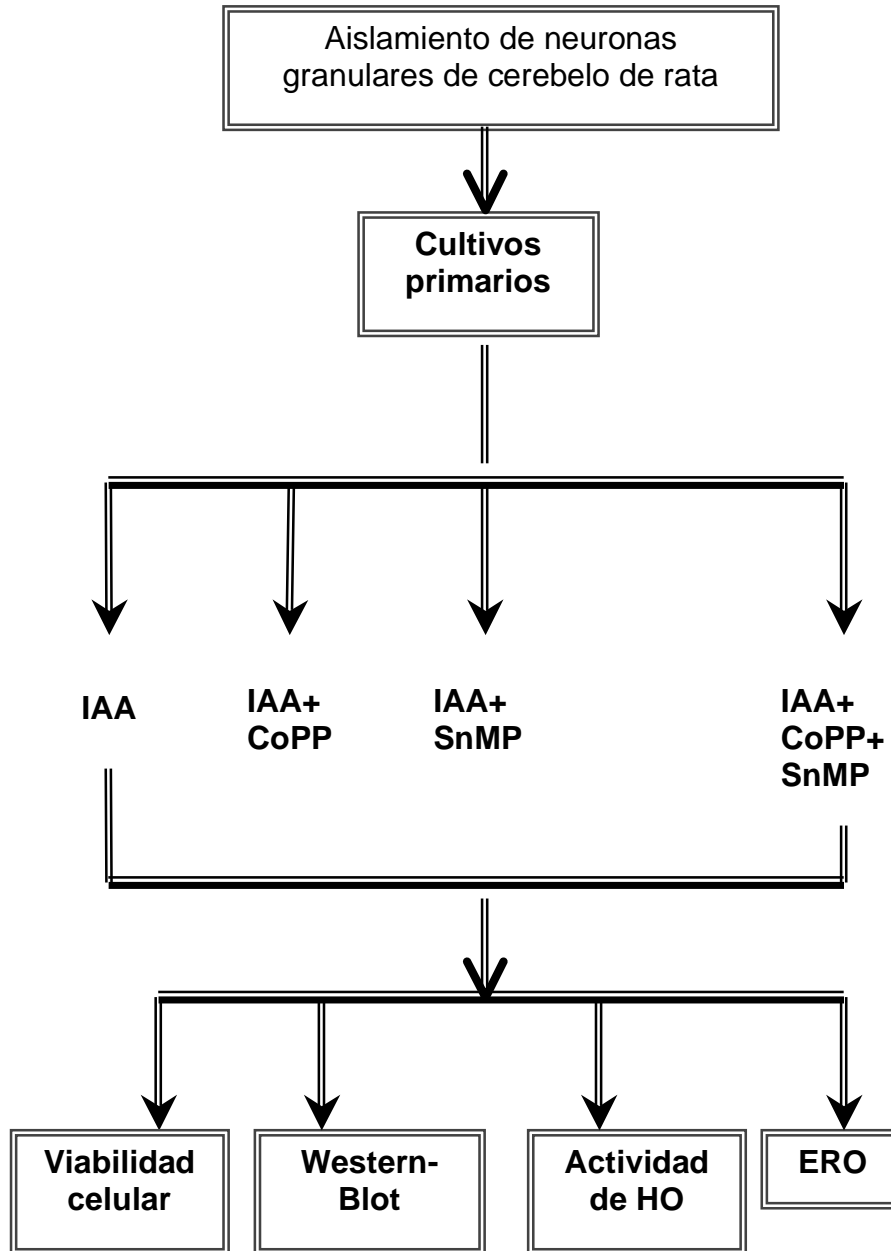
PARTICULARES

- Caracterizar la citotoxicidad del IAA en NGC.
- Determinar el efecto del IAA sobre la expresión y la actividad de HO-1 en NGC.
- Evaluar si la inhibición de la HO exacerba la muerte celular ocasionada por IAA.
- Investigar si la sobreexpresión transitoria de HO-1 protege a las NGC de la muerte inducida con IAA.
- Investigar si la inhibición de la HO o la inducción de HO-1 modulan la generación de ERO en NGC expuestas a IAA.

HIPÓTESIS

Debido a que la HO-1 se induce por diversas condiciones, por ejemplo, metales, flavonoides, estrés oxidante, hiperoxia e hipoxia, entre otros, se esperaría que esta enzima se indujera en las NGC expuestas al inhibidor glucolítico IAA. Posiblemente dicha inducción estará relacionada con una atenuación del daño generado por ese tóxico.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Cultivos primarios de NGC.

Los cultivos de NGC se obtienen a partir de ratas Wistar de 7 días de nacidas, se extraen los cerebelos, se eliminan las meninges y una vez limpios se cortan en cubos de 300 μm . Se incuban con 0.25 % de tripsina [Sigma] (37° C, 10 min) para disociar el tejido, se detiene la reacción al adicionar una solución con 0.52 % de inhibidor de tripsina [Sigma] y 0.08 % de DNAasa [Sigma] y se centrifuga para continuar con la disgregación mecánica, se realiza una cuantificación de células vivas con azul de tripano [Gibco] en una cámara de Neubauer. Las células obtenidas se resuspenden en medio de cultivo (MC), el cual está constituido de medio basal Eagle [Sigma], 2 mM de L-glutamina [Sigma], 10 % de suero fetal bovino [Gibco] inactivado por calor y 5 U/mL penicilina- 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomycinina [Gibco] y 25 mM de KCl [Baker]. Por último, se siembran 14×10^6 o 6×10^6 células en cajas de 24 pozos o de 60 mm [Costar] tratadas previamente con poli-L-lisina [Sigma] (0.25 mg/mL). El cultivo se mantiene a 37 °C en una atmósfera húmeda de CO₂, 5% y O₂, 95%; 24 horas después se adiciona citosina arabinosa [Sigma] a una concentración final de 10 μM para inhibir la proliferación de células no neuronales, y a las 96 h se agrega glucosa [Sigma] a una concentración final de 5 mM. El cultivo se monitorea con observaciones al microscopio [Nikon] para verificar el desarrollo de las neuronas. A los 9 días DIV se utilizan las células para los diferentes ensayos.

2. Determinación de la citotoxicidad del IAA en NGC.

Para este fin se utilizaron cajas de 24 pozos, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se sustituyó con medio Ringer fresco (pH=7.4, en mM: 134 NaCl, 1.8 CaCl, 5.6 KCl, 20 HEPES, 3.9 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 5.2 glucosa), se adicionó a los cultivos de NGC diferentes concentraciones de IAA [Sigma] (2.5-40 μM), se incubó durante 30 min y se retiró el IAA que fue reemplazado con el medio retirado antes. Las células se incubaron durante 24 horas más para evaluar la viabilidad celular.

3. Determinación de la viabilidad celular.

MTT

Método basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio [Sigma] (MTT) a formazán a través de las deshidrogenas mitocondriales. Se utiliza como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, y por tanto, células viables [Berridge y Tan, 1993]. Pasadas 24 h después de que las células fueron tratadas con el tóxico se agregó MTT al medio (1 mg/mL), se incubó por 1 h a 37°C, se eliminó el medio y se agregó isopropanol ácido al 4% para disolver el formazán; se cuantificó espectrofotométricamente a 570 nm. Se hicieron triplicados de cada condición, los datos obtenidos fueron el promedio de seis experimentos independientes.

Kit Muerte-Vida

Método fluorescente que se basa en la capacidad de las esterasas intracelulares presentes en las células vivas de romper la calceína-AM observándose las células de color verde. Las células que están dañadas se observan de color rojo debido a la entrada del homodímero de etidio que sólo penetra cuando la membrana está dañada, después se une al DNA tiñiendo los núcleos de rojo. Para esta determinación se realizó el tratamiento de las células con las diferentes condiciones: 30 minutos de exposición al IAA, 3h de preincubación con la CoPP y 17 h de reposo antes del tóxico y 15 minutos de preincubación con la SnMP antes del IAA. Se hicieron co-incubaciones de CoPP y SnMP antes de la exposición al IAA con las condiciones anteriormente descritas; a las 24 h posteriores al experimento se emplearon las sondas calceína AM/Homodímero de etidio del kit muerte-vida para células eucariontes [Molecular Probes], se incubaron 20 min a 37°C, se lavaron las células en medio Ringer y se observaron en un microscopio epifluorescente (excitación: 494, 528; emisión: 517, 617; calceína y homodímero de etidio, respectivamente).

4. Determinación del efecto del IAA sobre la expresión de la HO-1 en NGC.

Para determinar el efecto de dicho tóxico en la expresión de HO-1 se realizó en primera instancia una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de IAA 10, 15, 20 y 30 μM , y posteriormente se hizo un curso temporal usando la concentración 20 μM ; fueron usadas cajas de 60x15 mm de diámetro que contenían 6×10^6 células.

A los 9 DIV se adicionó al cultivo el IAA disuelto en medio Ringer fresco, se incubó durante 30 min, posteriormente se eliminó ese medio y se reemplazó con el medio previamente retirado, las células se incubaron durante 24 h. Para realizar el curso temporal se incubaron durante 8, 16 y 24 horas más después de retirar el tóxico, las células fueron raspadas en amortiguador de lisis conteniendo inhibidor de proteasas, se transfirieron a tubo cónico de 1.5 mL y se lisaron por sonicación durante 5 segundos.

Se cuantificó la proteína total por el método de Lowry (1951). Se cargaron 40 μg de proteína en cada pozo de un gel desnaturante de poliacríamida al 12%, se realizó la separación por electroforesis a 100 V durante 2 h. Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa [Amersham] por electroelución en amortiguador de Towbin (20% de metanol) durante 1 h a 400 mA y con agitación magnética en cuarto frío.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en amortiguador PBS y 0.5% de Tween 20, por dos hora. Se usaron los anticuerpos policlonal anti-HO-1 [Stressgen] (1:5000) y como control de carga el monoclonal anti-(α -tubulina [Sigma] (1:4000) y se dejaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno y se colocaron los anticuerpos secundarios, anti-conejo [Amersham] (anti-HO-1) a una dilución de 1:10 000 y el anti-ratón [Amersham] (anti-tubulina) a una dilución de 1:4000, los cuales están acoplados a peroxidasa de rábano; permanecieron por dos horas a temperatura ambiente con agitación moderada. Al final se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno y se procedió a revelar.

La detección se hizo por quimioluminiscencia [Millipore]. Se cuantificó la expresión de HO-1 por densitometría. El nivel de inducción de la HO-1 se expresó como el cociente de HO-1/ tubulina.

5. Determinación del efecto de la CoPP (inductor HO-1), la SnMP (inhibidor HO) y el yodoacetato sobre la viabilidad celular en NGC.

Se usó la CoPP [Frontier Scientific] como inductor de la HO-1, la manera en que se planearon los experimentos para evaluar el efecto sobre la viabilidad fue probar diferentes concentraciones de tóxico solo, y co-incubado con la CoPP.

A los 8 DIV las células fueron expuestas al inductor. Las células se incubaron en medio con 20 μM CoPP por 3 h, pasado ese lapso se eliminó el medio y se adicionó de nuevo el medio retirado previamente; las células se mantuvieron por 14 h en las condiciones de CO_2 / O_2 y temperatura establecidas. El día del experimento se adicionó el tóxico en las concentraciones 10, 15 y 20 μM en medio Ringer, se dejó por 30 min y se desechó, para colocar el medio anteriormente retirado. El cultivo permaneció 24 h más en incubación para finalmente medir la viabilidad celular por MTT.

En cuanto a la SnMP [Frontier Scientific] como inhibidor de la actividad de HO, se procedió de la siguiente manera, a los 9 DIV se pre-incubaron las células con 10 μM SnMP por 15 min en el medio previamente apartado, pasado ese tiempo se desechó ese medio y se adicionó medio Ringer, se agregó el IAA a las concentraciones 10, 15 y 20 μM , se les agregó nuevamente SnMP durante los 30 min de incubación con el tóxico. Concluida la exposición al IAA se eliminó el medio y se colocó el medio que fue retirado antes de la adición del inhibidor, de igual forma se agregó el SnMP, se dejaron incubando las células durante 24 h más para finalmente medir la viabilidad por el método descrito anteriormente. Por otra parte, también se evaluó el efecto sobre la viabilidad con la co-incubación de CoPP-SnMP-IAA. Los protocolos utilizados se ejemplifican en la tabla de abajo en donde se usó 20 μM de IAA, cada condición se realizó por triplicado:

Control	<i>CoPP</i>
IAA	<i>CoPP + IAA</i>
SnMP + IAA	<i>CoPP + SnMP + IAA</i>
SnMP	<i>CoPP + SnMP</i>

6. Determinación del efecto del IAA, la CoPP y la SnMP sobre la actividad de HO.

Para realizar esa determinación se usaron cajas de 60x15 mm de diámetro con 6×10^6 de células por cada una. Se realizó el tratamiento correspondiente, esto es, incubación con CoPP, SnMP, IAA o mezclas de los distintos compuestos, se dejó el tóxico por 30 min en medio Ringer y se adicionó el medio retirado con anterioridad, se dejaron por 24 h más en incubación y se rasparon las células en amortiguador de lisis que contenía inhibidor de proteasas, se sonicaron las células y se midió la concentración de proteína.

Los reactivos necesarios para realizar este método fueron: citosol de hígado de ratón, glucosa-6-fosfato (G6P) [Sigma], glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) [Sigma], β -NADPH [Sigma], hemina [Sigma], amortiguador de fosfatos de potasio con $MgCl_2$ (K-Phos/Mg).

Obtención del citosol de hígado de ratón. El hígado de ratón sin vesícula biliar se homogenizó en amortiguador K-Phos 0.1 M, pH 7.4 y se sonicó ese homogenado por un minuto con un sonicador de punta, se centrifugó a 3000 x g por 5 min a 4°C y se separó el sobrenadante, el cual se volvió a centrifugar a 12000 x g por 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante para ultracentrifugarlo a 100 000 x g por 1 h a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se alicuotó para guardarlo a -70°C, hasta su uso.

Preparación de la “mezcla maestra” de reacción: está mezcla se preparó en fresco y contenía: citosol de ratón, hemina 2 mM, G6P 20 mM, G6PDH 800 U/mL, amortiguador K-Phos/Mg.

Reacción: entre 200-400 μ g de proteína se ajustaron en un volumen de 175 μ L en amortiguador K-Phos/Mg, se adicionaron 50 μ L de la mezcla maestra y 25 μ L de β -NADPH 8 mM preparado en fresco. Se corrieron blancos de la muestra que tenía proteína desactivada por calor. Los tubos con la reacción se dejaron 1.5 h en baño

de agua a 37°C en oscuridad, la reacción se detuvo al adicionar 500 µL de cloroformo, se agitaron para permitir la separación de fases; se debe evitar el contacto directo de la luz con la muestra, con el objetivo de que la bilirrubina formada no se degrade.

Lecturas espectrofotométricas: Se realizó un barrido en las longitudes de onda inicial 550 nm y final 450 nm, los picos fueron 464 y 530 nm. Se usó cloroformo para poner blanco en el espectro y se midió la parte orgánica de cada tubo. Para cuantificar la actividad se realizaron Δ (Abs 464- Abs 530 nm) y posteriormente la resta de Δ muestra- Δ blanco. El coeficiente de extinción molar de la bilirrubina 40 mM⁻¹cm⁻¹ a 464 nm es utilizado para obtener pmoles/mg de proteína/h.

7. Determinación de la presencia de ERO.

La cuantificación de ERO se realizó 4 h después del tratamiento con el IAA sobre las NGC. Las células se lavaron con medio Ringer y se puso 20 µM de 5-(y 6-)carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxi-DCF) [Molecular Probes] por 25 min a 37°C, pasado el lapso se lavaron las células y se observaron en un microscopio epifluorescente (para carboxi excitación 492- 495/ emisión 517-527 nm). El fundamento de esta determinación se basa en el hecho que la carboxi-DCF en presencia de ERO es deacetilada y esa forma oxidada es fluorescente, se produce un color verde que esta en el citoplasma de la célula. Se tomaron fotografías en 5 campos diferentes de una condición y se realizó la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia con un analizador de imágenes NIS element Nikon.

8. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron sometidos al programa Prism 3 para realizar una ANOVA de dos vías, para estudiar simultáneamente dos fuentes de variación- CoPP+IAA vs IAA y SnMP+IAA vs IAA- o de una vía para los resultados restantes, seguida de un análisis de comparación múltiple de Bonferroni o de Dunnett, según fuera el caso; $p \leq 0.05$ se consideró como significativo. Los datos se expresaron en media \pm error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS

◆ *Efecto del IAA sobre la viabilidad celular.*

Para evaluar la toxicidad del IAA en los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo se hizo una curva con concentraciones crecientes del tóxico para ver el cambio en la viabilidad, en un primer experimento se utilizó de 0 a 100 μM y se vio que la muerte de las células era total después de 24 h de exponer a los cultivos a 50 μM , por ello y considerando reportes previos del efecto de IAA sobre cultivos neuronales, se decidió utilizar como concentración máxima 40 μM con lo que se observó un efecto dosis-dependiente de la viabilidad al aumentar la concentración de IAA. La viabilidad celular fue reportada como el porcentaje de reducción de MTT con respecto al control (fig. 1); de este modo se pudo estimar el valor del IC_{50} que fue de $19.3 \pm 0.04 \mu\text{M}$.

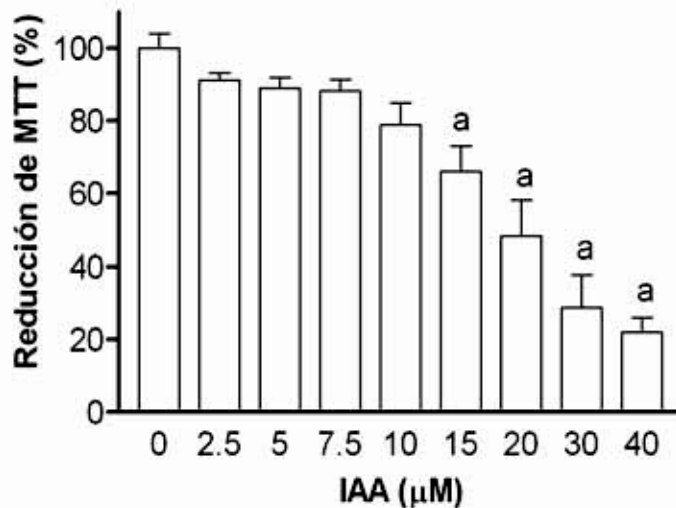


Fig. 1. Curva de la neurotoxicidad del IAA en cultivos de NGC 24 h después del tratamiento con diferentes concentraciones del tóxico. La viabilidad celular se realizó con el método de reducción de MTT. Los datos están expresados como promedio \pm EEM, $n=6$. **a** $p < 0.001$ vs Control. ANOVA de una vía con posterior análisis de Dunnett.

◆ *Expresión de la HO-1 en NGC tratadas con IAA.*

En cuanto a la expresión de HO-1 en cultivos primarios, primero se planteó saber si el tóxico daba una respuesta positiva al aumentar la cantidad de proteína de HO-1. Para ello se adicionaron desde 5 hasta 30 μM de IAA, las células se dejaron 24 h más después del tratamiento. La respuesta obtenida mostró que en concentraciones menores de 10 μM de IAA no había algún cambio en la expresión de HO-1, fue en las concentraciones más altas (20 y 30 μM) donde se vio aumento en la cantidad de proteína (fig. 2), con 30 μM de IAA, la expresión fue de casi cinco veces mayor al control, con lo que se observa una respuesta en la expresión de la HO-1 dependiente de la concentración de IAA.

Se decidió realizar un curso temporal para saber si la inducción de la HO-1 por el IAA depende del tiempo. El contenido de la enzima expuesta a 20 μM de IAA por 30 min, se analizó 8, 16 y 24 h posteriores al experimento; la fig. 3 muestra el western blot obtenido.

A



B

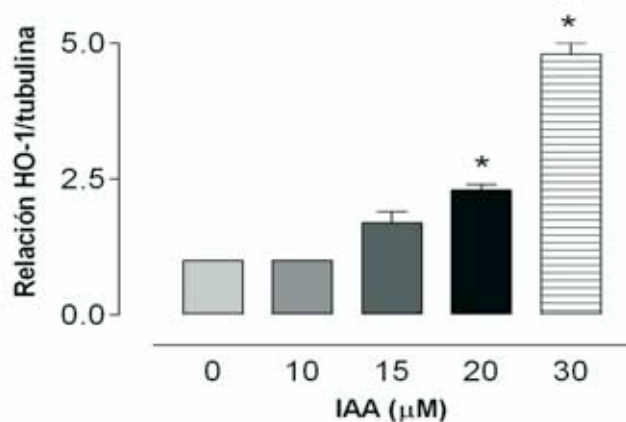


Fig. 2. Western Blot para evaluar los niveles de proteína HO-1 con concentración crecientes de IAA. Los cultivos fueron expuestos a 10, 15, 20 y 30 μM de IAA y 24

h posteriores al tratamiento fue obtenido el paquete celular para el análisis. Se utilizó como estándar de HO-1 [E] una proteína recombinante de rata (32 kDa) y como control de carga α -tubulina (50 kDa), C es control de cultivo. **A**: imagen representativa del efecto del IAA sobre la inducción de la HO-1; **B**: densitometría realizada con 3 experimentos independientes promedio \pm EEM; * $p < 0.001$ vs $0 \mu\text{M}$ de IAA.

A



B

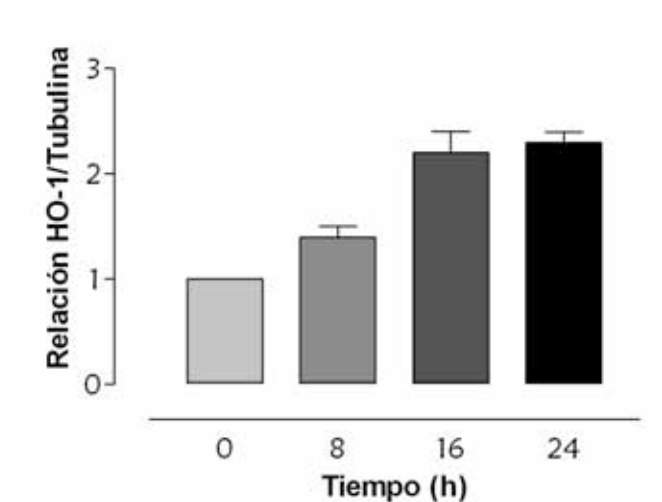


Fig. 3. Western blot para evaluar la inducción de la HO-1 por el IAA respecto al tiempo. Los cultivos fueron tratados media hora con $20 \mu\text{M}$ de IAA y posterior a ello se obtuvo el paquete celular a las 8, 16 y 24 h para su análisis. **A**: imagen representativa de los niveles de inducción, E estándar de HO-1, C control de cultivo. **B**: densitometria realizada con dos experimentos independiente, promedio \pm EEM.

◆ *Efecto de la modulación de la HO-1 sobre la viabilidad celular de NGC tratadas con IAA.*

Para observar el efecto sobre la viabilidad celular al modular el contenido de HO-1, se emplearon tres concentraciones de IAA, y además se hicieron mezclas IAA+CoPP, IAA+SnMP y se evaluó si se exacerbaba la muerte o se

protegían los cultivos tratados con el tóxico (fig. 4). Se observa una marcada tendencia a potenciar la muerte de las células que fueron tratadas con IAA y SnMP en todas las concentraciones de IAA usadas. En cuanto a la modulación positiva de la HO-1, esto es, con la presencia del CoPP como inductor, se mostró un 87 y un 73 % de protección en la viabilidad celular a las concentraciones de 15 y 20 μM de IAA, respectivamente; el valor obtenido a estas concentraciones no fue significativamente diferente del control. Por otro lado, se realizó un ensayo de viabilidad usando un kit de muerte/vida para poder correlacionar los datos obtenidos con el método de MTT (fig 5).

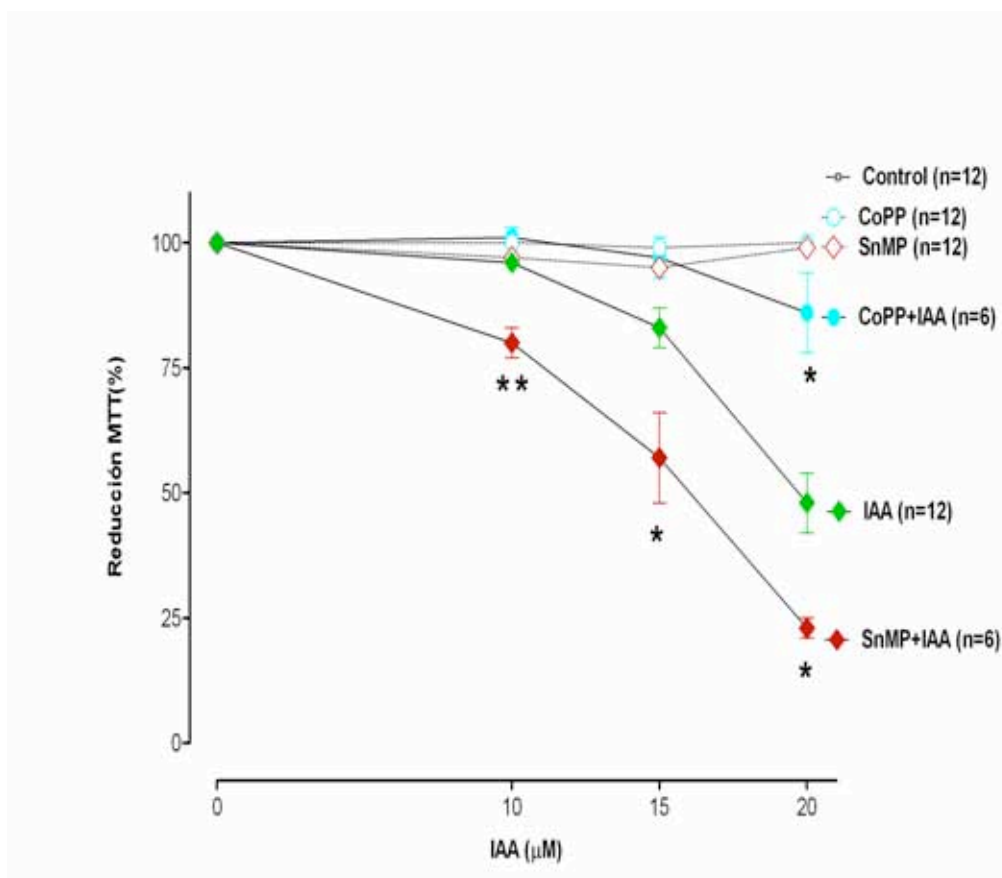


Fig. 4. Efecto de la sobre-expresión (CoPP) e inhibición (SnMP) de la HO-1 sobre la viabilidad celular de las NGC expuestas a IAA. El número de datos se encuentra en la leyenda de la gráfica, los datos están expresados como media \pm EEM. * $p < 0.001$ vs IAA, ** $p < 0.05$ vs IAA, ANOVA de dos vías seguido de un análisis de comparaciones múltiples por Bonferroni.

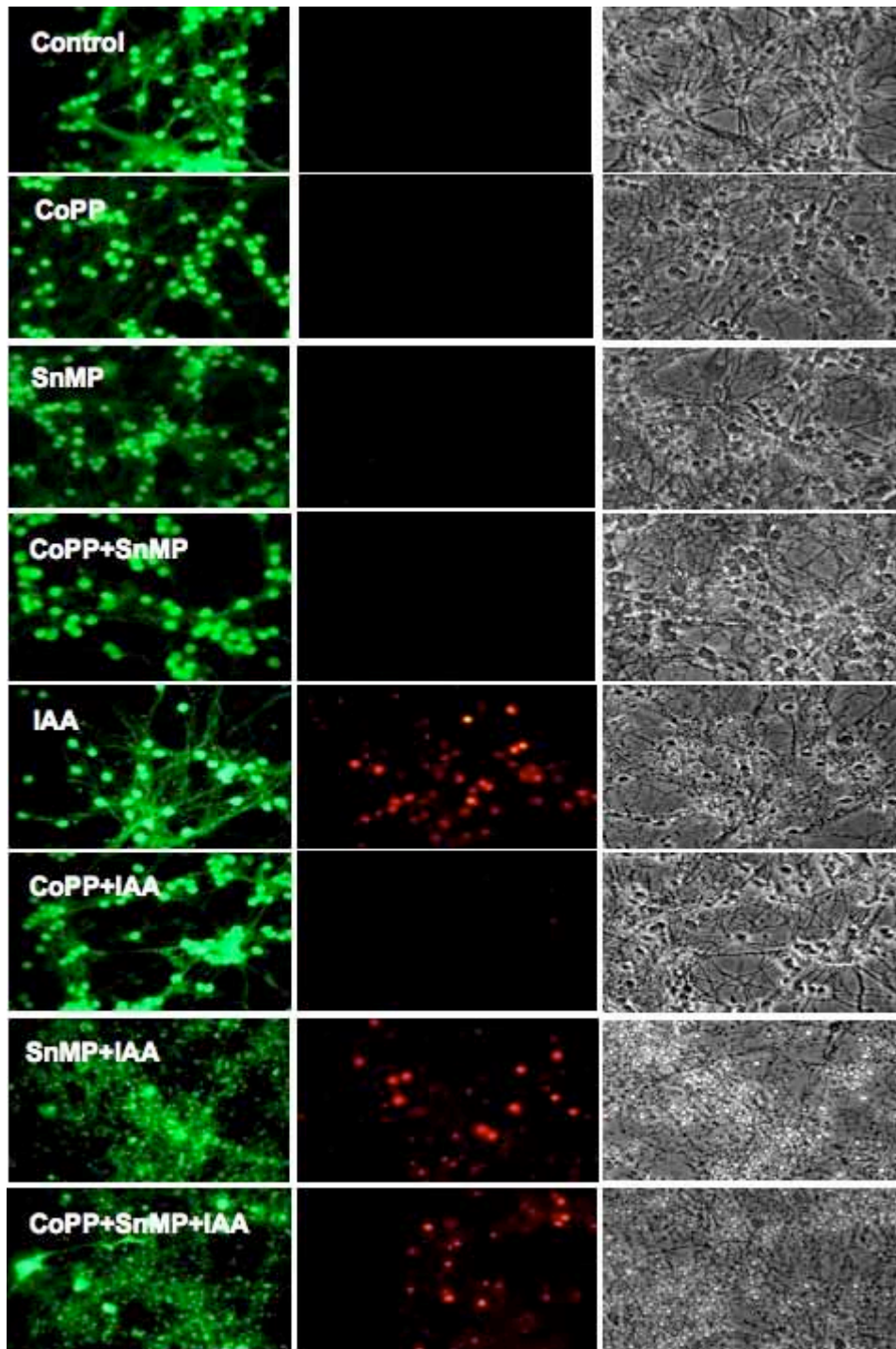
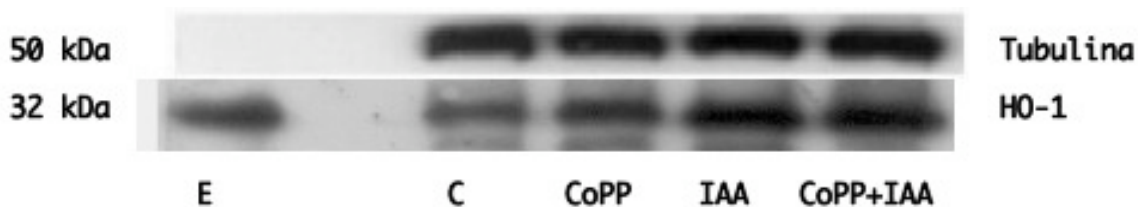


Fig. 5. Fotos representativas del ensayo muerte-vida después de 24 h de haber realizado la incubación con los diferentes compuestos. La sonda fluorescente, calceína, fue usada para marcar las células vivas de color verde en el citoplasma, las células muertas están en color rojo por la presencia del homodímero de etidio intercalado en el DNA. La composición muestra la células vivas, muertas y vistas en campo claro.

◆ *Expresión y actividad de la HO-1 en NGC tratadas con IAA+CoPP.*

Al saber que el IAA inducía un aumento en la cantidad de proteína de HO-1, se quiso averiguar cual era el efecto de la mezcla de CoPP+IAA sobre la expresión, y de esa manera poder dar una explicación en cuanto a la protección observada en la viabilidad celular cuando esos dos compuestos están co-incubados. La fig 6 muestra el western-blot que se encontró de esa determinación 24 h después de haber tratado las NGC con las combinaciones establecidas y los valores de densitometría. El análisis estadístico estableció que hay diferencia significativa en todas las condiciones.

A



B

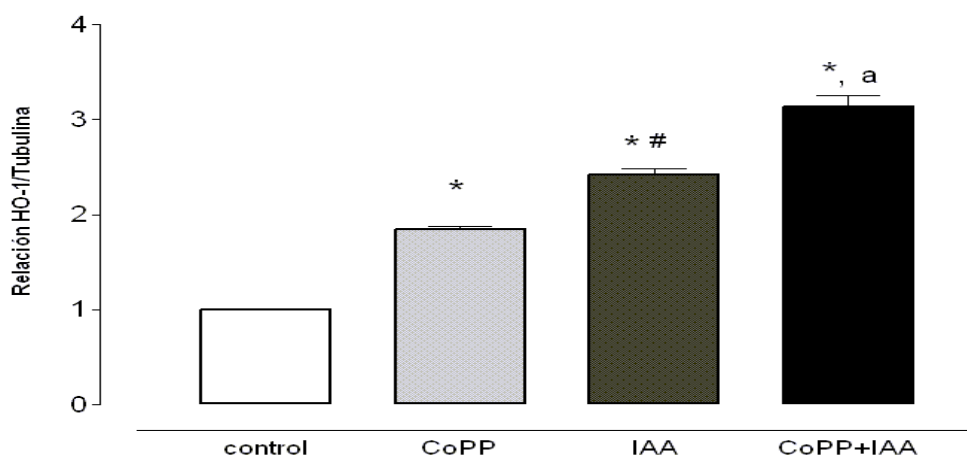


Fig. 6. Western-Blot de la expresión a las 24 h post-tratamiento de la incubación de CoPP+IAA. **A:** imagen de la inducción de HO-1, E: estándar de HO-1; C: control de cultivo; IAA: 20 μ M, por 30 min; CoPP: 20 μ M, pre-incubado 3 h, y después 14 h de reposo antes de adicionar el IAA. **B:** gráfico de la densitometría realizada con cuatro experimentos independientes, promedio \pm EEM. * $p < 0.001$ control vs CoPP, control vs IAA; # $p < 0.001$ CoPP vs IAA; a $p < 0.001$ CoPP vs

CoPP+IAA, IAA vs CoPP+IAA. ANOVA de una vía con posterior comparaciones múltiples por Bonferroni

En cuanto a la actividad de HO se observó que hay un aumento en la cantidad de BR formada cuando son tratadas las células con IAA previa pre-incubación con el CoPP, y que concuerda con el efecto del IAA sobre la expresión, la fig 7 muestra los datos obtenidos.

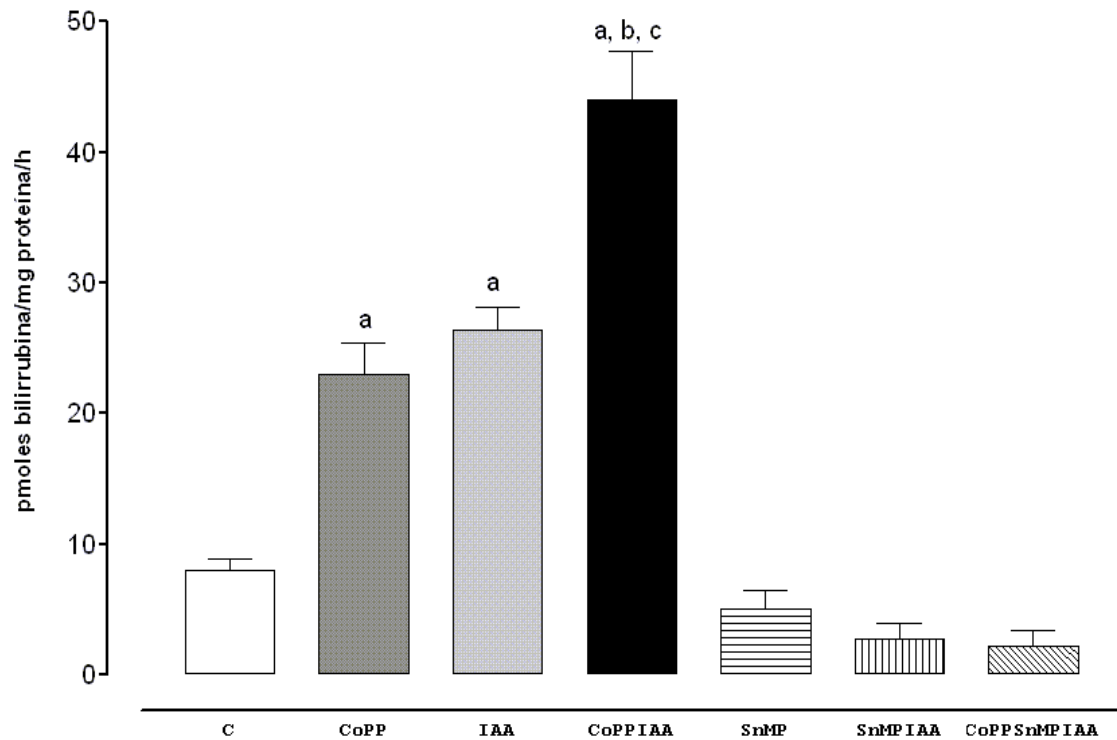


Fig. 7. Actividad de HO, cuantificada como BR formada. Las NGC se dejaron 24 h después del tratamiento. Los cultivos se expusieron 30 min con 20 μ M de IAA, en el caso de SnMP se pre-incubo 15 min previo a la exposición con el IAA, con la CoPP se pre-incubó 3 h y se dejó 14 h en reposo antes de exponer a IAA. Se realizaron 5 experimentos independientes, los datos están expresados como promedio \pm EEM. ANOVA de una vía con subsecuente comparación múltiple por Bonferroni. **a** $p < 0.001$ C vs IAA, C vs CoPP, C vs CoPP+IAA; **b** $p < 0.001$ CoPP vs CoPP+IAA; **c** $p < 0.001$ IAA vs CoPP+IAA.

◆ *Efecto de la viabilidad celular de NGC tratadas con IAA+CoPP, en presencia del inhibidor de la actividad de la HO (SnMP).*

Al modular positivamente la presencia de HO-1 usando un inductor como la CoPP se encontró que hay una protección parcial en la viabilidad celular respecto al valor que muestra el tóxico solo. Por ello, se evaluó cual es el papel de la HO en esa protección, para eso se utilizó la SnMP como un inhibidor de la HO y se determinó en ensayos de viabilidad celular que la protección lograda con la CoPP se evitó al estar presente este inhibidor. En la fig. 8 se muestran los datos de viabilidad celular y la fig. 9 muestra fotos de campo claro representativas de cada condición utilizada en estos ensayos.

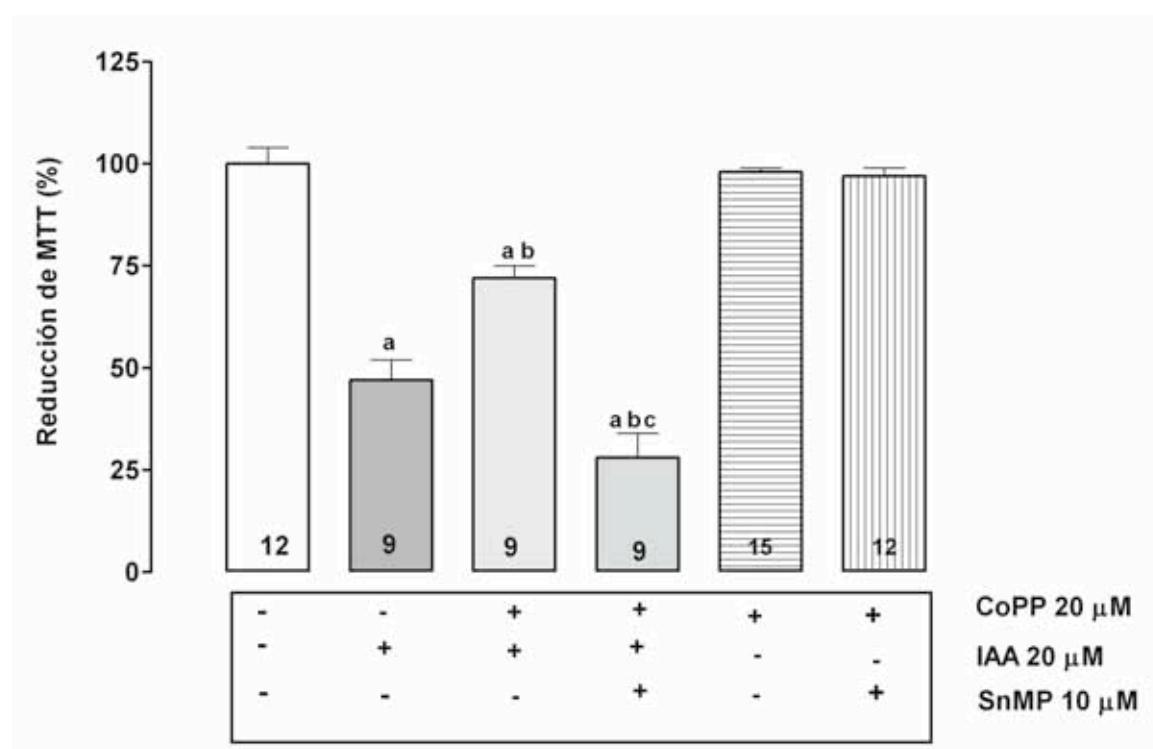


Fig. 8. Efecto de la exposición a diferentes fármacos sobre la viabilidad celular de NGC. Se realizó la exposición a 20 μ M IAA por 30 min, 20 μ M de CoPP preincubado 3 h, con posterior reposo por 14 h antes del IAA y 10 μ M de SnMP preincubada 15 min antes de adicionar el IAA. Se bloqueó la protección encontrada con la CoPP al inhibir la actividad de la HO. El número de datos se encuentra en cada barra, los datos están expresados como promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple por Bonferroni. **a** $p < 0.001$ vs control, **b** $p < 0.001$ vs IAA, **c** $p < 0.001$ vs CoPP+IAA.

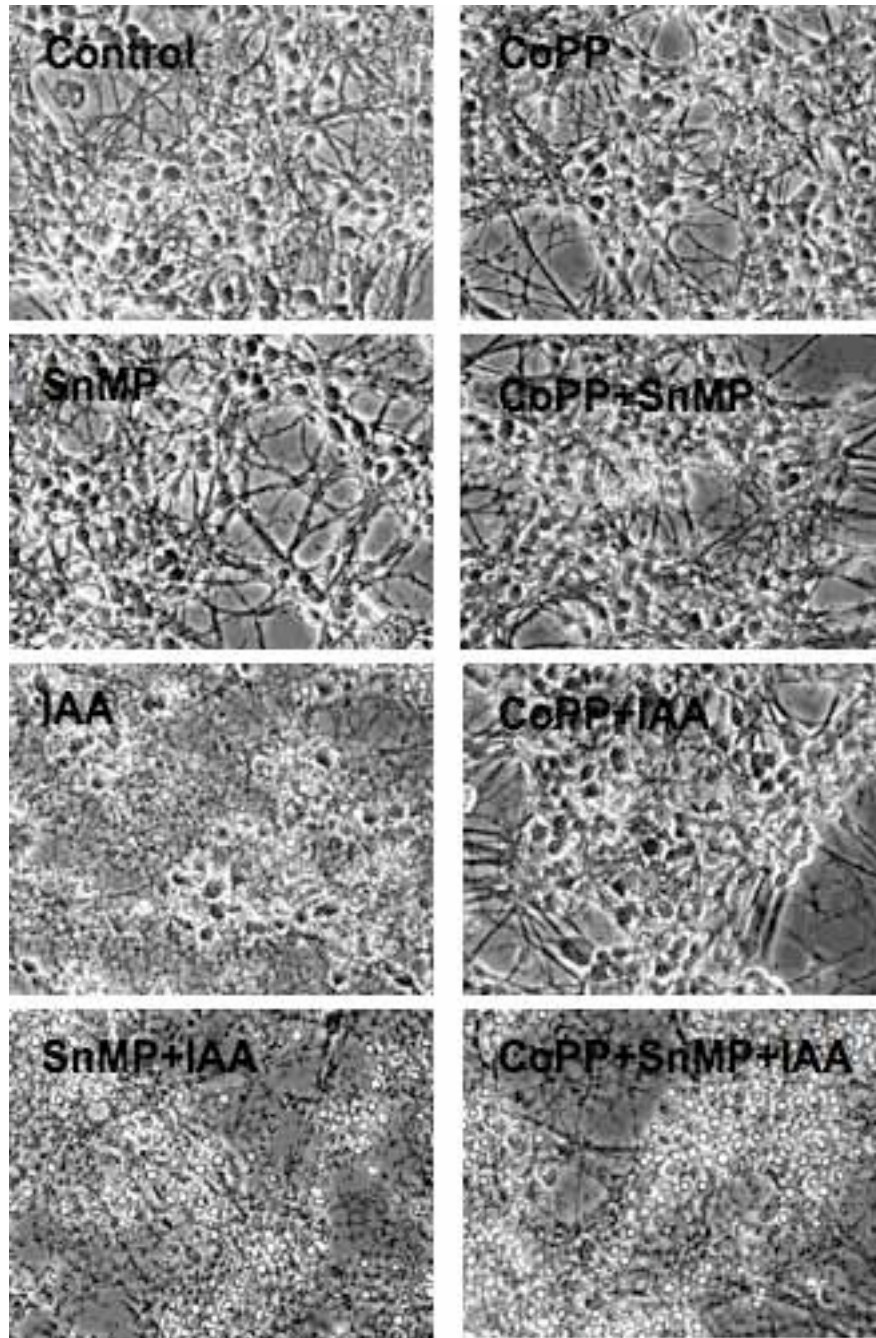
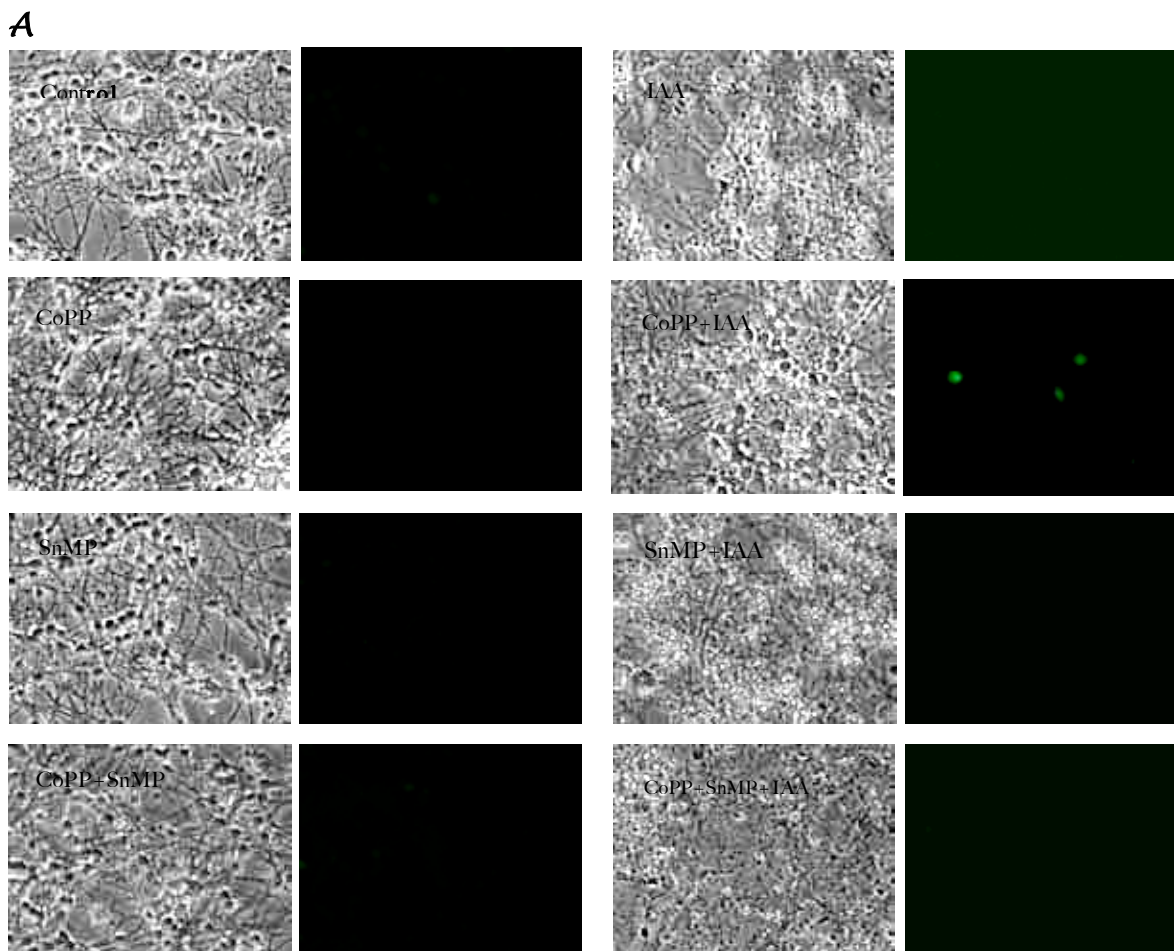


Fig. 9. Fotos representativas de la protección en las células tratadas con CoPP-IAA y la exacerbación del daño por la SnMP.

◆ *Efecto de las ERO en las NGC tratadas con IAA.*

Se sabe que el IAA produce ERO y que antioxidantes como la vitamina E [Uto et al, 1995] abaten el daño generado por el tóxico, en ese sentido se evaluó cual era el papel de la HO-1 como un sistema complejo de respuesta al estrés oxidante, la fig 10 muestra fotos representativas de los efectos que hubo en las NGC cuando fueron tratadas con IAA, SnMP+IAA, CoPP+IAA y CoPP+SnMP+IAA obtenidas al usar una sonda fluorescente (carboxi-DCF), además de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia realizada con un analizador de imágenes.



B

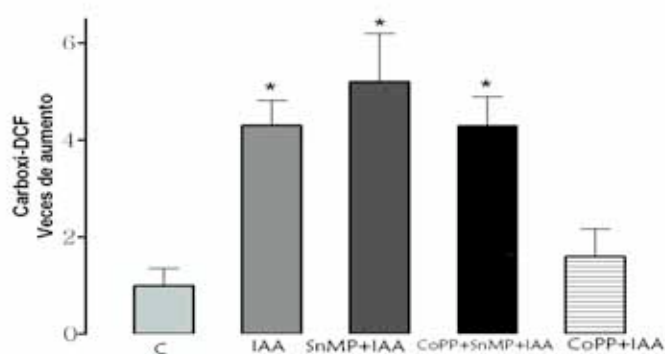


Fig. 10. Cuantificación de las ERO formadas 4h post-tratamiento con 20 μ M de IAA durante 30 min. La CoPP fue pre-incubada 3h con 14 h de reposo antes de exponer al tóxico, la SnMP se pre-incubó 15 min antes de exponer al IAA. **A:** Fotografías representativas de las diferentes condiciones del ensayo, se muestra campo claro y fluorescencia de carboxi-DCF. **B:** cuantificación de la fluorescencia obtenida del tratamiento con los diferentes fármacos. **a** $p < 0.001$ vs control. ANOVA de una vía seguida del análisis de Dunnett.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En condiciones normales del cerebro, la presencia de HO-1 es casi indetectable, con excepción de algunas poblaciones de neuronas olfatorias y de hipocampo [Chen et al., 2003; Parfenova & Leffler, 2008]. Sin embargo, la inducción farmacológica de HO-1 en el cerebro previene del daño cerebrovascular causado por un ataque epiléptico [Parfenova et al., 2005].

La HO-1 es una enzima citoprotectora inducible por estímulos como estrés oxidante, radiación UV, H₂O₂, metales, citocinas, etc. [Otterbein & Choi, 2000]. La sobrerregulación del gen de esta enzima sirve como un mecanismo adaptativo que protege a las células del estrés oxidante [Poss & Tonegawa, 1997].

El estrés oxidante, puede ser causado por un desbalance entre la cantidad de especies reactivas ya sean de oxígeno o de nitrógeno, y la capacidad antioxidante de la célula. El IAA como un inhibidor de la GPDH causa déficit en el metabolismo energético, en primer lugar por inhibir la glucólisis y además por detener el flujo de metabolitos a la cadena respiratoria [Malcolm et al., 2000], y con ello se causa estrés. Aún más, cuando el IAA es administrado in vivo el cerebro pierde la capacidad de sintetizar glutamato y glutamina provenientes de la glucosa, evento fundamental en la consolidación de la memoria en un modelo de pollos [Gibbs & Hertz, 2005].

Sin embargo, hay más de una implicación en el daño energético. Estudios recientes, muestran que en condiciones que mimetizan la hipoglucemia moderada inducida por la administración de 50 μ M de IAA en cultivos de neuronas de hipocampo, se producen ERO de forma dependiente de la presencia de calcio extracelular, pero que en una condición de deficiencia energética severa producida por la exposición a 100 μ M de IAA la producción ERO ya no depende en gran medida de la presencia de calcio [Hernández-Fonseca et al., 2008]. Además, se sabe que algunos

antioxidantes como la vitamina E [Uto et al., 1995] o los cuerpos cétonico [Haces et al., 2008] disminuyen la muerte provocada en condiciones de una falla energética y el estrés oxidante provocados por el IAA.

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que la HO-1 está presente de manera basal en los controles de los cultivos de NGC, a concentraciones bajas de IAA (1-10 μM) no se aumenta la expresión de la HO-1 respecto al control, sin embargo, las concentraciones de 20 y 30 μM , indujeron un aumento en la cantidad de proteína 24 h después del tratamiento (Fig. 2). Este hecho se relaciona con la viabilidad celular de los cultivos de NGC, en donde se determinó que el IAA produce daño con un IC_{50} de 19.3 μM (Fig. 1), y en el análisis de expresión se vio que a 20 μM (concentración de trabajo considerada IC_{50}) los niveles de HO-1 aumentan 2.4 veces con respecto al control. Es interesante notar que la respuesta en la expresión es concentración y tiempo-dependiente del tóxico, pues desde la 8 h se vio un aumento en la expresión de la HO-1 hasta alcanzar el máximo a las 16 h posteriores a la incubación con IAA. El efecto se sostuvo hasta las 24 h (Fig. 3). Los reportes que hay respecto al tiempo de la inducción de la expresión utilizando en su mayoría metales, es de 16 h y a nivel de mRNA a partir de 6 h [Pengfei et al., 2002]. Por lo que estos resultados son acordes con los previamente publicados.

La HO-1 no está presente abundantemente en las neuronas, es más bien, la HO-2, la isoforma constitutiva, la que se presenta mayoritariamente. La pregunta de porqué se necesitan dos isoformas, es aún tema de debate, no obstante, tomando en consideración la caracterización bioquímica de las dos isoformas se cree que HO-1, la cual tienen mayor especificidad por sustrato y su velocidad de reacción es mayor [Maines et al., 1988], y dado que es inducible bajo ciertas condiciones, podría actuar de manera más eficiente durante estrés oxidante. Además se propone para la HO-2 un papel más bien regulador del metabolismo de hemo [Mancuso et al., 2006].

En este sentido se planteó evaluar si la modulación de HO-1 ya sea positiva o negativa promueve la supervivencia de las NGC. Se usaron las concentraciones 10, 15 y 20 μM de IAA solas y en combinación con CoPP o SnMP (Fig. 4). Se observó que el inductor provee protección a todas las concentraciones, aunque sólo en la condición de 20 μM de IAA más CoPP, se tuvo un efecto significativo. Por otra parte, el SnMP exacerbó la muerte que provoca el tóxico solo y ese efecto fue significativo en todas las concentraciones usadas de IAA, estos datos sugieren que la presencia de HO podría ser importante para la sobrevivencia en condiciones de estrés oxidante. La Fig. 5 muestra un método fluorescente que corrobora los resultados mostrados con MTT.

El IAA induce a la HO-1, y combinación con el inductor CoPP tuvieron un efecto significativo, que está relacionado con un aumento en la expresión y en la actividad de la HO-1 (Fig. 6 y 7). Sin embargo, la protección que se había observado con el CoPP+IAA 20 μM , fue bloqueada con la presencia de la SnMP, y aún cuando se pre-incubó a las NGC con CoPP no hubo un efecto benéfico (Fig. 8). Este efecto se vio reflejado en la morfología de las neuronas, pues las células control y las tratadas con CoPP+IAA muestran un soma celular definido con halo birrefringente alrededor y procesos gruesos (Fig. 9), mientras que las células tratadas con SnMP y la co-incubación CoPP+SnMP más el IAA, presentaron pérdida del soma celular, adelgazamiento de procesos y presencia de varicosidades.

Un hecho destacable de los resultados obtenidos, es que a pesar que el IAA induce un aumento considerable en la expresión de la HO-1, los cultivos de neuronas se siguen muriendo, alrededor del 50% de la población está muerta. Sería lógico pensar que al está presente la enzima de forma activa y en gran cantidad se encontraría una protección celular. Por supuesto, este evento se da, pero es hasta tiempos muy tardíos en que la HO-1 es

inducida por el IAA, después de 16 h, su expresión máxima, tiempo en que a la concentración de tóxico utilizada, posiblemente haya un daño progresivo.

Es evidente que, cuando la HO-1 es inducida de manera previa al daño, se obtienen resultados de protección, esto es, lo mostrado con la combinación CoPP+IAA, en donde se obtuvieron valores que no son significativamente diferentes del control. Por ello, sería importante establecer protocolos en los que se lograra inducir a la HO-1 de manera previa antes de enfrentarse con alguna condición que condujera a daño celular.

El mecanismo de acción por el que IAA produce el daño no es de una sola vía, sin embargo, una de las principales es la presencia de ERO que son generadas posiblemente por el déficit energético, pues se ha visto en diferentes modelos que la presencia del IAA aumenta la cantidad de ERO presente, acompañada de eventos que conducen a la muerte celular, como por ejemplo la disminución los niveles de glutatión intracelular, y la presencia de antioxidantes mejora esa condición [Wu et al., Rego et al., 1999, Uto et al., 1995, Malcolm et al., 2000]. La cantidad de enzimas antioxidantes en el cerebro no es muy alta. Se presentan cantidades bajas de las enzimas antioxidantes más comunes: catalasa y de las glutatión reductasa y glutatión peroxidasa [Sirnonianl & Coyle, 1996]; en NGC se observó que dentro de las primeras 6 horas después de exponer a IAA la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-trasferasa y catalasa no disminuyeron a concentraciones micromolares de IAA, sugiriendo que la producción de ERO no se debe a una dismunición de la defensa antioxidante [Cárdenas-Rodríguez, 2008]. Sin embargo, a concentraciones altas de IAA hay inhibición enzimática de catalasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa [Hernández-Fonseca et al., 2008]. En otros estudios in vivo se sugiere que la falla energética producida por el IAA favorece una condición pro-oxidante, y sitúa al daño oxidante como un mediador importante en la excitotoxicidad inducida in vivo [Mejía-Toiber et al., 2006].

En este sentido se evaluó si la presencia de CoPP+IAA tienen un efecto en la producción de ERO. Se observó que hay una cantidad grande de ERO con 20 μ M de IAA, aunque por la sonda utilizada carboxi-DCF no podemos establecer con exactitud cuales son las especies que se producen. Esa cantidad disminuyó dramáticamente con la co-incubación de CoPP. Las ERO que se observaron en presencia del SnMP+CoPP+IAA es de una magnitud similar a la que se vio al incubar solo el IAA (Fig. 10); la cantidad de ERO producida con SnMP+IAA fue mayor que las obtenidas solo con el IAA, sin embargo, este aumento no fue significativo. Posiblemente la capacidad atrapadora de las ERO aumenta cuando la HO-1 esta más activa, y los productos de la reacción catalizada por esta, estén implicados en la disminución de las ERO [Galbraith, 1999]. Evento que concuerda con otros modelo en donde la presencia de HO es conveniente para la defensa del desbalance redox en el sistema celular pues al utilizar SnMP como inhibidor, y CoPP como inductor de la actividad de HO-1 se ha observado exacerbación y protección del daño, respectivamente, en diferentes modelos [Li et al., 2007; Egea et al., 2007].

RESUMEN DE RESULTADOS

- La HO-1 se indujo de forma concentración y tiempo dependiente por el IAA.
- El aumento en la expresión de la HO-1 por la coincubación de CoPP+IAA protegió a los cultivos de NGC del daño causado por IAA.
- La inhibición de la HO, indujo una exacerbación del daño causado por IAA y la coincubación con SnMP+IAA+CoPP bloqueó la protección que se encontró en presencia de CoPP+IAA.
- El efecto protector de la HO-1 sobre la muerte neuronal se asoció con disminución de las ERO inducidas por IAA.

CONCLUSIÓN

La HO-1 es una enzima importante para disminuir la neurotoxicidad y la formación de ERO inducidas por IAA. La alta expresión y actividad de esta enzima, en el momento de la condición de estrés oxidante, determina la protección celular de los cultivos neuronales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham NG & Kappas A. 2005. Heme oxygenase and the cardiovascular–renal system. *Free Radic Biol Med* 39:1–25.
- Ahman Z, Salim M, Maines MD. 2002. Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-binding protein and function in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J Biol Chem.* 277: 9226-9232.
- Ahmad AS, Zhuang H, Doré S. 2006. Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity. *Neuroscience* 141:1703-1708.
- Alam J, Cai J, Smith A. 1994. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gen. Distal 5´ sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem.* 269: 1001-1009.
- Alam J, Camhi S, Choi AM. 1995. Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that function as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *J Biol Chem.* 270:11977-11984.
- Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinopally S, Choi AM, Cook JL. 1999. Nrf2, a Cap'n´Collar transcription factor regulates induction of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* 274: 26071-26078.
- Awasthi Y, Beutler E, Srivastava S. 1975. Purification and properties of human erythrocytes glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 250: 5144-5149.
- Bainbridge SA & Smith GN. 2005. HO in pregnancy. *Free Radic Biol Med* 38:979–988.
- Balla G, Jacobs HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267:18148–18153.
- Barañano DE, Wolosker H, Bae B, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. 2000. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem* 275: 15166-15173.
- Bell JE & Maines MD. 1988. Kinetic properties and regulation of biliverdin reductase. *Arch Biochem Biophys.* 263: 1-9.
- Berridge M & Tan A. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 303:474-482.
- Boldyrev A, Song R, Dyatlov DV, Lawrence DA, Dcarpenter DO. 2000. Neuronal cell death and reactive oxygen species. *Cell Mol Neurobiol* 20:433-450.
- Brüne B & Ullrich V. 1987. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32:497–504.
- Camhi S, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM. 1998. Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5´distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 226-234.
- Cardenas-Rodríguez N. 2008. Neurotoxicidad por yodoacetato en cultivos de neuronas granulares de cerebelo: actividad de enzimas antioxidantes y efecto protector del ácido nordihidroguayarático. Tesis, maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Chen K, Gunter K, Maines MD. 2000. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J Neurochem* 75:304–313.
- Chen J, Tu Y, Moon C, Nagata E, Ronnett GV. 2003. Heme oxygenase-1 and heme

- oxygenase-2 have distinct roles in proliferation and survival of olfactory receptors neurons mediated by cGMP and bilirubin, respectively. *J Neurochem*. 85:1247-1261.
- Cuadrado A & Rojo AI. 2008. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Current Pharma Des* 14: 429-442.
- Dennery PA, Spitz DR, Yang G, Tatarov A, Lee CS, Shegog ML, Poss KD. 1998. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J Clin Invest* 101:1001-1011.
- Egea J, Rosa AO, Cuadrado A, García AG, López MG. 2007. Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase 1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* 102:1842-1852.
- Ewing JF & Maines MD. 1991. Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5364-5368.
- Fahim FA, Esmat AY, Mady EA, Ibrahim EK. 2003. Antitumor activities of iodoacetate and dimethylsulphoxide against solid Ehrlich carcinoma growth in mice. *Biol Res* 36:253-262.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH. 1999. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1:152-157.
- Floy R & Carney J. 1992. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 32:522-527.
- Galbraith R. 1999. Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 222:299-305.
- Gibbs ME & Hertz L. 2005. Importance of glutamate-generating metabolic pathways for memory consolidation in chicks. *J Neuro Res* 81:293-301.
- Goli R & Board P. 1997. Identification of an essential cysteine residue in human glutathione synthase. *Biochem J* 321: 207-210.
- Gores GJ, Flarsheim CE, Dawson TL, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. 1989b. Swelling, reductive stress and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes. *Am J Physiol* 257:347-354.
- Gores GJ, Nieminen AL, Wray BE, Herman B, Lemasters JJ. 1989. Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. *J Clin Invest* 83:386-396.
- Guo Z, Lee J, Lane M, Mattson MP. 2001. Iodoacetate protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative injury: involvement of heat-shock proteins and Bcl-2. *J Neurochem* 79:361-370.
- Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. 2008. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211:85-96.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3a edición, Oxford University Press, Oxford.
- Hansberg W. 2002. *Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico vol XXV*. Facultad de Medicina. UNAM.

- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336:241–250.
- 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.
- Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86:1768–1780.
- Hoffmann B, Hecht HJ, Flohé L. 2002. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383:347–364.
- Inamdar NM, Ahn YI, Alam J. 1996. The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for Maf and NF-E2 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 221:570–576.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katon Y, Oyake T, Hayashi N, Saton K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236:313–322.
- Jeong GS, An RB, Pae HO, Chung HT, Yoon KH, Kang DG, Lee HS, Kim YC. 2008. Cuadraticusxanthone A protects mouse hippocampal cells against glutamate-induced neurotoxicity via the induction of heme oxygenase-1. *Plant Med*
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 338:558–567.
- Kim HP, Wang X, Galbiati K, Ryter SW, Choi AM. 2004. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18:1080–1089.
- Kim HP, Ryter SW, Choi AM. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:411–49.
- Kobe B & Deisenhofer J. 1993. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 366:751–756.
- Kutty R & Maines MD. 1981. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *J Biol Chem* 256:3956–3962.
- Lash LH, Tokarz JJ, Chen Z, Pedrosi BM, Woods EB. 1996. ATP depletion by iodoacetate and cyanide in renal distal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 276:194–205.
- Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, Kim SJ, Chun HS. 2008. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*.
- Li M, Peterson S, Husney D, Inaba M, Guo K, Tereda E, Morita T, Patil K, Kappas A, Ikehara J, Abraham NG. 2007. Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid Redox Signal* 9:855–863.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Maines MD. 1988. Heme oxygenase function, multiplicity, regulatory mechanism, and clinical applications. *FASEB J* 2:2557–2568.
- Maines MD & Gibbs PM. 2005. 30 some years of heme oxygenase: From a “molecular

- wrecking ball” to a “mesmerizing” trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 338:568–577.
- Maines MD. 2005. New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiol* 20: 382–389.
- Malcolm CS, Benwell KR, Lamb H, Bebbington D, Porter RHP. 2000. Characterization of iodoacetate-mediated neurotoxicity in vitro using primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Free Radic Biol Med* 28:102–107.
- Mancuso C, Perluigi M, Ciri C, De Marco C, Guiffrida AM, Calabrese V. 2006. Heme oxygenase and cyclooxygenase in the central nervous system: a functional interplay. *J Neurosci Res* 84:1385–1391.
- Marklund S, Westman N, Lundgren E, Ross G. 1982. Copper-and-zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal tissues. *Cancer Res* 42:1955–1961.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365–378.
- Massieu L, Gómez-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.
- Mattews RT, Ferrante RJ, Jenkins BG, Browne JE, Goetz K, Berger S, Chen Y, Beal MF. 1997. Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesion. *J Neurochem* 69:285–289.
- Mayer RD, Wang X, Maines MD. 2003. Nitric oxide inhibitor N omega-nitro-L-arginine methyl ester potentiates induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: a novel mechanism for regulation of oxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 43–50.
- McCoubrey WK, Jr Huang TJ, Maines MD. 1997. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motif that are involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 272:2568–2574.
- Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. 2006. Role of oxidative stress on β -amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp Neurol* 200:496–508.
- Motterline R, Mann BE, Foresti R. 2005. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investigating Drugs* 14: 1305–1318.
- Mejía-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.* 12:1399–408.
- Nicotera P, Thor H, Orrenius S. 1989. Cytosolic free Ca^{2+} and cell killing in hepatoma 1c1c7 cells exposed to chemical anoxia. *FASEB J* 3:59–64.
- Okado-Matsumoto A & Fridovich I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276:38388–38393.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24:449–455
- Otterbein LE & Choi AM. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:1029–1037.
- Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, Yamamoto M,

- Igarashi K. 1996. Bach proteins belong for a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with Mafk and regulate transcription through the NF-E2. *Mol Cell Biol* 16: 6083-6095.
- Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. 1999. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* 72:1187-1203.
- Parfenova H, Carratu P, Tcheranova D, Fedinec A, Pourcyrous M, Leffler CW. 2005. Epileptic seizures cause extended postictal cerebral vascular dysfunction that is prevented by HO-1 overexpression. *Am J Physiol Heart Physiol* 288:2843-2850.
- Parfenova H & Leffler CW. 2008. Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr Pharm Des* 14:443-453.
- Pengfei G, Stewart D, Hu B, Vinson C, Alam J. 2002. Multiple basic-leucine zipper proteins regulate induction of the mouse heme oxygenase-1 gene by arsenite. *Arch Biochem Biophys* 405:265- 274.
- Poss KD & Tonegawa S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase-1 deficient cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10925-10930.
- Prawan A, Kundu JK, Surch YJ. 2005. Molecular basis of heme oxygenase-1 inductor: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox signal* 7: 1688-1703.
- Rego AC, Areias FM, Santos MS, Oliveira CR. 1999. Distinct glycolysis inhibitors determine retinal cell sensitivity to glutamate-mediated injury. *Neurochem Res* 24: 351- 358.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650.
- Ryter SW & Choi AM. 2005. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal* 7:80-91.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 9: 49-89.
- Salim M, Brown-Kipphut BA, Maines MD. 2001. Human Biliverdin Reductase is autophosphorylated and phosphorylation is required for bilirubin formation. *J Biol Chem* 276: 10929-10934.
- Schipper Hyman M. 2004. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med* 37:1995-2011.
- Shibahara Shigeki. 2003. The heme-oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med* 200:167-186.
- Sirnonianl NA & Coyle JT. 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:83-106.
- Sperling O, Bromberg Y, Oelser H, Zoref-Shani E. 2003. Reactive oxygen species play an important role in iodoacetate induced neurotoxicity in primary rat neuronal culture and differentiated PC12 cells. *Neurosci Letters* 351: 137-140.
- Srisook K, Kim C, Cha YN. 2005. Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: De-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxid Redox Signal* 7: 1674-1687.
- Stevens B & Small RD. 1976. The photoperoxidation of unsaturated organic molecules-XV. O₂ 1Δ g quenching by bilirubin and biliverdin. *Photochem Photobiol* 23:33-36.

- Suzuki H, Muramatsu M, Kojima T, Taki W. 2003. Intracranial heme metabolism and cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 34:2796–2800.
- Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossmann KA. 1995. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J Neurochem* 64:2185–2192.
- Utz J & Ullrich V. 1991. Carbon monoxide relaxes ilial smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 41:1195–201.
- 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-3bB region. *J Biol Chem* 273: 2844-2850.
- Wu Y, Taylor BM, Sun F. 1996. Alterations in reactive oxygen, pH, and calcium in astrocytoma cells during lethal injury. *Am J Physiol* 270: C115-124.
- Yoshida T, Biro P, Cohen TM, Sibahara S. 1988. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *Eur J Biochem* 171:457-461.
- Zámocky M, Janecek S, Koller F. 2000. Common phylogeny of catalaseperoxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* 256:169-182.
- Zimmermann A, Leffler CW, Tcheranova D, Fedinec AL, Parfenova H. 2007. Cerebroprotective effects of the CO-releasing molecule CORM-A1 against seizure-induced neonatal vascular injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2501-H2507.