



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE
LA α -MANGOSTINA

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. LAURA MARÍA REYES FERMÍN

Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

Abril 2011



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.

ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE LA α -MANGOSTINA

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de química, UNAM
Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Rudolph Buijs	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Sandra Espada y del Dr. Antonio Cuadrado del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos con los fibroblastos embrionarios de ratón.

El proyecto fue apoyado parcialmente por donativos de CONACYT 129838 y DGAPA PAPITT IN201910. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día:

El Jurado de Examen de Maestría estuvo integrado por:

Presidente	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Vocal	Dra. Nimbe Torres y Torres
Secretario	Dra. Mahara Angélica Valverde Rodríguez
Suplente	Dra. Gohar Gevorgyan Markosain
Suplente	Dra. María Elena Ibarra Rubio

*Dedico esta tesis a las personas que me quieren
con mis virtudes y mis defectos.*

AGRADECIMIENTOS

A los animales de laboratorio, por dar su vida para el avance de la ciencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química, por permitirme desarrollarme personal y profesionalmente dentro de sus instalaciones.

A mis padres, por todo el cariño y comprensión durante esta etapa de mi vida. Son los mejores ejemplos de vida que tengo.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por una vez más permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por dejarme desarrollarme personal y profesionalmente en su laboratorio.

A mi comité tutorial, Dra. María Eugenia Gonsebatt y al Dr. Rudolph Buijs, por sus comentarios y valiosa asesoría.

Al jurado asignado: Dra. Nimbe Torres, Dra. Mahara Angélica Valverde, Dra. Gohar Gevorgyan y Dra. María Elena Ibarra, por todos sus valiosos comentarios durante la revisión de la tesis.

Al M. en C. Omar Medina, por su asesoramiento técnico y académico.

A Leticia García, por el apoyo brindado y las miles de respuestas a mis preguntas inusuales.

A los chicos del laboratorio 209, por sus innumerables pláticas, ayudas, comentarios y momentos agradables: Marisol, Susy, Quique, Jazmín, Mariel, Azalia, Lalo, Adver y Mario.

A Marisol, Susy y Quique por permitirme acercarme a ellos y brindarme la ayuda que necesitaba en su momento.

A mis alumnitas: Marisol Hdz. y Nadya, por ser parte de sus proyectos y permitirme desarrollar.

La vita si nutre della vita

Índice

Abreviaturas	
Resumen	
1. Antecedentes	1
1. <i>Garcinia mangostana</i> Lin	1
1.1.1. Xantonas	2
1.1.2 α -Mangostina (α M)	2
1.1.2.1 Propiedad antioxidante de la α M	4
1.2 Estrés oxidante, especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante	5
1.3 Hemo oxigenasa	8
1.3.1 Hemo oxigenasa-1	9
1.4 Vía de inducción de genes de enzimas citoprotectoras	10
2. Justificación	13
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
5. Materiales y métodos:	14
5.1 Materiales	14
5.2 Métodos	15
5.2.1 Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC)	15
5.2.2 Cultivo de células derivadas de feocromocitoma de rata (PC12)	15
5.2.3 Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)	16
5.2.4 Western blot	17
5.2.5 Actividad de hemo oxigenasa	18
5.2.7 Viabilidad celular por el método MTT	18
5.2.8 Viabilidad celular por el método FDA	19
5.3 Tratamiento de los cultivos	19
5.4 Análisis estadístico	20
6. Resultados	21
6.1 Efecto de α M sobre la cantidad de HO-1 en NGC	21
6.2 Determinación del factor transcripcional Nrf2 en la inducción de HO-1 por α M	25
6.3 Determinación del efecto de la inducción de HO-1 en la protección por α M frente a 3NP	27
7. Discusión	31
8. Conclusión	35
9. Perspectivas	35
10. Bibliografía	36

Abreviaturas

ABS	Albúmina bovina sérica
αM	α -Mangostina
CAT	Catalasa
Citosina	Citosina β -D-arabinofuranosina
CO	Monóxido de carbon
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNasa I	Desoxirribonucleasa 1
EEM	Error estándar de la media
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Diacetato de fluoresceína
GM	<i>Garcinia mangostana</i> Lin.
GPx	Glutación peroxidasa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
HO	Hemo oxigenasa
HO\cdot	Radical hidroxilo
HO-1	Hemo oxigenasa-1
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH-parecida a Kelch
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MBE	Medio basal Eagle
MEFs	Fibroblastos embrionicos de ratón
MTT	Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NGC	Neuronas granulares de cerebelo de rata
3NP	Ácido 3-nitropropiónico
Nrf2	Factor-2 relacionado a NF-E2
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
O₂$^{\cdot-}$	Radical anión superóxido
ONOO$^-$	Peroxinitrito
PC12	Células derivadas de feocromocitoma de rata
ROO\cdot	Radical peroxilo
SFB	Suero fetal bovino
SnMP	Mesoporfirina de estaño
SOD	Superóxido dismutasa
Tub	α -Tubulina

RESUMEN

Antecedentes. La α -mangostina (α M) es la xantona más abundante de la fruta del árbol del mangostán (*Garcinia mangostana* Lin), el cual se ha usado durante siglos en la medicina tradicional de Asia para el tratamiento de infecciones superficiales, heridas, disentería y diarrea. Se sabe que la α M atrapa especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno y protege del estrés oxidante debido a su capacidad antioxidante. Por otro lado, varios estudios indican que algunos compuestos provenientes de la dieta pueden ayudar a mantener el balance entre la producción de ERO y la defensa antioxidante, manteniendo el equilibrio redox en la célula, debido a que pueden actuar directamente atrapando ERO o bien indirectamente induciendo la expresión de enzimas citoprotectoras como la hemo oxigenasa-1 (HO-1), la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1), la superóxido dismutasa (SOD), entre otras. Dicha inducción es principalmente a través del factor transcripcional factor-2 relacionado a NF-E2 (Nrf2), cuya inducción confiere protección en varios modelos de estudio en respuesta al estrés oxidante. Por otro lado, en un estudio previo en nuestro laboratorio, se demostró que la α M es capaz de atrapar ERO y proteger del daño ocasionado por el compuesto neurotóxico ácido 3-nitropropiónico (3NP) *in vitro*, de manera dependiente de la concentración. Dicha protección se asoció con la disminución en la producción de ERO en neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC). Sin embargo, no se estudió la posible capacidad antioxidante indirecta de la α M, esto es importante ya que se ha demostrado que la inducción de enzimas citoprotectoras ayuda en la prevención y disminución del estrés oxidante. Por lo que si la α M es un antioxidante indirecto, entonces inducirá la expresión de alguna enzima, como la HO-1. Si esto ocurre es posible que el factor transcripcional Nrf2 este involucrado en dicha inducción.

Justificación: Hasta el momento no hay estudios que indiquen que la α M pueda inducir la expresión de enzimas antioxidantes comportándose como un antioxidante indirecto. Por lo que, en este trabajo se estudió si la α M tiene la capacidad de inducir a la enzima HO-1.

Objetivos. Determinar si la α M induce HO-1, y si lo hace, determinar si el factor transcripcional Nrf2 está involucrado.

Diseño experimental: Para determinar si la α M induce HO-1, se utilizaron cultivos de NGC en los que se midió la cantidad de HO-1 y la actividad de HO. La participación del factor transcripcional Nrf2 en la inducción de HO-1, se evaluó utilizando cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) nulos en Nrf2. Con la finalidad de determinar si la inducción de HO-1 tiene un papel en la protección por α M, se realizó una pre-incubación con α M, después de la cual se retó frente a 3NP, adicionalmente se utilizó mesoporfirina de estaño (SnMP), como un inhibidor catalítico de HO.

Resultados: Se demostró que el incremento en la cantidad de HO-1 por α M es dependiente de la concentración y del tiempo de incubación en NGC. El aumento fue significativo a las 24 h de incubación y desde la concentración de 12 μ M de α M (1.7 veces). De una manera similar la incubación con α M aumentó la actividad de HO de manera dependiente de la concentración y del tiempo. El aumento fue significativo en las NGC a las 24 h de incubación desde la concentración de 12 μ M de α M (2.7 veces). Por otro lado, los datos sugieren que la presencia de Nrf2 es necesaria para la inducción de HO-1 por α M, ya que ésta induce la expresión de HO-1 en MEFs Nrf2^{+/+}, aunque no de forma significativa, pero no así en MEFs Nrf2^{-/-}. Por último, la pre-incubación de NGC con α M protege del daño por 3NP (14 μ M de α M, 90% protección), sin embargo este efecto protector se evitó al usar el inhibidor de HO (SnMP, 10 μ M).

Conclusión. Es posible considerar a la α M como un antioxidante bifuncional, ya que además de su capacidad antioxidante directa, en este trabajo se demostró que también puede inducir a la HO-1. Dicha enzima juega un papel central en la citoprotección ante compuestos que generan estrés oxidante, como el 3NP.

Perspectivas. Realizar un estudio *in vivo* para determinar si la α M es capaz de conferir protección frente a algún compuesto neurotóxico, por ejemplo 3NP.

1. Antecedentes

1. 1. *Garcinia mangostana* Lin

El mangostán (*Garcinia mangostana* Lin) (GM) pertenece a la familia Guttiferae, es un árbol tropical conocido en Asia como la “Reina de las Frutas” y se ha cultivado en superficies tropicales como Malasia, Indonesia y Tailandia (Mahabusarakam, 1987; Jung *et al.*, 2006; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008; Yodhnu *et al.*, 2009). La cáscara de la fruta de GM (Figura 1) se ha usado en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones superficiales, heridas, disentería y diarrea (Mahabusarakam *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1995; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008, Márquez-Valadez *et al.*, 2009).

El GM además de otros compuestos, contiene altas concentraciones de xantonas (Ajayi *et al.*, 2007), las cuales son compuestos que presentan propiedades antibacterianas (Sundaram *et al.*, 1983; Sakagami *et al.*, 2005), antiinflamatorias (Chomnawang *et al.*, 2007; Pérez-Rojas, *et al.*, 2009), neuroprotectoras (Weecharangsan *et al.*, 2006; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009), antitumorales (Nabandith *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2006; Suksamrarn *et al.*, 2006; Akao *et al.*, 2008) y antioxidantes (Garcia *et al.*, 2005; Weecharangsan *et al.*, 2006; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009), entre otras.

Además de usarse en la medicina tradicional, el GM también se ha utilizado en la industria cosmética y productos farmacéuticos (Yodhnu *et al.*, 2009).



Figura 1. Fruto del mangostán.

1.1.1. Xantonas

El término xantona (del griego *xantos*= amarillo) designa a un grupo de compuestos químicos cuya estructura base es dibenzo- γ -pirona (Roberts, 1961). Estos compuestos son metabolitos secundarios encontrados en plantas superiores, hongos y líquenes.

Su estructura se compone de un sistema aromático de tres anillos (Figura 2) el cual se puede sustituir con una gran variedad de grupos funcionales (Walker, 2007), lo que da lugar a 5 grandes grupos: (a) xantonas simples oxigenadas, sustituidas generalmente con grupos hidroxilo, metoxilo o metilo; (b) xantonas glicosiladas, tienen un residuo de glucosa, xilosa, arabinosa, etc.; (c) xantonas preniladas, tienen un grupo prenilo y constituyen el mayor número en la naturaleza) y sus derivados; (d) xantolignoides, y (e) xantonas misceláneas (Vieira y Kijjoa, 2005; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008).

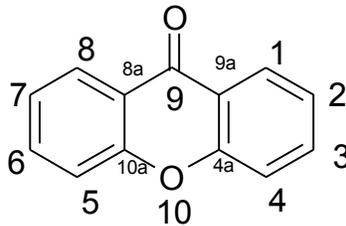


Figura 2. Estructura de la dibenzo- γ -pirona.

De las xantonas encontradas en GM la α -mangostina es la xantona que se encuentra en mayor concentración en la cáscara de la fruta (Jung *et al.*, 2006; Suksamrarn *et al.*, 2006; Walker, 2007).

1.1.2 α -Mangostina (α M)

La α -mangostina (α M) (Figura 3) es un compuesto cristalino de color amarillo brillante, ópticamente inactivo, punto de fusión de 182-183°C (Yates y Stout, 1958; Ee *et al.*, 2006), peso molecular de 410 ^g/_{mol} (Kondo *et al.*, 2009) y soluble en una gran variedad de solventes orgánicos (Yu *et al.*, 2007). La α M se aisló por primera vez de la cáscara

de la fruta por Schmid en 1855 con un rendimiento del 30-50% (Schmid, 1855; Yates y Stout, 1958) y en 1968 se dilucidó su estructura (Yates y Bhat, 1968). Recientemente se informó que la concentración de α M en la cáscara seca de la fruta madura e inmadura es 3.14 ± 0.25 y $4.38\pm 0.10\%$ (p/p), respectivamente (Pothitirat y Gritsanapan, 2008).

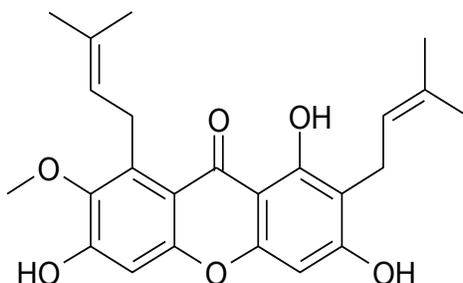


Figura 3. Estructura química de la α -mangostina.

El máximo de absorción de la α M es a 240 nm. En estado sólido es estable a la luz ultravioleta (pico de intensidad 254 y 366 nm, 6 h), calor (80°C , 3 h) y condiciones hidrolíticas básicas (NaOH 3N, 80°C , 3 h), pero es sensible a la degradación por condiciones oxidativas (H_2O_2 3%, 80°C , 3 h) y de acidez hidrolítica (HCl 3N, 80°C , 3 h) (Yodhnu *et al.*, 2009).

En un estudio de digestión simulada de la cáscara de la fruta de GM, se determinó que la recuperación de α M después de la digestión es cercana al 90% y que el transporte celular es aproximadamente del 70% y dependiente de las sales biliares, sugiriendo que el transporte de α M aumenta durante la etapa prandial, alcanzando la concentración intracelular máxima en una hora (Bumrungpert *et al.*, 2009). Además, en este estudio se encontró la primera evidencia de generación de metabolitos secundarios de α M de fase II. Por otra parte, personas que consumieron un producto que contenía GM, α M y jugo de frutas, alcanzaron la máxima concentración de α M de 3.12 ng/mL en plasma a la hora de ingesta (Kondo *et al.*, 2009).

La α M tiene gran interés en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que se ha sugerido que es responsable de diversas actividades biológicas como las siguientes: fungicida (Kaomongkolgit *et al.*, 2009), antitumoral (Matsumoto *et al.*, 2004),

antiinflamatoria (Pérez-Rojas *et al.*, 2009) y antioxidante (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009), entre otras.

1.1.2.1 Propiedad antioxidante de la α M

La α M es una xantona que posee propiedades antioxidantes tanto *in vitro* como *in vivo*. La primera evidencia de esta propiedad fue la protección del daño de lipoproteínas de baja densidad (LDL) debida a la generación de radical peroxilo (ROO^\bullet) (Williams *et al.*, 1995). También, se observó que el uso de α M disminuye el consumo de α -tocoferol, que normalmente se consume para evitar la oxidación de LDL (Williams *et al.*, 1995; Mahabusarakam *et al.*, 2000).

Posteriormente se descubrió que la α M puede actuar como antioxidante directo, ya que es capaz de atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO) como radical hidroxilo (HO^\bullet), anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Phuwapraisirisan *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009), especies reactivas de nitrógeno (ERN) como peroxinitrito (ONOO^-) (Jung *et al.*, 2006; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009) y radicales libres sintéticos como el 1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH) (Phuwapraisirisan *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

Además, la α M es capaz de conferir protección frente a compuestos que generan estrés oxidante, por ejemplo, al inhibir con una CI_{50} de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ los efectos de 7,12-dimetilbenzo[α]antraceno, el cual provoca lesiones preneoplásicas en cultivo mamario de ratón. En un estudio en ratas se encontró que la α M protege de la lipoperoxidación, del daño cardíaco y restablece los niveles de la defensa antioxidante que disminuyen por la administración de isoproterenol (Devi Sampath y Vijayaraghavan, 2007). Adicionalmente, la α M previene la muerte neuronal y la producción de ERO producidos por ácido 3-nitropropiónico (3NP) en neuronas granulares de cerebelo de rata (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009). Esta xantona también, es capaz abolir el daño oxidante causado por FeSO_4 , un agente excitotóxico (quinolinato) y una toxina mitocondrial (3NP) en homogenados de cerebro y en la fracción P2 sinaptosomal (Márquez-Valadez *et al.*, 2009).

Debido a su capacidad antioxidante, la α M protege del daño renal inducido por cisplatino. Dicho efecto se asoció con la atenuación del estrés oxidante y nitrante y preservación de la actividad enzimática de catalasa (Pérez-Rojas *et al.*, 2009). En un estudio en células epiteliales renales LLCPK1 se evaluó la protección de la α M en la apoptosis inducida por cisplatino y se encontró que la α M disminuye la muerte celular, el incremento de ERO, la depleción de glutatión (GSH) y el incremento en la expresión de p53 (Sánchez-Pérez *et al.*, 2010).

También, se ha determinado la capacidad antioxidante de α M en humanos, mediante el ensayo de capacidad de absorber radical de oxígeno (ORAC), el cual aumenta 18% después de 2 h de la ingesta de un jugo comercial que contiene GM y α M (Kondo *et al.*, 2009).

De igual manera, se ha explorado la funcionalidad de los grupos hidroxilo y prenilo de la α M en la capacidad antioxidante y se determinó que los grupos hidroxilo de los carbonos 3 y 6 son importantes en la actividad antioxidante, ya que cuando se sustituyen con derivados aminoetilo la actividad antioxidante mejora y cuando se sustituyen con metilo, acetato o nitrilo la actividad antioxidante se reduce (Mahabusarakam *et al.*, 2000).

Esta y otras propiedades de la α M la definen como un prometedor antioxidante, por lo que, al haber pocos estudios en cerebro y debido a que en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata se demostró su efecto protector resulta interesante caracterizar el potencial antioxidante de la α M en cerebro. Uno de los objetivos de este trabajo se centró en determinar el efecto protector de la α M frente a 3NP en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata.

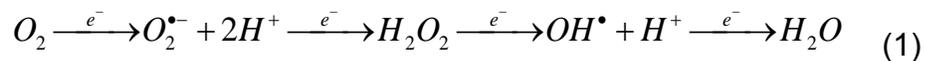
1.2 Estrés oxidante, especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante

Alteraciones en el metabolismo celular, excitotoxicidad y estrés oxidante provocado por la formación de ERO pueden estar acompañados por una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y alteraciones fisiológicas (Márquez-Valadez *et al.*, 2009).

El estrés oxidante se define como la pérdida del balance entre la producción de ERO y la defensa antioxidante, dando como resultado daño en los constituyentes celulares del organismo. Las consecuencias del estrés oxidante son: (a) incremento en la proliferación celular, (b) adaptación, por ejemplo la sobre-regulación de las defensas antioxidantes, (c) daño celular, por ejemplo daño a macromoléculas, (d) senescencia y, por último, (e) muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La formación de ERO y ERN se reconoce como un mecanismo importante de daño celular en diversas enfermedades, como son las neurodegenerativas, ya que estas especies pueden afectar la estructura y función de macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Una de las principales formas de generar ERO se da mediante la reducción univalente del oxígeno (Reacción 1), en la cual, desde la aparición del primer intermediario, el $O_2^{\bullet-}$, se generan ERO. El $O_2^{\bullet-}$ puede oxidar los centro [Fe-S] de algunas enzimas, por ejemplo las deshidrogenasas, pero no puede atravesar fácilmente las membranas celulares (Fridovich, 1995).



Reducción univalente del oxígeno.

La reducción de $O_2^{\bullet-}$ da como producto el segundo intermediario, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede atravesar fácilmente las membranas celulares y a su vez reaccionar con $O_2^{\bullet-}$ en presencia de metales de transición mediante la reacción de Haber-Weiss generando radical OH^{\bullet} .

El OH^{\bullet} es el tercer intermediario de la reducción univalente del oxígeno, y se considera como uno de los compuestos más oxidantes en la naturaleza debido a su vida media corta y alta reactividad.

Adicionalmente, el $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con otros radicales como el óxido nítrico (NO^{\bullet}) dando como producto $ONOO^-$, considerado entre las ERN como un oxidante muy poderoso que induce nitración de tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad (Eberhardt, 2000; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Debido a la formación normal de ERO y ERN, el organismo cuenta con un sistema de defensa celular, para prevenir el daño provocado por dichas especies mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, de los cuales se hablará a continuación:

La defensa antioxidante se define en dos grandes grupos: (1) defensa antioxidante no enzimática y (2) defensa antioxidante enzimática. Algunos ejemplos de la defensa antioxidante no enzimática endógenos y exógenos son: el GSH, algunas vitaminas, los compuestos carotenoides y los compuestos polifenólicos.

El GSH, es un importante antioxidante endógeno, en su forma reducida protege los grupos -SH de las proteínas y puede reaccionar directamente con H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet y ONOO^- (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Algunas vitaminas como la vitamina C (ácido ascórbico) o vitamina E, las cuales desempeñan funciones importantes en el organismo, pueden atrapar $\text{O}_2^{\bullet-}$ y ROO^\bullet (Dikalov *et al.*, 2008; Wang y Quinn, 1999). Los compuestos polifenólicos, que se consumen en la dieta, pueden atrapar ERO y algunos de ellos son quelantes de iones metálicos (Zou *et al.*, 2004; Sies *et al.*, 1992). Los compuestos carotenoides, son compuestos liposolubles que pueden reaccionar con $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet y O_2^1 (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

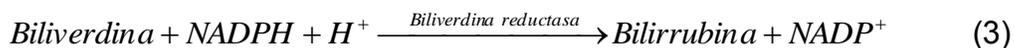
Algunos ejemplos de defensa antioxidante enzimática son la familia de enzimas superóxido dismutasas (SODs) las cuales catalizan la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 (Fidrovich, 1995). La enzima catalasa (CAT) que cataliza la reducción de H_2O_2 a agua. La enzima glutatión peroxidasa (GPx) que remueve el H_2O_2 a agua acoplado a la reducción de GSH y la enzima glutatión reductasa (GR) que reduce el glutatión oxidado. También, entre éstas están las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos (compuestos químicos exógenos) ya que muchos de éstos se conjugan con GSH por medio de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) (Halliwell y Gutteridge, 2007). La enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1; DT-diaforasa), es una flavoenzima que cataliza la reducción en un solo paso de quinonas a hidroquinonas, evitando la formación de intermediarios que pueden dar lugar a la formación de ERO (Asher *et al.*, 2006). Un último ejemplo es la HO-1, la cual degrada el grupo hemo, compuesto

pro-oxidante, a monóxido de carbono y biliverdina, la cual se convierte posteriormente a bilirrubina, con propiedades antioxidantes (Jung y Kwak, 2010).

Se ha demostrado que algunos compuestos provenientes de la dieta pueden prevenir el daño provocado por el estrés oxidante, mediante la activación de varios mecanismos de protección incluyendo el atrapamiento de ERO y ERN o bien mediante la inducción de enzimas antioxidantes (Surh *et al.*, 2008). Existen numerosos reportes acerca de la reducción en la incidencia de enfermedades degenerativas por el consumo de vegetales o frutas, debido a la presencia de dichos compuestos antioxidantes (Kondo *et al.*, 2009).

1.3 Hemo oxigenasa

La hemo oxigenasa (HO) se localiza principalmente en el retículo endoplásmico, en asociación con la NADPH citocromo P450 reductasa, cataliza el paso limitante en la reducción del grupo hemo a biliverdina, hierro y monóxido de carbono (CO) (Reacción 2) (Schipper *et al.*, 2009). La biliverdina posteriormente se convierte a bilirrubina por la enzima bilirrubina reductasa en el citosol (Reacción 3). Finalmente, la bilirrubina es conjugada por la UDP-glucuronil transferasa y después excretada por la bilis (Stevenson *et al.*, 2000; Abraham y Kappas, 2008). Existen diversas evidencias que indican que la HO tiene un papel central en el mecanismo de defensa antioxidante y anti-inflamatorio (Yamamoto *et al.*, 2010).



Reacción de HO en la degradación del grupo hemo.

En mamíferos existen dos isoformas de HO, la HO-1 y la HO-2, las cuales son codificadas por genes distintos y presentan diferente peso molecular, distribución en tejidos y regulación genética. La expresión de HO-1 es inducible por un gran número de estímulos de estrés, esto se debe probablemente al amplio número de secuencias de

unión al ADN que existen en la región regulatoria 5' del gen *Hmox1*, lo cual permite la unión de factores transcripcionales que regulan su transcripción. Además de los efectos benéficos por la degradación del grupo hemo, el cual es un compuesto pro-oxidante, se generan moléculas activas con propiedades antioxidantes. También, se ha demostrado que la expresión o sobreexpresión de HO-1 puede proveer de acciones terapéuticas, por ejemplo, en la retención de trasplantes de hígado y corazón en ratas (Soares *et al.*, 2009). La HO-2, es la isoforma no inducible de HO, se encuentra en varios tejidos de manera constitutiva y controla la degradación basal del grupo hemo (Stevenson *et al.*, 2000; Abraham y Kappas, 2008). Por otra parte, los productos de la degradación del grupo hemo ejercen un amplio rango de actividades biológicas; por ejemplo, el CO ejerce propiedades vasodilatadoras, antiapoptóticas y citoprotectoras, la liberación de hierro (Fe^{2+}) promueve una mayor síntesis de la cadena pesada de ferritina, y la bilirrubina se considera un buen antioxidante ya que es capaz de atrapar ROO^{\bullet} , radical alquilo (RO^{\bullet}) y ácido peroxinitroso (ONOOH), de inhibir la lipoperoxidación y de proteger a células contra el daño producido por H_2O_2 (Sikorski *et al.*, 2004).

1.3.1 Hemo oxigenasa-1

La HO-1 (EC 1.14.99.3) es una proteína de 289 aminoácidos y tiene peso molecular de 32.6 kDa en ratas. El gen *Hmox1* presenta una región regulatoria con sitios de unión para proteína activadora 1 (AP1), proteína activadora 2 (AP2), factor nuclear kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$), factor inducible por hipoxia (HIF), factor transcripcional factor-2 relacionado a NF-E2 (Nrf2), así como secuencias consenso de proteínas de choque térmico, elementos de respuesta a metales, y elementos de respuesta a estrés oxidante. Esto indica que la inducción del gen *Hmox1* es sensible a un gran número de pro-oxidantes y estímulos inflamatorios como: grupo hemo, péptido β -amiloide, dopamina, H_2O_2 , hiperoxia, luz UV, metales pesados y ONOO^- , entre otros (Alam *et al.*, 1994; Schipper *et al.*, 2009; Sikorski *et al.*, 2004). Se estima que la vida media del transcrito de ARNm y proteína de HO-1 es de 3 y 15-21 h, respectivamente (Dennerly, 2000; Schipper *et al.*, 2009).

Estudios recientes indican que la HO es degradada vía ubiquitinación y degradación proteosomal, siendo la ligasa RING-E3 la encargada de la ubiquitinación de HO-1 (Lin *et al.*, 2008); además, el uso de un inhibidor proteosomal aumenta la cantidad de proteína y transcrito de HO-1 pero no así de HO-2 (Yamamoto *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que la sobre-regulación del gen de HO-1 está muy relacionado con la citoprotección (Kirkby y Adin, 2006; Orozco-Ibarra *et al.*, 2009).

1.4 Vía de inducción de genes de enzimas citoprotectoras

Uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante celular lo constituye la inducción de enzimas antioxidantes o de detoxificación de xenobióticos, que se activan por una variedad de estímulos naturales y sintéticos (Giudice *et al.*, 2010). Estas enzimas corresponden a las enzimas de fase I y fase II. Las primeras llevan a cabo la primer reacción con los xenobióticos, principalmente a través de enzimas citocromo P450, las cuales introducen grupos funcionales en las moléculas orgánicas hidrofóbicas convirtiéndolas en moléculas más polares. Por otro lado, las enzimas de fase II son las responsables de la eliminación de xenobióticos, debido a la formación de metabolitos conjugados usando moléculas hidrofílicas como GSH y ácido glucurónico. Las enzimas de fase II se pueden clasificar en cuatro diferentes categorías: (1) enzimas de conjugación clásica, como GST; (2) enzimas que contribuyen al reciclamiento y biosíntesis de grupos tiol, como GR; (3) enzimas relacionadas con la reducción de intermediarios reactivos, como NQO1; (4) proteínas de respuesta a estrés, como la HO-1 (Jung y Kwak, 2010). Recientemente se ha usado el concepto “antioxidante indirecto”, para referirse a los antioxidantes que aumentan la capacidad antioxidante celular debido al incremento en la expresión de los genes relacionados (Jung y Kwak, 2010).

Una de las principales vías de inducción de enzimas de fase II es la vía de señalización de la proteína 1 asociada a ECH-parecida a Kelch (Keap1)/Nrf2/ARE. Esta vía se utiliza para la detección de electrófilos tanto endógenos como exógenos y está implicada en la respuesta celular a agresiones pro-oxidantes y electrofílicas (Ade *et al.*,

2009), ya que se induce por compuestos oxidantes, electrofílicos o xenobióticos (Stewart *et al.*, 2003).

En condiciones normales, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por la unión a la proteína Keap1, proteína anclada a actina, siendo blanco de ubiquitinación y degradación proteosomal manteniendo bajos los niveles de Nrf2 (Figura 4). Bajo ciertas condiciones, por ejemplo, la exposición a compuestos electrofílicos o ERO, provocan la disociación de Nrf2 de Keap1 (Niture *et al.*, 2010), debido a la activación de señales relacionadas con la fosforilación y/o modificación de residuos de cisteína de Keap1, inhibiendo así el complejo de ubiquitina ligasa E3 Keap1 Cul3-Rbx1 (Giudice *et al.*, 2010).

La alteración de la interacción Nrf2-Keap1 permite la traslación de Nrf2 al núcleo, donde se une a diferentes elementos de respuesta en asociación con otros factores de transcripción (Maf, ATF4, JunD, PMF-1, entre otros) y activa la transcripción de genes citoprotectores (Tan *et al.*, 2009; Tasset *et al.*, 2010) relacionados con la conjugación de electrófilos, excreción de xenobióticos, atrapamiento de ERO y estabilización del potencial redox, siendo las enzimas de fase I y II las responsables de dicha citoprotección (Niture *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la inducción de enzimas de fase II confiere protección frente a compuestos o metabolitos reactivos y ERO. Esto se debe a que el Nrf2 puede transactivar a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) o elementos de respuesta a electrófilos (EpRE) (Giudice *et al.*, 2010). La unión de Nrf2 a ARE aumenta la transcripción de genes que codifican para enzimas como NQO1, GST, HO-1, SOD, CAT, GPx y GR, entre otras (Alam *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2007; Khor *et al.*, 2008). Estas enzimas pueden actuar individual o colectivamente en la detoxificación de xenobióticos, restaurando proteínas oxidadas, manteniendo los equivalentes reducidos e inhibiendo la generación de ERO (Stewart *et al.*, 2003).

Después de que la homeostasis celular se restaura, Keap1 se dirige al núcleo para disociar a Nrf2 de ARE, una vez en el citoplasma Nrf2 es degradado y se da por terminada la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE (Giudice *et al.*, 2010).

Diversos compuestos electrofílicos, incluyendo aquellos derivados de plantas, como son los derivados polifenólicos (curcumina, resveratrol, etc.) provocan una respuesta de defensa antioxidante (Chen *et al.*, 2006). Ejemplo de estos son el sulforafano (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010) y el ácido nordihidroguayarático (Guzmán-Beltrán *et al.*, 2008) que confieren protección frente a un reto oxidante debido a la traslación de Nrf2 al núcleo y el consecuente incremento en la expresión de enzimas citoprotectoras (Chen *et al.*, 2006).

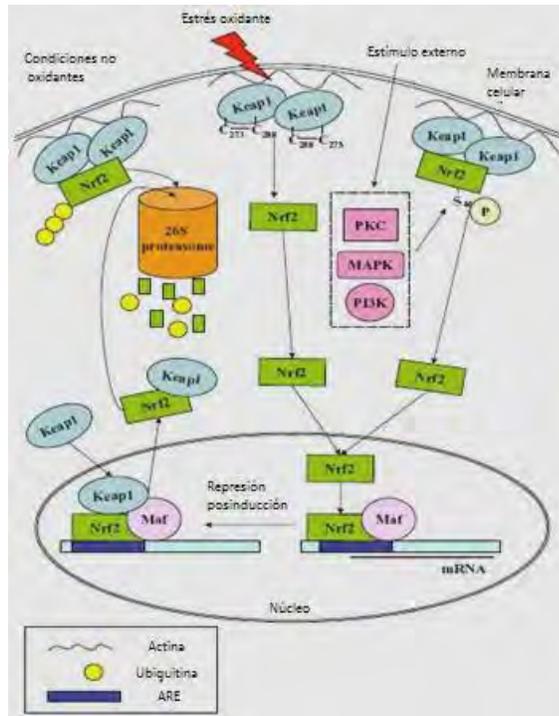


Figura 4. Mecanismo propuesto para la activación de Nrf2. En condiciones normales de homeostasis, Nrf2 es retenido en el citoplasma vía interacción con Keap1 y degradado vía degradación proteosomal. En condiciones de estrés oxidante, se provoca la formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas de Keap1. Por otro lado, los estímulos externos pueden inducir la activación de proteínas cinasas responsables de la fosforilación de Nrf2 y disociación de Keap1. Por último, Keap1 puede sufrir un lanzamiento nuclear-citoplasmático provocando la disrupción de la interacción Nrf2/ARE (Bellezza *et al.*, 2010)

2. Justificación

Hasta el momento no hay estudios que indiquen que la α M pueda inducir la expresión de enzimas antioxidantes comportándose como un antioxidante indirecto. Por lo que en este trabajo se investigó si la α M tiene la capacidad de inducir la enzima HO-1, debido a que es una enzima típica de fase II.

3. Hipótesis

Si la α M es un antioxidante indirecto, entonces inducirá la expresión de alguna enzima de fase II, como la HO-1. Si la α M induce la HO-1, es posible que ésta y el factor transcripcional Nrf2 estén involucrados en el mecanismo de acción de la α M.

4. Objetivos

Objetivo general

Determinar si la α M se comporta como un antioxidante indirecto, que induzca la expresión de HO-1, que es una enzima clásica de respuesta de fase II en cultivos celulares.

Objetivos específicos

- Determinar si el tratamiento con α M induce un aumento en los niveles de HO-1 en neuronas granulares de cerebelo de rata.
- Determinar si el factor transcripcional Nrf2 está involucrado en la inducción de HO-1 por α M.
- Si la α M induce HO-1, determinar el efecto que tiene ésta en la citoprotección de la α M frente a 3NP.

5. Materiales y métodos:

5.1 Materiales

La α M usada se aisló de la manera previamente descrita (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009). Las células derivadas de feocromocitoma de rata (PC12) se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). La tripsina, la desoxirribonucleasa-1 (DNasa I), el medio Basal Eagle (MBE), el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), la L-glutamina, la gentamicina, la poli-L-lisina, la citocina- β -D-arabino-furanosina (citocina), la glucosa, el suero fetal de caballo, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el dimetil sulfóxido (DMSO), el anticuerpo anti α -tubulina (Tub), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la glucosa 6 fosfato (G6P), la hemina, la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato forma reducida (NADPH), el diacetato de fluoresceína (FDA), el ácido 3-nitropropiónico (3NP) y los reactivos para la electroforesis se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El KCl se adquirió de Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). El medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el inhibidor de tripsina de soya, el azul tripano, el suero fetal bovino (SFB) y la penicilina/estreptomicina se adquirieron de Gibco (Gaithersburg, MD, USA). La mesoporfirina de estaño (SnMP) se adquirió de Frontier Scientific Inc. (Logan, UT, USA). El anticuerpo policlonal anti HO-1 (Cat SPA-895) se adquirió de Assay Design (Ann Arbor, MI, USA). Los anticuerpos secundarios de burro anti-conejo IgG o cabra anti-ratón IgG acoplados a peroxidasa de rábano se adquirieron de Amersham (Chiltern district, Buckinghamshire, England). El anticuerpo anti-Nrf2 (C20), el anticuerpo anti- β -actina, el anticuerpo secundario de burro anti-cabra IgG acoplado a peroxidasa de rábano se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, U.S.A.). Los demás reactivos usados son de grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente.

5.2 Métodos

5.2.1 Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC)

Se utilizaron cultivos primarios de (NGC) porque un estudio realizado en nuestro laboratorio demostró que la α M confiere protección en un modelo de co-incubación frente a 3NP.

Las NGC se obtuvieron del cerebelo de ratas de la cepa Wistar de 7 días de nacidas de la manera previamente descrita (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009). Para esto, se retiraron los cerebelos y se libraron de meninges, luego se machacaron y se incubaron con una solución que contenía 0.25% de tripsina por 10 min a 37°C. El tejido se disoció por trituración usando una solución que contenía 0.08% de DNasa1, 0.52% inhibidor de tripsina de soya y se disgregó mecánicamente usando una malla de poliéster. Las células aisladas se resuspendieron en MBE suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 90 U/mL de penicilina, 90 μ g/mL estreptomycin, 50 μ g/mL de gentamicina y 25 mM de KCl. El número de células vivas se determinó mediante el método de exclusión de azul tripano (0.4%). Las células se sembraron a una densidad de 310 a 320 x 10³ células/cm² en placas marca Costar pretratadas con poli-L-lisina (5 μ g/mL), se mantuvieron en una atmósfera con 5% de humedad y con 5% CO₂ a 37°C. D después de 24 h se trataron con citosina (10 μ M) con el fin de prevenir el crecimiento de células no neuronales, y a los 4 días *in vitro* (DIV) se adicionó glucosa a una concentración final de 5 mM. Las neuronas para los experimentos se usaron de 8-9 DIV. Mediante este método se sabe que se obtiene más del 95% de neuronas granulares (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009).

5.2.2 Cultivo de células derivadas de feocromocitoma de rata (PC12)

Debido a la morfología de las NGC, no se pudieron realizar todas las determinaciones en éstas células, por lo cual se probó una línea celular que dada su morfología pudiera ayudar a realizar algunos experimentos para determinar la participación de Nrf2.

Aunque no se logro el objetivo, se observó que en este tipo celular también existe inducción de HO-1 por α M.

Las células PC12 son una línea celular derivada de feocromocitoma (tumor de células cromafines de médula adrenal) de rata (Greene y Tischler, 1976). Las células se sembraron en medio DMEM suplementado con 7.5% de SFB y 7.5% de suero de caballo, 20 μ g/mL de penicilina, 20 μ g/mL estreptomycin y 40 μ g/mL de gentamicina. Se mantuvieron en cajas Petri de 60 ó 100 mm de diámetro en una atmósfera de O₂ al 95% y CO₂ al 5% a 37°C. La tripsinización se realizó con tripsina recombinante Tryple Express cuando las células alcanzaron 90-100% confluencia. Las células se contaron mediante el método de exclusión de azul tripano (0.4%) usando una dilución 1:5.

Los experimentos se realizaron a una densidad de $16 \times 10^6/\text{cm}^2$ (35 000 células por pozo) en cajas de 96 pozos, los tratamientos se realizaron cuando las células estaban en confluencia, 24 h después. Cuando se alcanzó del 90-100% de confluencia se retiró el medio suplementado y se reemplazó con medio DMEM suplementado con 1% de sueros, 24 h antes de iniciar el tratamiento.

5.2.3 Cultivo de fibroblastos embriónicos de ratón (MEFs)

Debido a que los ratones nulos en Nrf2 se han usado para demostrar el papel de éste en la regulación de los genes que contienen la secuencia ARE, en respuesta a estímulos exógenos. Se decidió utilizar el cultivo primario de MEFs, ya que se cuenta con los ratones nulos en Nrf2.

Los ratones para la preparación de los MEFs se obtuvieron del laboratorio del Dr. Ken Itoh (Japón). Los MEFs silvestres y nulos para Nrf2 se prepararon según el protocolo previamente descrito (Nioi *et al.*, 2003) a partir de embriones de ratones C57BL/6 de 13.5 días de vida. Las células se sembraron en medio DMEM con 10% de SFB y 2 mM glutamina, 200 U/ml de penicilina y 0.2 mg/ml de estreptomycin. Se mantuvieron a 37°C de temperatura y 5% de CO₂.

Los experimentos con MEFs se realizaron en el departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

5.2.4 Western blot

Las NGC se sembraron en cajas de 60x15 mm, después de los tratamientos las células se lisaron con amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) con 1% de tritón e inhibidor de proteasas. Las células se sonicaron durante 7 s a la mínima velocidad (sonicador Fisher Scientific modelo XL-2000), y el contenido de proteína se cuantificó mediante el método de Lowry. Se cargaron 30 µg de proteína de cada muestra en un gel SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membranas de nitrocelulosa (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009).

En el caso de las células PC12 primero se obtuvo el botón celular, para lo cual las células se rasparon con PBS y se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 s (centrífuga de mesa Beckman modelo Microfuge E). Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en amortiguador de lisis.

Posteriormente las membranas de nitrocelulosa se incubaron con 5% de leche libre de grasas en amortiguador salino de fosfatos (pH 7.4) con 0.1% de Tween-20 (PBS-T) por 1 h. Se realizaron tres lavados con PBS-T, para después incubar con los anticuerpos: anti HO-1 1:2000, anti-Tub 1:5000 en albúmina bovina sérica (ABS) al 0.4% en PBS-T. Las membranas se lavaron y se incubaron con peroxidasa de rábano conjugada anti-conejo producido en burro o anti-ratón IgG producido en cabra, en una dilución 1:10000 y 1:7000, respectivamente en ABS 0.4% en PBS-T.

La quimioluminiscencia se detectó con el estuche de detección Amersham ECL acorde con las instrucciones del fabricante y el análisis densitométrico se realizó mediante el software Jimage 1.43.

5.2.5 Actividad de hemo oxigenasa

La actividad de HO se determinó mediante el método previamente descrito (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009). Las células se sembraron en cajas de 60x15 mm, después de los tratamientos las células se lisaron con amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) con 1% de tritón e inhibidor de proteasas. Las células se sonicaron 7 s a la mínima velocidad y se centrifugaron a 10 000 x g/ 4°C/ 20 min. El contenido de proteína se determinó mediante el método de Lowry. La mezcla de reacción se utilizó en fresco, la cual contenía citosol de ratón (fuente de biliverdina reductasa), hemina 2 mM, G6P 20 mM, G6PDH 800 U/mL y amortiguador de fosfatos de potasio con magnesio. La reacción se realizó con 100 µL de suspensión celular, 125 µL de amortiguador de fosfatos de potasio con MgCl₂, 50 µL de la mezcla de reacción y 25 µL de NADPH 8 mM fresco. Se incubó a 37°C durante 1.5 h. Para detener la reacción se adicionó cloroformo y se extrajo la bilirrubina formada. El blanco consistió en inactivar las muestras con calor y realizar el procedimiento anteriormente descrito. Para la cuantificación de bilirrubina se usó la fase orgánica y se realizó un barrido de 550 a 450 nm, usando las lecturas encontradas a 465 y 530 nm, la bilirrubina formada se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(\Delta Abs_{muestra} - \Delta Abs_{blanco})}{40mM^{-1}cm^{-1} \times 1cm \times mg_{proteína} \times h} \times Vol_{suspensión}(L) \times 1 \times 10^6 = pmol/mg\ proteína/h$$

5.2.7 Viabilidad celular por el método MTT

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante el método de MTT descrito inicialmente por Mosmann (1983). Dicho método se basa en la reducción de una sal de tetrazolio, MTT, de color amarillo a formazán de color púrpura por deshidrogenasas mitocondriales (Berridge y Tan, 1993).

El MTT se adicionó al cultivo celular a una concentración final de 0.144 mM por 1 h a 37°C. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y el formazán formado se disolvió con isopropanol ácido (4% de HCl 1M). La cuantificación se realizó a una

λ de 570 nm en el espectrofluorómetro Synergy HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, EUA), los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad, reducción del MTT, respecto al control.

5.2.8 Viabilidad celular por el método FDA

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la tinción con fluoresceína, la cual se forma a partir de la desesterificación de FDA por células vivas (Yan *et al.*, 1994). Las células se lavaron dos veces con PBS a 37°C para después incubar con 24 μ M de FDA por 5 min seguido de dos lavados con PBS frío.

La intensidad de fluorescencia se determinó en el espectrofluorómetro Synergy HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, EUA). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad, intensidad de fluorescencia.

5.3 Tratamiento de los cultivos

- ❖ Tratamiento con α M en la determinación de la inducción de HO-1 en NGC.

La determinación se realizó utilizando diferentes concentraciones de α M de 4 a 14 μ M por 24 h y diferentes tiempos de incubación a la concentración de 12 μ M en NGC, 4-24 h. También, se realizó en células PC12 utilizando concentraciones de 2.5 a 8 μ M de α M por 24 h.

La α M se disolvió en 10% de DMSO y amortiguador de fosfatos. La inducción de HO-1 se evaluó por Western blot y la actividad de HO se determinó acorde a los procedimientos previamente descritos.

- ❖ Papel del factor transcripcional Nrf2 en la inducción de HO-1 por α M.

Se utilizaron MEFs silvestres o nulos en Nrf2 para evaluar la inducción de HO-1, gen blanco de Nrf2 y para determinar si éste factor transcripcional está relacionado con la inducción de HO-1. Para esto, los MEFs se incubaron con 0.1 y 0.3 μ M de α M por 6 h.

❖ Determinación del efecto de HO-1 en la protección de la α M frente a 3NP.

Un primer tratamiento consistió en realizar una co-incubación con α M, SnMP y 3NP. La finalidad de este experimento fue el determinar si la HO tenía un papel en el efecto protector de la α M como un experimento preliminar. Ya que previamente demostramos que en el modelo de co-incubación con α M y 3NP, la α M protege.

Un segundo tratamiento consistió en la pre-incubación en NGC, por 16 h con α M, para posteriormente adicionar 2 mM de 3NP por 3 h y 24 h después medir la viabilidad celular. Con la finalidad de determinar si el tratamiento con α M tenía un efecto protector frente al 3NP.

En un esquema similar se utilizó SnMP 10 μ M media hora antes de la adición de 3NP y durante todo el experimento, para determinar si la HO estaba involucrada en la protección por α M.

5.4 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM) y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía seguido de una prueba de Dunnett. Los valores se consideraron significativamente diferentes con una $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Efecto de α M sobre la cantidad de HO-1 en NGC

En un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, se determinó que la co-incubación con α M frente al neurotóxico 3NP protege de la disminución de la viabilidad celular y la producción de ERO desde la concentración 6 μ M y hasta la concentración 12 μ M de α M (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009).

En la figura 5, se muestra el efecto protector de la α M (6 o 12 μ M) en el mismo modelo de co-incubación frente a 3NP. En la gráfica del panel A, se observa que el 3NP disminuye la viabilidad celular. Esta disminución se evita al co-incubar a las NGC con 6 μ M de α M, pero resulta interesante el uso de SnMP, ya que se pierde el efecto protector de la α M y la muerte celular por 3NP se exagera.

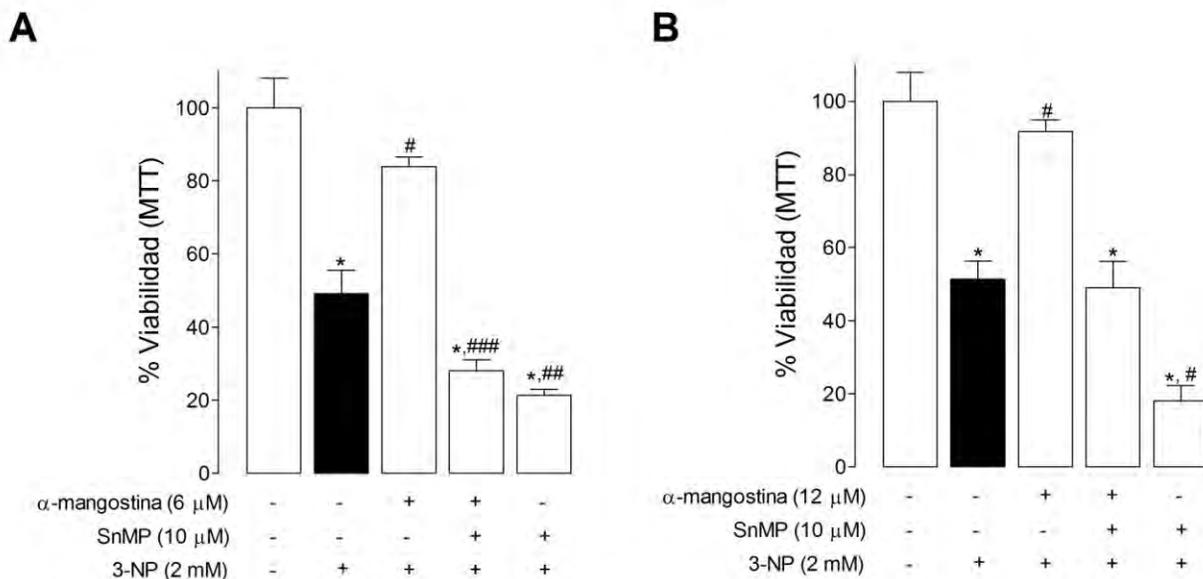


Figura 5. Efecto protector de la co-incubación de α M 6 μ M (A) y 12 μ M (B) con 3NP en NGC. Las NGC se trataron 30 min antes de la adición de 3NP (2 mM por 2 h) con α M y SnMP, posteriormente se adicionó el tóxico y después de 2 h de incubación el 3NP se retiró del medio, y se adicionó nuevamente α M y SnMP. La viabilidad celular se determinó 24 h después del tratamiento, mediante el método de MTT. Los resultados se presentan como promedio \pm EEM. *P<0.001 vs control; #p<0.001, ##p<0.01, ###p<0.05 vs 3NP.

De manera similar, el uso de SnMP y 3NP exagera la muerte celular comparado con el tratamiento de 3NP. Esto nos sugiere que la HO juega un papel importante en la respuesta al daño, pero que probablemente la cantidad de HO no es suficiente para evitar la muerte por 3NP, en las condiciones establecidas. Este efecto se refleja de igual manera al usar la concentración 12 μM de αM (Panel B, Figura 5).

Lo anterior nos sugirió que la protección conferida por αM es a través de HO, ya que la protección se evita al usar SnMP. Para comprobar que la αM estuviera induciendo HO, se decidió estudiar a la HO-1, la cual confiere protección en diferentes modelos de estudio cuando se induce y/o se sobreexpresa. Por lo cual, se evaluó la cantidad de HO-1 por western blot usando concentraciones crecientes de αM en cultivos primarios de NGC (Figuras 6 y 7). Se probaron concentraciones crecientes de αM (4-14 μM) por 24 h.

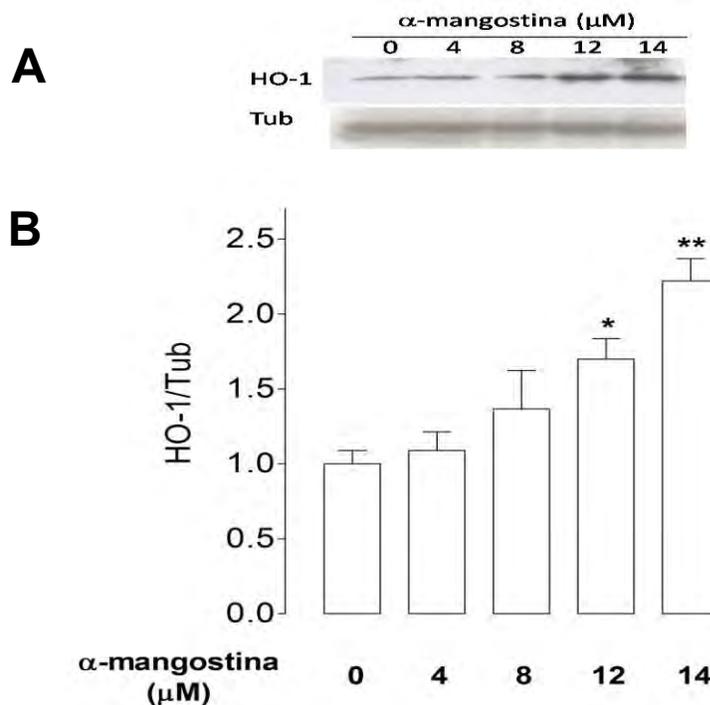


Figura 6. Niveles de HO-1 en NGC tratadas con concentraciones crecientes de αM (4-14 μM) por 24 h en NGC de 9 DIV. (A) Se presenta una imagen representativa del blot (B) así como el análisis densitométrico de las bandas. La cantidad de HO-1 se corrigió por la cantidad de tubulina (Tub). Los datos se presentan como promedio \pm EEM, n=3-4. *P<0.001 y **p<0.05 vs control.

Como se observa en la figura 6, existe una ligera inducción de HO-1 desde la concentración 8 μM , aunque este incremento sólo es significativo a las concentraciones 12 y 14 μM . A la concentración 12 μM el incremento representa un aumento de 1.7 veces y de 2.2 veces a la concentración de 14 μM de αM (Figura 6).

Para saber si la inducción de la HO-1 por αM era dependiente del tiempo, se decidió realizar un curso temporal de 4 a 24 h usando la concentración de 12 μM , ya que desde esta concentración se observa inducción de HO-1 (Figura 6). En la figura 7 se observa que el incremento en la cantidad de HO-1 también es dependiente del tiempo, ya que desde las 8 h de incubación con αM se observa un ligero incremento de HO-1 aunque sólo es significativo hasta las 24 h de incubación.

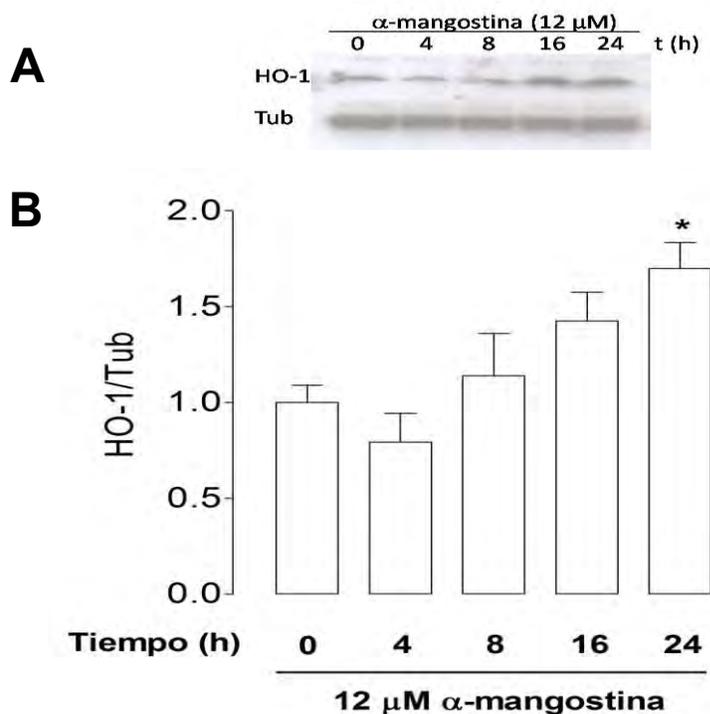


Figura 7. Expresión de HO-1 en NGC con 12 μM de αM a diferentes tiempos (4-24 h) en NGC 9 DIV. (A) Se presenta una imagen representativa del blot (B) así como el análisis densitométrico de las bandas. La cantidad de HO-1 se corrigió por la cantidad de tubulina (Tub). Los datos se presentan como promedio \pm EEM, n=3-4.*P<0.001 vs control.

De igual manera, encontramos que la inducción de HO-1, es dependiente de la concentración en células PC12. Para esto se realizó un western blot a las concentraciones de 2.5, 5, y 8 μM de αM por 24 h. Observamos un incremento de proteína desde la concentración de 2.5 μM de αM (datos no presentados). Estos resultados indican que la αM aumenta la cantidad de HO-1 de manera dependiente de la concentración y del tiempo, en al menos dos diferentes tipos celulares.

Para demostrar que la αM no sólo induce un incremento en la cantidad de HO-1, sino que éste es consistente con el incremento en la actividad de HO, se procedió a determinar la actividad enzimática de HO al cuantificar la bilirrubina formada. Se encontró, efectivamente, que el tratamiento de las NGC con αM aumenta la actividad de HO de forma significativa a las concentraciones 12 y 14 μM de αM de 2.7 y 2.6 veces, respectivamente (Figura 8).

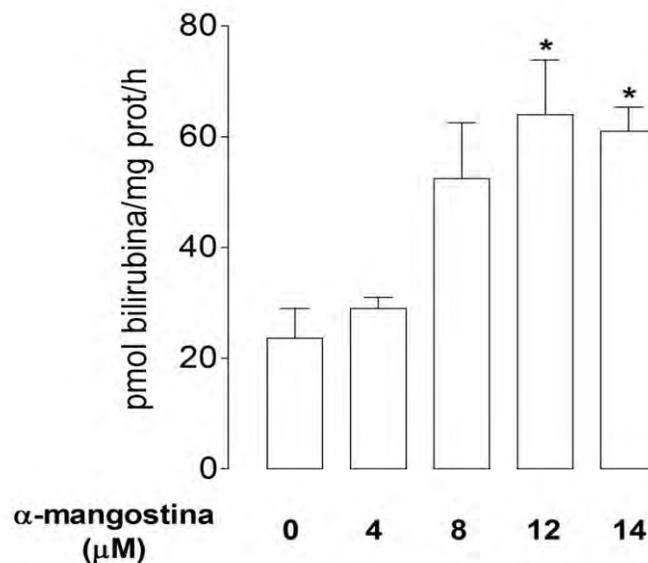


Figura 8. Modulación de la actividad de HO por αM (0-14 μM) por 24 h en NGC de 9 DIV. Los datos se representan como promedio \pm EEM, n=3. *P<0.01 vs control.

Para correlacionar el incremento en la expresión de HO-1 de manera dependiente del tiempo, se realizó un curso temporal usando los mismos tiempos de incubación que para el estudio de cantidad de HO-1, 4-24 h. Se usó 12 μM de αM , ya que desde esta concentración se observa que existe un incremento en la cantidad de

HO-1 así como de la actividad de HO. En la figura 9, se observa que efectivamente existe un incremento significativo en la actividad de HO hasta las 24 h, también se observa un incremento aunque no significativo desde las 8 h de incubación. Por lo que, el incremento de 1.7 veces de proteína de HO-1 resulta en el aumento de actividad de HO de 2.7 veces.

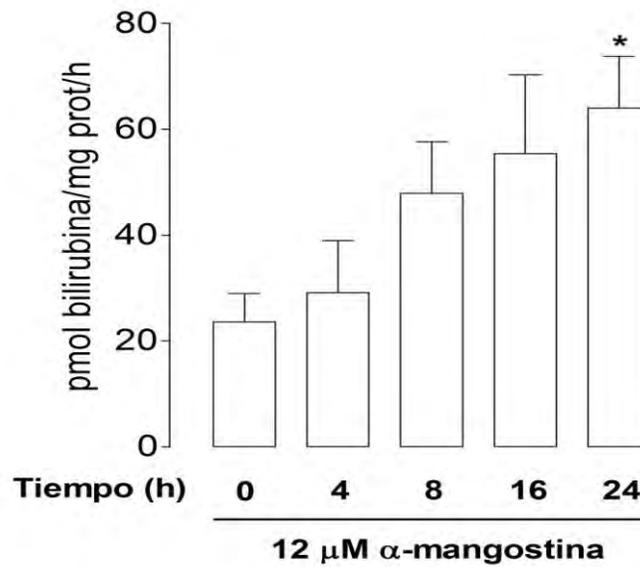


Figura 9. Modulación de la actividad de HO en un curso temporal (0-24 h) a la concentración 12 μ M de α M en NGC 9 DIV. Los datos se representan como promedio \pm EEM, n=3. *P<0.01 vs control.

6.2 Determinación del factor transcripcional Nrf2 en la inducción de HO-1 por α M

Distintos factores transcripcionales reconocen al promotor del gen de HO-1, siendo uno de ellos el factor transcripcional Nrf2, el cual está relacionado con la expresión de enzimas citoprotectoras, como la HO-1.

Por lo cual, debido a que el α M indujo un incremento en la cantidad de HO-1 y esto se reflejó en el aumento de la actividad de HO, se decidió establecer la posible participación del factor transcripcional Nrf2. Para ello se realizó un fraccionamiento celular e inmunocitoquímica en NGC y en células PC12 tratadas con α M, sin éxito alguno, debido a que no se encontró un procedimiento adecuado. Por lo que en

colaboración con el grupo de investigación del Dr. Cuadrado, en España, se determinó la cantidad de HO-1 en cultivo primario de MEFs silvestres y nulos para Nrf2 tratados con α M (Figura 10).

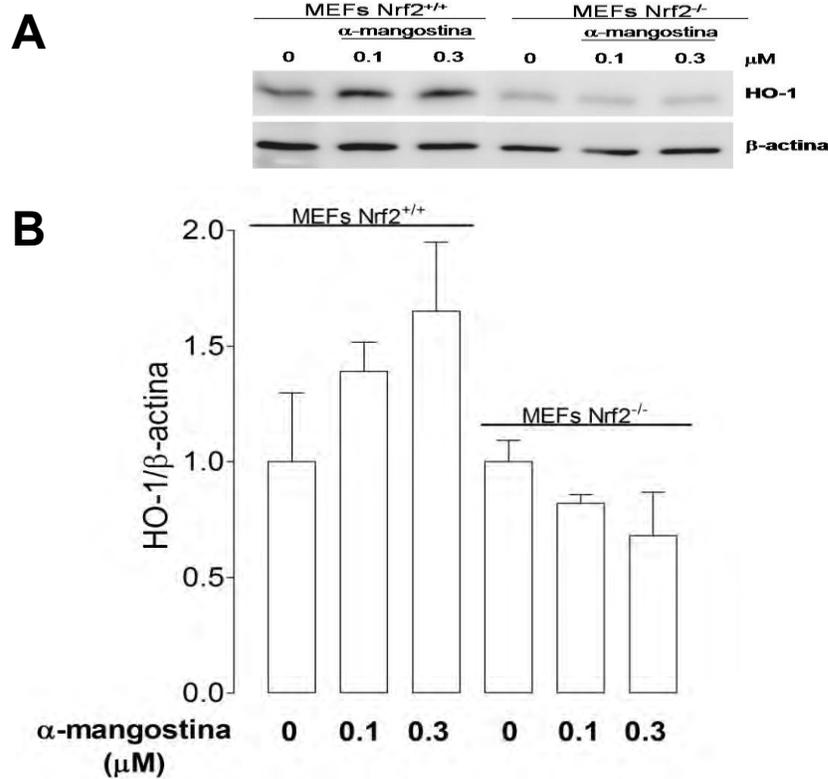


Figura 10. Expresión de HO-1 en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) silvestres (^{+/+}) o nulos (^{-/-}) en Nrf2. (A) Imagen representativa de la expresión de HO-1 en MEFs tratados con diferentes concentraciones de α M (0.1 y 0.3 μ M). (B) Análisis densitométrico del western blot de HO-1. Los datos se presentan como promedio \pm EEM, n=3. *P<0.01 vs control.

Los MEFs se trataron con 0.1 y 0.3 μ M de α M por 6 h, con la finalidad de determinar si existía un incremento en la cantidad de HO-1. En la figura 10, se observa que la α M a la concentración de 0.3 μ M es capaz de inducir HO-1 en MEFs Nrf2^{+/+} alrededor de \sim 1.5 veces, aunque no de forma significativa. Éste resultado es interesante, ya que el ligero incremento en MEFs Nrf2^{+/+} no se observa en los MEFs Nrf2^{-/-} lo anterior sugiere la posible participación de Nrf2 en la inducción de HO-1 en

células tratadas con α M. Aunque, es necesario realizar otro tipo de experimentos para corroborar éste resultado.

6.3 Determinación del efecto de la inducción de HO-1 en la protección por α M frente a 3NP

Con la finalidad de evaluar el efecto de la inducción de HO-1 sobre la viabilidad celular, se trabajó con concentraciones de α M de 8, 12 y 14 μ M frente al neurotóxico 3NP. El cual, es un inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa, enzima del ciclo de Krebs y del complejo II de la cadena de transporte de electrones. Para determinar si esto estaba relacionado con la inducción de enzimas citoprotectoras, se realizó una pre-incubación por 16 h con α M después de las cuales se retó frente a 3NP. Adicionalmente, se realizó la mezcla α M+SnMP+3NP, para evaluar si el uso de SnMP exacerbaba la muerte inducida por 3NP y con ello demostrar o no la participación de HO.

Consistente con reportes previos (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009), el 3NP provoca una disminución en la viabilidad celular del 40% en cultivos de NGC (método FDA, Figura 11). Esta disminución se previene al pre-incubaron NGC con α M por 16 h, desde la concentración 8 μ M, en la cual como se recordará ya existe un incremento en los niveles de HO-1, aunque no de forma significativa. Como se observa en el panel B de la figura 11 la protección es alrededor del 90% cuando se pre-incuba con α M 12 y 14 μ M (Figura 9, panel B).

Adicional a la gráfica, se presenta en el panel A las micrografías de NGC tratadas con concentraciones de α M y 3NP, siendo representativas de la gráfica del panel B. Las células control, muestran las características morfológicas normales de las NGC, las cuales son: un soma oscuro y de forma ovalada rodeado de un halo refringente, y procesos gruesos, oscuros y bien definidos. Sin embargo, las características morfológicas se pierden cuando las NGC se tratan con 3NP, se observa que algunas células están hinchadas, otras no presentan un soma oscuro y han perdido

el halo refringente, además los procesos se ven delgados y en algunos sólo quedan rastros.

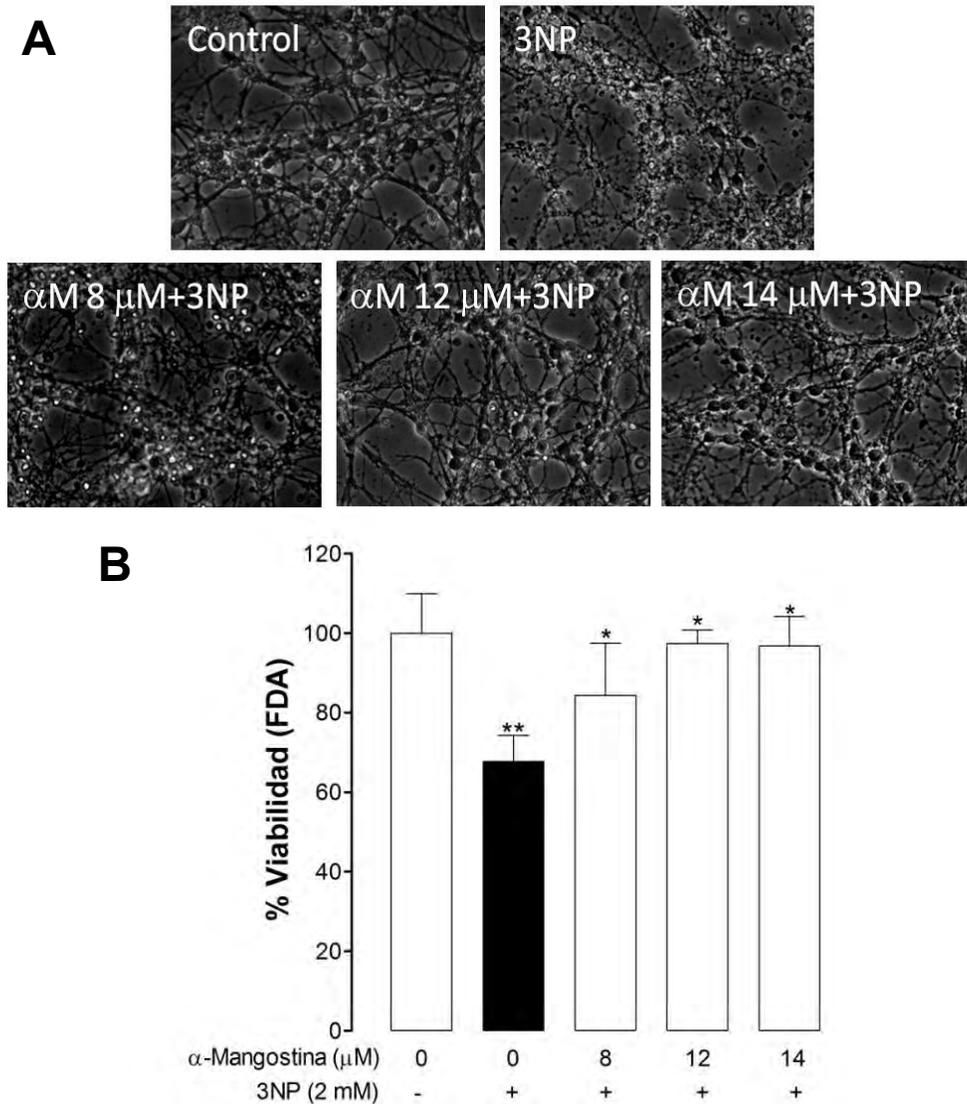


Figura 11. Viabilidad celular de NGC pre-incubadas con α M frente a 3NP. (A) Micrográficas de campo claro en donde se observa la morfología celular de las NGC en los diferentes tratamientos. (B) Determinación de la viabilidad celular por el método de FDA, las NGC se pre-incubaron 16 h min con α M para después ser expuestas a 2 mM de 3NP por 3 h. Los resultados se representan como promedio \pm EEM, n=4-7. **P<0.01 vs control y *p<0.05 vs 3NP.

Estas alteraciones morfológicas se previenen en NGC pre-tratadas con las concentraciones crecientes de α M. De hecho, se observa que estas características son casi idénticas al control a las concentraciones de 12 y 14 μ M de α M (Figura 11, panel A).

Debido a que encontramos que la pre-incubación con α M protege del daño ocasionado por 3NP, se decidió evaluar si la inhibición de HO podría evitar este efecto. En este caso, la viabilidad celular se determinó por dos métodos diferentes con la finalidad de corroborar el resultado obtenido (Paneles B y C, Figura 12). Ambos métodos demuestran que el 3NP disminuye la viabilidad celular y que dicha disminución se previene al pre-incubar con 14 μ M de α M pero el uso de SnMP evita la protección de α M. De hecho la muerte celular se exagera de forma similar a lo observado en la figura 5.

Adicionalmente, se presenta en el panel A de la figura 12 las micrografías representativas del experimento. Las células control y las tratadas con SnMP, muestran las características morfológicas normales de las NGC (soma oscuro y ovalado rodeado de un halo refringente, y los procesos gruesos, oscuros y bien definidos) indicando que el SnMP no altera las características morfológicas. Sin embargo, éstas características se pierden cuando las NGC se tratan con 3NP, y se restablecen cuando se pre-incuba con 14 μ M de α M. Sin embargo, al usar α M+SnMP+3NP la morfología celular se pierde y de hecho se observan mayor daño, ya que los cuerpos celulares y los procesos se pierden por completo (Panel A, Figura 12). Esto también sucede al usar SnMP+3NP, lo cual indica, como se había mencionado anteriormente, que la HO juega un papel importante en la protección contra 3NP y que el uso de α M, como un inductor de HO-1, previene este daño ocasionado por 3NP.

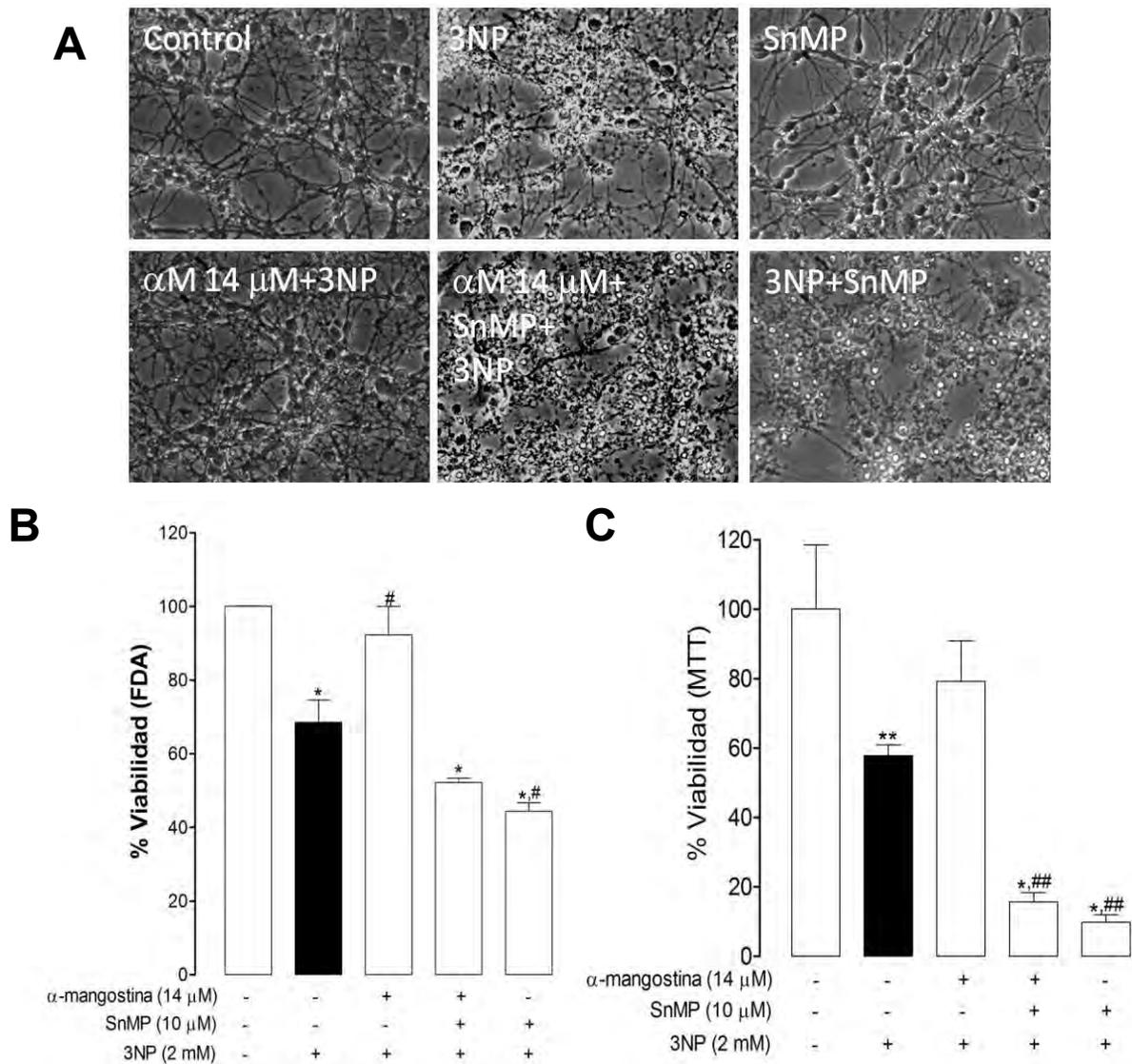


Figura 10. Efecto de la inhibición de HO en la protección con α M frente a 3NP en NGC. A) Micrografías de campo claro en donde se observa la morfología celular de las NGC en los diferentes tratamientos. Las NGC se pre-incubaron por 16 h con α M, después se incubaron con SnMP 10 μ M, un inhibidor de HO, por 30 min previos al tratamiento con 3NP y hasta las 24 h. Posteriormente las NGC se trataron con 3NP 2 mM por 3 h. A las 24 h después del tratamiento se determinó la viabilidad celular por el método de FDA, n=3-7 (B) o por el método de MTT, n=3 (C). Los resultados se presentan como promedio \pm EEM. *P<0.001 y **p<0.05 vs control; #p<0.01 y ##p<0.05 vs 3NP.

7. Discusión

La exposición a toxinas ambientales o condiciones oxidantes se ha asociado con cáncer, enfermedades inflamatorias, desórdenes cardiovasculares y neurodegenerativos. Para contrarrestar éstos daños, las células cuentan con una serie de señales que activan la respuesta de la defensa antioxidante (Giudice *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en NGC en nuestro laboratorio se encontró que la co-incubación con α M, a las concentraciones de 8, 10 y 12 μ M, protege del daño neuronal y del incremento en la producción de ERO inducidos por 3NP (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2009). En el presente trabajo demostramos que el uso de un inhibidor de HO, no solo evita el efecto protector de la α M sino que exacerba la muerte celular (Figura 5). Por otro lado, en un estudio *in vivo* se demostró que el tratamiento con α M previene la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes inducida por isoproterenol en corazón de rata (Devi Sampath y Vijayaraghavan, 2007). Este hallazgo junto con el hecho de que la HO-1 se induce por compuestos polifenólicos como la curcumina y el carnosol (Martin *et al.*, 2004; Scapagnini *et al.*, 2006), nos hizo pensar que la α M podría estar induciendo enzimas citoprotectoras como la HO-1, lo cual no se había estudiado en NGC. Por lo que se evaluó la inducción de HO-1, ya que esta enzima está muy relacionada con la protección frente a estrés oxidante en NGC (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009; González-Reyes *et al.*, 2009).

En el presente estudio se encontró que la α M puede inducir la expresión de HO-1 de manera dependiente de la concentración y del tiempo; siendo la mayor inducción a las 24 h de incubación y a la concentración de 14 μ M. Se sabe que otros compuestos antioxidantes que confieren protección a través de Nrf2 y de la inducción de enzimas citoprotectoras, como la curcumina y el carnosol, inducen HO-1 a nivel de proteína y ARNm a las 6 h de incubación en otros tipo celulares (Martin *et al.*, 2004; Scapagnini *et al.*, 2006). En nuestro estudio se observa que la cantidad de proteína de HO-1 aumenta desde las 8 h de incubación pero solo es significativo hasta las 24 h, este es un resultado similar al encontrado en nuestro laboratorio al usar curcumina en NGC (datos no publicados). En cuanto a la actividad de HO, también se observa que

existe un aumento dependiente de la concentración y del tiempo, el cual es significativo a partir de 12 μM y desde las 16 h de incubación a la misma concentración. Estos resultados indican que el aumento en la cantidad de HO-1 de 1.7 veces se refleja en un aumento de la actividad de HO de 2.7 veces. También se encontró que la αM induce la expresión de HO-1 de manera dependiente de la concentración en células PC12. Lo anterior sugiere que la inducción de HO-1 por αM es independientemente del tipo celular pero en forma dependiente de la concentración.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el incremento de 3 veces en la cantidad de HO-1 y en la actividad de HO, juega un papel importante en la protección durante la inhibición mitocondrial en NGC, y que el efecto protector se asocia a los productos de degradación del grupo hemo (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009; González-Reyes *et al.*, 2009).

Por otro lado, la inducción del transcrito de HO-1 está relacionada con la secuencia ARE en el promotor del gen. La secuencia ARE se encuentra en el extremo 5' del gen *Hmox1*, y es reconocido por el factor transcripcional Nrf2 (Nguyen *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2010). Los mecanismos por medio de los cuales el Nrf2 se traslada al núcleo, para inducir la activación de genes pueden ser: (a) la estabilización de Nrf2 citoplasmático, evitando su ubiquitinación y degradación proteosomal, por la desestabilización de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de Keap1 o bien (b) por la disociación del complejo Nrf2-Keap1 vía fosforilación de serina/treonina de Nrf2 (Surh *et al.*, 2008). En el caso de la HO-1, los mecanismos de activación de la transcripción de genes de fase II son diversos. Muchos se han enfocado en la activación de MAPK relacionadas con el crecimiento celular y respuesta al estrés, siendo las vías más representativas ERK, JNK y p38. Estas vías (Shan *et al.*, 2000; Kietzmann *et al.*, 2003; Ohlmann *et al.*, 2003) así como la vía PI3K/Akt (Martin *et al.*, 2004) se han relacionado con la sobre-expresión de HO-1. También, algunos sitios de unión a AP-1 están relacionados en la inducción de HO-1 vía MAPK, mediante compuestos polifenólicos como la curcumina (Hill-Kapturczak *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002).

Dado lo anterior, en este estudio se evaluó de manera preliminar si el factor transcripcional Nrf2 estaba involucrado en la inducción de HO-1 por α M. Para esto se realizó un estudio en MEFs nulos en Nrf2. Este tipo de modelo, en el que se usa ratones deficientes en Nrf2, es utilizado para demostrar que la ausencia del factor transcripcional está relacionado con la respuesta celular (Innamorato *et al.*, 2008). Se ha demostrado que en este tipo de ratones, existe una falla en la inducción de genes responsables de la detoxificación de xenobióticos y/o en la protección contra el estrés oxidante (Innamorato *et al.*, 2008; Surh *et al.*, 2008; Jung y Kwak, 2010). Los resultados sugieren que la presencia de Nrf2 es muy importante para que exista inducción de HO-1 por α M, ya que, aunque no existe un incremento significativo en la cantidad de HO-1 en MEFs Nrf2 ^{+/+} es evidente que existe un pequeño incremento y esto no se observa en los MEFs Nrf2 ^{-/-}. Cuando se trataron los MEFs nulos en Nrf2 con α M, solamente se observan niveles basales de HO-1 debido a que la transcripción del gen puede darse a través de otros factores transcripcionales. Este resultado nos indica que probablemente Nrf2 si tenga un papel importante en la expresión de HO-1, pero que es necesario caracterizar la participación de Nrf2 en las NGC.

Por último, la importancia de que la α M induzca HO-1 radica en que se ha demostrado que ésta juega un papel muy importante en la neuroprotección, ya que la sobre-expresión de HO-1 protege contra el daño isquémico cerebrovascular y el daño por glutamato (Panahian *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000) y que la carencia de HO-1 exacerba la excitotoxicidad *in vivo* (Ahmad *et al.*, 2006). Además, la inhibición de HO exacerba la muerte neuronal inducida por compuestos que generan estrés oxidante (Ku *et al.*, 2006; Orozco-Ibarra *et al.*, 2009). Por lo cual, la sobreexpresión y presencia de HO-1 es necesaria en el mecanismo protector frente al estrés oxidante. Orozco-Ibarra y colaboradores (2009) demostraron que la sobreexpresión de HO-1 y los productos de la degradación del grupo hemo, CO y bilirrubina, en NGC tratadas con 3NP están involucrados en el efecto protector. De lo anterior se concluye que la HO juega un papel importante en el sistema endógeno frente al daño oxidante. Esto es interesante, ya que el estrés oxidante es un mecanismo común de diversas enfermedades neurodegenerativas.

Por lo tanto, para comprobar si la inducción de HO-1 por α M tiene un papel importante en la neuroprotección frente a compuestos que generan estrés oxidante se realizó una pre-incubación con α M por 16 h, ya que a este tiempo se observa que existe un aumento de la expresión y actividad de HO, para después confrontarse a 3NP. Se ha demostrado que el 3NP no es capaz de inducir HO-1 en NGC por lo que, al utilizar un inductor de HO-1 (CoPP) se evita la muerte celular y producción de ERO provocados por 3NP (Orozco-Ibarra *et al.*, 2009). Además, en este trabajo se encontró que el uso de SnMP exagera la muerte celular por 3NP, lo que indica que la HO tiene un papel protector en este modelo. Por otro lado, nuestros resultados, indican que la α M previene la muerte celular inducida por 3NP, indicando que la inducción previa de HO-1 tiene un papel en dicha protección. Lo anterior se comprobó al usar el inhibidor de HO, SnMP, ya que éste evita la protección de la α M. Por lo tanto, la inducción previa de HO-1 por α M confiere protección en NGC frente a 3NP.

8. Conclusión

Podemos sugerir que la α M como un antioxidante bifuncional, ya que además de su capacidad antioxidante directa, en este trabajo se demostró que también tiene la capacidad de inducir a la enzima HO-1, la cual juega un papel central en la citoprotección ante compuestos que generan estrés oxidante, como el 3NP.

9. Perspectivas

Realizar un estudio *in vivo* para determinar si la α M es capaz de conferir protección frente algún compuesto neurotóxico, por ejemplo 3NP.

10. Bibliografia

- Abraham NG, Kappas A.** 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 60, 79–127.
- Ade N, Leon F, Pallardy, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, Ourlin JC.** 2009. HMOX1 and NQO1 genes are up-regulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol Sci.* 107, 451-460.
- Ahmad AS, Zhuang H, Dore S.** 2006. Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity. *Neuroscience.* 141, 1703–1708.
- Ajayi IA, Oderinde RA, Ogunkoya BO, Egunyomi A, Taiwo VO.** 2007. Chemical analysis and preliminary toxicological evaluation of *Garcinia mangostana* seeds and seed oil. *Food Chem.* 101, 999–1004.
- Akao Y, Nakagawa Y, Iinuma M y Nozawa Y.** 2008. Anti-cancer effects of xanthones from pericarps of mangosteen. *Int J Mol Sci.* 9, 355-370.
- Alam J, Cai J, Smith A.** 1994. Isolation and characterization of mouse heme oxygenase-1 gen. Distal 5' sequence are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem.* 269, 1001-1009.
- 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.
- Asher G, Dym O, Tsvetkov P, Adler J, Shaul Y.** 2006. The crystal structure of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 in complex with its potent inhibitor dicoumarol. *Biochemistry.* 45, 6372-6378.
- Bellezza I, Mierla AL, Minelli A.** 2010. Nrf2 and NF- κ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers.* 2, 483-497.
- Berridge MV, Tan AS.** 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 303, 474-482.
- Bumrungpert A, Kalpravidh RW, Suksamrarn S, Chaivisuthangkura A, Chitchumroonchokchai C, Failla MK.** 2009. Bioaccessibility, biotransformation, and transport of alpha-mangostin from *Garcinia mangostana* (Mangosteen) using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. *Mol Nutr Food Res.* 53, S54–S61.

- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J.** 2006. Sustancias reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educ Quim.* 17, 164-173.
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R.** 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 37, 949-962.
- Chen K, Gunter K, Maines MD.** 2000. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J Neurochem.* 75, 304–313.
- Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA.** 2006. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 2933-2938.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W.** 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia.* 78, 401-408.
- Dennerly PA.** 2000. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul.* 36, 181-199.
- Devi Sampath P, Vijayaraghavan K.** 2007. Cardioprotective effect of alpha-mangostin, a xanthone derivative from mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 21, 336-339.
- Dikalov S, Losik T, Arbiser JL.** 2008. Honokiol is a potent scavenger of superoxide and peroxy radicals. *Biochem Pharmacol.* 76, 589-596.
- Eberhardt MK.** Reactive oxygen metabolites: Chemistry and medical consequences. USA. *CRC Press LLC*, 2000.
- Ee CG, Daud S, Taufiq-Yap YH, Ismail NH, Rahmani M.** 2006. Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res.* 20, 1067-1073.
- Fridovich I.** 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64, 97-112.
- García O, Massieu L.** 2001. Strategies for neuroprotection against L-trans-2, 4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J Neurosci Res.* 64, 418–428.
- Garcia VV, Magpantay TO, Escobin LD.** 2005. Antioxidant potential of selected philippine vegetables and fruits. *Philipp Agric Scientist.* 88, 78-83.

- Giudice** A, Arra C, Turco MC. 2010. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol Biol.* 647, 37-74.
- Gong** P, 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.
- González-Reyes** S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. 2009. Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radic Res.* 43, 214-223.
- Guerrero-Beltrán** CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ortiz-Vega KM, Franco M, Pedraza-Chaverri J. 2010. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 192, 278-285.
- Guzmán-Beltrán** S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. 2008. Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett.* 447, 167-171.
- Greene** LA, **Tischler** AS. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73, 2424-2428.
- Halliwell** B, **Gutteridge** JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*, USA, 2007. 4ta. Edición. Capítulos 3 y 8.
- Hill-Kapturczak** N, Thamilselvan V, Liu F, Nick HS, Agarwal A. 2001. Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol.* 281, F851–F859.
- Innamorato** NG, Rojo AI, García-Yagüe AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado A. 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol.* 181, 680-689.
- Jung** HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem.* 54, 2077-2082.
- Jung** KA, **Kwak** MK. 2010. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules.* 15, 7266-7291.

- Kaomongkolgit R**, Jamdee K, Chaisomboon N. 2009. Antifungal activity of alpha-mangostin against *Candida albicans*. *J Oral Sci.* 51, 401-406.
- Khor TO**, Yu S, Kong AN. 2008. Dietary cancer chemopreventive agents - targeting inflammation and Nrf2 signaling pathway. *Planta Med.* 74, 1540-1547.
- Kietzmann T**, Samoylenko A, Immenschuh S. 2003. Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes *J Biol Chem.* 278, 17927–17936.
- Kirkby KA**, **Adin CA**. 2006. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290, F563–F571.
- Kondo M**, Zhang L, Ji H, Kou Y, Ou B. 2009. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. *J Agric Food Chem.* 57, 8788–8792.
- Ku BM**, Joo Y, Mun J, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Kim HJ. 2006. Heme oxygenase protects hippocampal neurons from ethanol-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 405, 168–171.
- Lin PH**, Chiang MT, Chau LY. 2008. Ubiquitin-proteasome system mediates heme oxygenase-1 degradation through endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1783, 1826-1834.
- Mahabusarakam W**, Proudfoot J, Taylor W, Croft K. 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radic Res.* 33, 643-659.
- Mahabusarakam W**, Wiriyachitra P, Taylor W. 1987. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod.* 50, 474-478.
- Martin D**, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 279, 8919-8929.
- Márquez-Valadez B**, Lugo-Huitrón R, Valdivia-Cerda V, Miranda-Ramírez LR, Pérez-De La Cruz V, González-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. 2009. The natural xanthone alpha-mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue. *Nutr Neurosci.* 12, 35-42.
- Matsumoto K**, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Kobayashi E, Inuma M, Nozawa Y. 2004. Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-

induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem.* 12, 5799-5806.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65, 55–63.

Nabandith V, Suzui M, Morioka T, Kaneshiro T, Kinjo T, Matsumoto K, Akao Y, Iinuma M, Yoshimi N, 2004. Inhibitory effects of crude α -mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pac J Cancer Prev.* 5, 433-438.

Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244, 37-42.

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43, 233–260.

Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J.* 374, 337-348.

Ohlmann A, Giffhorn-Katz S, Becker I, Katz N, Immenschuh S. 2003. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression by anoxia and reoxygenation in primary rat hepatocyte cultures. *Exp Biol Med.* 228, 584–589.

Orozco-Ibarra M, Estrada-Sánchez AM, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. 2009. Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: Role of CO and bilirubin. *Int J Biochem Cell Biol.* 41, 1304–1314.

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.

Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol.* 46, 3227-3239.

Pedraza-Chaverri J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, González-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R. 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol.* 61, 491-501.

- Pérez-Rojas** JM, Cruz C, García-López P, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ceballos G, Espinosa M, Meléndez-Zajgla J, Pedraza-Chaverri J. 2009 Renoprotection by alpha-mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radic Res.* 43, 1122-1132.
- Phuwapraisirisan** P, Udomchotphruet S, Surapinit S, Tip-Pyang S. 2006. Antioxidant xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Nat Prod Res.* 20, 1332-1337.
- Pothitirat** W, **Gritsanapan** W. 2008. Thin-layer chromatography-densitometric analysis of alpha-mangostin content in *Garcinia mangostana* fruit rind extracts. *J AOAC Int.* 91, 1145-1148.
- Roberts** JC. 1961. Naturally occurring xanthenes. *Chem Rev.* 61, 591-605.
- Sakagami** Y, Iinuma M, Piyasena KG, Dharmaratne HR. 2005. Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine.* 12, 203-208.
- Sánchez-Pérez** Y, Morales-Bárceñas R, García-Cuellar CM, López-Marure R, Calderon-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. 2010. The alpha-mangostin prevention on cisplatin-induced apoptotic death in LLC-PK1 cells is associated to an inhibition of ROS production and p53 induction. *Chem Biol Interact.* 188, 144-150.
- Sies** H, Stahl W, Sundquist AR. 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci.* 669, 7-20.
- Scapagnini** G, Colombrita C, Amadio M, D'Agata V, Arcelli E, Sapienza M, Quattrone A, Calabrese V. 2006. Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress *Antioxid Redox Signal.* 8, 395-403.
- Schmid** W., 1855. Ueber das mangostin. Liebigs. *Ann Chem.* 93, 83–89.
- Schipper** HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. 2009. Heme oxygenase-1 neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem.* 110, 469-485.
- Shan** Y, Pepe J, Lu TH, Elbirt KK, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. 2000. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys.* 380, 219–227.

- Sikorski** EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. 2004. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286, F425–F441.
- Soares** MP, Bach FH. 2009. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 15, 50-58.
- Stevenson** DK, Vreman HJ, Wong RJ, Dennery PA, Contag CH. 2000. Carbon monoxide detection and biological investigations. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 111, 61-75.
- Stewart** D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. 2003. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem.* 278, 2396–2402.
- Sundaram** BM, Gopalakrishnan C, Subramanian S, Shankaranarayanan D, Kameswaran L. 1983. Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 48, 59–60.
- Suksamrarn** S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N, Suksamrarn A. 2006. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull.* 54, 301-305.
- Surh** YJ, Kundu JK, Na HK. 2008. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 74, 1526-39.
- Tan** XL, Spivack SD. 2009. Dietary chemoprevention strategies for induction of phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in lung carcinogenesis: A review. *Lung Cancer.* 65, 129-37.
- Tasset** I, Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, González-Herrera IG, Luna-López A, Konigsberg M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Ali SF, Túnez I, Santamaría A. 2010. Protective effect of tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: role of the Nrf2-antioxidant response element pathway. *Neurosignals.* 18, 24–31.
- Vieira** LM, **Kijjoa** A. 2005. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Curr Med Chem.* 12, 2413-2446.
- Wang** X, **Quinn** PJ. 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.* 38, 309-336.
- Walker** EB. 2007. HPLC analysis of selected xanthenes in mangosten fruit. *J Sep Sci.* 30, 1229-1234.

- Weecharangsan** W, Opanasopit P, Sukma M, Ngawhirunpat T, Sotanaphun U, Siripona P. 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn). *Med Princ Pract.* 15, 281-287.
- Williams** P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L. 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radic Res.* 23, 175-184.
- Yamamoto** N, Izumi Y, Matsuo T, Wakita S, Kume T, Takada-Takatori Y, Sawada H, Akaike A. 2010. Elevation of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition affords dopaminergic neuroprotection. *J Neurosci Res.* 88, 1934-1942.
- Yan** GM, Ni B, Weller M, Wood KA, Paul SM. 1994. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 656, 43-51.
- Yates** P, **Bhat** HB. 1968. Structure of β -mangostin. *Can J Chem.* 46, 3770-3772.
- Yates** P, **Stout** GH. 1958. The structure of mangostin. *J Am Chem Soc.* 80, 1691-1700.
- Yodhnu** S, Sirikatitham A, Wattanapiromsakul C. 2009. Validation of LC for the determination of alpha-mangostin in mangosteen peel extract: a tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. *J Chromatogr Sci.* 47, 185-189.
- Yu** L, Zhao M, Yang B, Zhao Q, Jiang Y. 2007. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. *Food Chem.* 104, 176-181.
- Zhu** H, Jia Z, Misra BR, Zhang L, Cao Z, Yamamoto M, Trush MA, Misra HP, Li Y. 2007. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc Toxicol.* 8, 71-85.
- Zou** Y, Lu Y, Wei D. 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J Agric Food Chem.* 52, 5032-5039.