



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA XANTONA V SOBRE EL RECEPTOR  
DE HIDROCARBUROS DE ARILO EN CÉLULAS DE  
SCHWANN *IN VITRO*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G Í A**

**P R E S E N T A:**

**BENÍTEZ ANGELES MIGUEL**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. DATOS DEL ALUMNO

Benítez  
Angeles  
Miguel  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
5569683327

### 2. DATOS DEL TUTOR

Dra.  
Mónica Adriana  
Torres  
Ramos

### 3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.  
Ricardo  
Reyes  
Chilpa

### 4. DATOS DEL SINODAL 2

Ing. Bioq.  
María Cristina  
Trejo  
Solís

### 5. DATOS DEL SINODAL 3

Dr.  
Omar Francisco  
Carrasco  
Ortega

### 6. DATOS DEL SINODAL 4

Dr.  
José Guadalupe  
Cisneros  
Lira

### 7. DATOS DE LA TESIS

Efecto de la xantona V sobre el Receptor de Hidrocarburos de Arilo en células de Schwann  
*in vitro*.  
69 p.  
2019

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

## **Agradecimientos**

A la Dra. Mónica Torres, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su tiempo y sus esfuerzos dedicados a mi formación, así como a la confianza depositada en mi persona.

A los miembros de mi jurado, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Cristina Trejo, Dr. José Cisneros y Dr. Omar Carrasco, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, así como sus valiosos comentarios y recomendaciones.

Al Dr. Aurelio Campos, por sus enseñanzas, opiniones y consejos siempre útiles y acertados, al igual que su confianza y apoyo. Sin olvidar las pláticas pre y post partidos. A la Dra. Marisol Orozco y a Norma Serrano, por ayudarme con materiales, reactivos, equipos y, sobre todo, por la ayuda y las enseñanzas brindadas durante mi estancia en el Instituto. A la Dra. Alma Ortiz, a la Dra. Juana Villeda y a la Dra. Francisca Fernández, del Laboratorio de Patología Experimental, por los espacios proporcionados, así como su instrucción en el manejo del microscopio de fluorescencia.

A mis padres, Lilia y Miguel, a mi abuela Rosa y a mi hermana Dennise, por apoyar mis decisiones, por sus enseñanzas, consejos, palabras de aliento y por contribuir en gran medida y de diferentes formas para que pueda cumplir mis objetivos. Gracias por su cariño, apoyo y confianza.

A Eunice, por todo el tiempo, vivencias y recuerdos compartidos, por tu ayuda, apoyo y paciencia durante estos años, por escuchar y ayudarme a tomar decisiones, por transmitirme tus conocimientos en miles de cosas que desconocía o desconozco y sobretodo por tu compañía y cariño. A Oscar y Luis Fernando, por todos los buenos momentos que hemos vivido juntos, por su compañía y ayuda en los malos momentos, por el dinero prestado y nunca pagado, por los buenos chistes.

A mis amigos de la preparatoria, la facultad y el instituto, por su amistad y por darme la oportunidad de conocerlos.

“Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm”

Winston Churchill

## Abreviaturas

AhR	Receptor de Hidrocarburos de Arilo
ARNT	Proteína translocadora nuclear de AhR
B [a] P	Benzo-a-pireno
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HSP90	Proteína de choque térmico 90
LNS	Señal de localización nuclear
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-ilo)-2,5-difenil-tetrazol
NES	Señal de exportación nuclear
P0	Proteína de mielina 0
PAS	PER- ARNT-SIM
PMP22	Proteína de mielina periférica 22
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
Xantona V	1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona
XAP2/ARA9	Receptor de AhR asociado 9

## Contenido

<b>1. Resumen</b>	9
<b>2. Marco Teórico</b>	
2.1 Sistema Nervioso	10
2.1.1 Sistema Nervioso Periférico	10
2.1.2 Células del SNP	11
2.2 Células de Schwann	13
2.2.1 Origen embrionario de las células de Schwann	14
2.2.2 Tipos de células de Schwann	14
2.2.3 Mielina	15
2.2.4 Cultivo de células de Schwann	16
2.2.5 Línea celular S16	17
2.2.6 Patologías en células de Schwann	18
2.3 Receptor de Hidrocarburos de Arilo (AhR)	20
2.3.1 Vía canónica de activación del AhR	21
2.3.2 Funciones de AhR	23
2.4 Importancia de los conocimientos etnobiológicos	24
2.5 Metabolitos secundarios	24
2.5.1 Polifenoles	26
2.5.2 Xantonas	27
2.5.3 Xantona V	29
2.6 <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	
2.6.1 Descripción taxonómica de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	29
2.6.2 Distribución de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	31
2.6.3 Usos etnobotánicos de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	31

<b>3. Justificación</b>	32
<b>4. Pregunta científica</b>	33
<b>5. Hipótesis</b>	33
<b>6. Objetivo</b>	33
6.1 Objetivos particulares	33
<b>7. Material y Métodos</b>	
7.1 Cultivo de células de Schwann	34
7.2 Xantona V	34
7.3 Preparación de los stocks de xantona V	35
7.4 Citotoxicidad de la xantona V en células de Schwann	35
7.4.1 Ensayo de MTT	37
7.5 Efecto de la xantona V sobre el AhR	
7.5.1 Inmunofluorescencia	37
7.6 Análisis estadísticos	39
<b>8. Resultados</b>	
8.1 Caracterización morfológica de las células de Schwann en cultivo	39
8.2 Efecto de la densidad poblacional sobre la localización subcelular del AhR	41
8.3 Citotoxicidad de las células de Schwann	42
8.4 Localización celular del AhR	44
<b>9. Discusión</b>	47
<b>10. Conclusiones</b>	58
<b>11. Perspectivas</b>	59
<b>12. Referencias</b>	60

## Resumen

La neuroglía periférica está compuesta por las células de Schwann, encargadas de promover y mantener el correcto funcionamiento de los nervios periféricos a través de diferentes acciones.

Sin duda, una de las funciones más importantes de este tipo celular es la formación de mielina, lo cual consigue plegando de manera continua su membrana citoplasmática alrededor de un axón, manteniendo de esta forma un aislamiento eléctrico que facilita la transmisión de los impulsos nerviosos.

Recientemente, se ha estudiado la actividad del Receptor de Hidrocarburos de Arilo (AhR del inglés Aryl Hydrocarbon Receptor) en las células de Schwann. El AhR es un factor de transcripción activado por ligando perteneciente a la súper familia bHLH (del inglés basic helix-loop-helix), propuesto como una molécula importante en la formación de la mielina y su ausencia en el Sistema Nervioso Periférico se ha asociado con el desarrollo de diferentes neuropatías.

La 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona V), es un polifenol aislado de la especie vegetal *Calophyllum brasiliense* Cambess., cuya estructura comparte características con las de los principales activadores de AhR como el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y benzo-a-pireno (B [a] P), sin los aparentes efectos tóxicos de estos últimos, por lo que fue probada como promotor de la activación de AhR en células de Schwann a diferentes concentraciones y tiempos.

En el presente estudio se observó que la exposición de las células de Schwann a xantona V (5 y 10  $\mu$ M) por 48 h, fue capaz de promover la movilización del AhR hacia la zona perinuclear y su translocación al núcleo, respectivamente.

Sin embargo, se observó que la estimulación con 10  $\mu$ M de xantona V por 48 h, ocasionó la muerte celular, aparentemente por una vía independiente a AhR.

Por otro lado, se encontró que la densidad celular influye en la localización celular de AhR en ausencia del estímulo.

Estos datos muestran la versatilidad de la xantona V, capaz de promover la translocación del AhR, lo cual probablemente sería de utilidad en el tratamiento de patologías desmielinizantes, así como su efecto citotóxico podría utilizarse contra enfermedades tumorales; sin embargo, estas características deben ser evaluadas en otros tipos celulares.

## **Marco Teórico**

### **Sistema Nervioso**

El Sistema Nervioso es un sistema complejo encargado de mantener la integridad funcional en los organismos pluricelulares, la recepción y selección de estímulos sensitivos que se originan en el medio interno o externo del individuo y su transmisión de manera coordinada a los órganos y/o sistemas efectores para emitir una respuesta; además, en organismos complejos, almacena información, interviene en la toma de decisiones y genera patrones de comportamiento (Curtis *et al.*, 2008; Tortora, *et al.* 2013).

El sistema nervioso de los vertebrados es dividido en Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP), por la ubicación, composición celular y funciones. El SNC, conformado por el encéfalo y médula espinal, se encarga de la integración nerviosa total (Curtis *et al.*, 2008; Snell, 2003).

### **Sistema Nervioso Periférico**

La interacción entre el medio y el SNC se lleva a cabo a través del SNP, según Curtis (2008) y Snell (2003) está formado por tres componentes:

- ✦ Nervios craneanos (doce pares), se unen al encéfalo. Estos nervios son sensitivos, motores o mixtos.
- ✦ Nervios espinales o raquídeos (treinta y un pares en humanos), se unen a la médula espinal. Estos nervios son mixtos (sensitivos y motores).
- ✦ Ganglios asociados (sensitivos y autónomos).

El SNP, está conformado a su vez, por dos subsistemas: el sistema nervioso periférico somático (SNS) y el sistema nervioso periférico autónomo (SNA). El SNS es el responsable de la comunicación aferente y eferente con el medio, mediante acciones conscientes de los efectores; mientras que, el SNA es el encargado de mantener la homeostasis del organismo, a través de acciones “involuntarias” de los efectores (inerva músculos lisos, corazón y glándulas) (Curtis *et al.*, 2008; Cardinali, 1992). El sistema nervioso periférico autónomo se divide en dos:

- ◆ Sistema parasimpático, el cual emerge del tronco cerebral y de la región sacra de la médula espinal; cuyo principal neurotransmisor en la sinapsis es la acetilcolina.
- ◆ Sistema simpático, que se origina de la médula espinal torácica y de los tres primeros segmentos lumbares. Su principal neurotransmisor en la sinapsis es la noradrenalina.

Estos sistemas se caracterizan por poseer efectos contrarios entre sí, por lo que la suma de los efectos de ambos sistemas regula la actividad de los diversos órganos y sistemas, manteniendo así, el equilibrio interno del organismo (Curtis *et al.*, 2008; Cardinali, 1992).

### **Células del SNP**

En el SNP es posible distinguir dos tipos celulares, cada uno con variedades especializadas. El primer tipo celular, son las neuronas o células nerviosas; constituidas por tres partes, el cuerpo celular, las dendritas y el axón (Tortora, *et al.*, 2013).

El cuerpo celular, pericarion o soma, es la región en la cual se hallan el núcleo y el resto de los organelos celulares, embebidos dentro del citoplasma. Por su parte, las dendritas y el axón son proyecciones que emergen del cuerpo celular y conforman las zonas de comunicación nerviosa, en donde las dendritas cumplen la función de receptor de los mensajeros químicos o eléctricos y el axón, la de emisor de la información hacia otra neurona, fibra muscular o una célula glandular (Tortora, *et al.*, 2013).

Particularmente, en el SNP las neuronas son agrupadas con tejido conectivo en fibras, lo cual se conoce como nervio, cada uno de estos se extiende desde el SNC hasta las diferentes estructuras efectoras. Son reconocidos los nervios sensitivos (formados por neuronas aferentes), los nervios motores (formados por neuronas eferentes) y los nervios mixtos (los cuales transportan señales en ambos sentidos) (Silverthorn *et al.*, 2013).

El segundo tipo celular, son las células de la glía (**fig. 1**), encargadas de brindar soporte mecánico, bioquímico y metabólico a las células nerviosas. En el SNP se encuentra un solo tipo de célula glial, la cual se presenta en dos subtipos: células satélite y células de Schwann (Tortora *et al.*, 2015; Silverthorn *et al.*, 2013).

Las células satélite, son células de Schwann no mielinizantes asociadas a ganglios periféricos. Un ganglio es un cúmulo de neuronas fuera del SNC, con apariencia glomerulada, cuya presencia puede estar localizada a lo largo de un nervio (Silverthorn *et al.*, 2013).

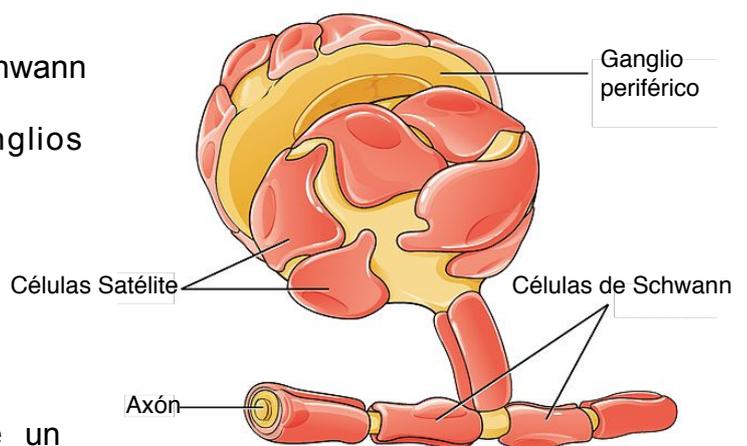


Fig. 1. Células de la glía en Sistema Nervioso Periférico. Modificado de Anatomy and Physiology

## Células de Schwann

El correcto funcionamiento de los nervios periféricos es una de las prioridades de las células de Schwann. Éstas fueron descubiertas y descritas a mediados del siglo XIX por Theodore Schwann (Snell, 2003).

Las células de Schwann (**fig. 2**) son las encargadas de brindar a los nervios periféricos protección, sostén mecánico, soporte metabólico, regulación del contacto de sus prolongaciones, recepción y almacenamiento de neurotransmisores. También, favorecen la regeneración y sobre todo mantienen mielinizadas a las fibras nerviosas, lo cual es esencial en la transmisión correcta de los impulsos nerviosos (Muñetón *et al.*, 1998).

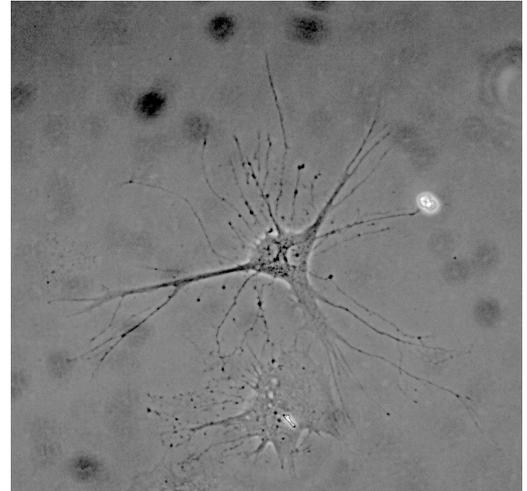


Fig. 2. Células de Schwann con proyecciones citoplasmáticas (morfología estrellada). Aumento microscopio 10X. Foto de Miguel Benítez.

Además de las funciones mencionadas anteriormente, las células de Schwann desempeñan algunas funciones inmunitarias como: producción de citocinas y quimiocinas, expresión de moléculas de adhesión y moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC del inglés Major Histocompatibility Complex), presentación de antígenos y ante un daño por lesión, son capaces de reclutar macrófagos e inducir inflamación local; así como producir Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Cheng *et al.*, 2007; Orlikowski *et al.*, 2003; Wagner & Myers, 1996).

### Origen embrionario de las células de Schwann.

La mayoría de las células de Schwann se forman a partir de la cresta neural durante el desarrollo embrionario (Weston 1963; Carpenter & Hollyday, 1992; Marusich & Weston, 1992; Zimmer & Le Dourain, 1993) y el resto (las encontradas en la región proximal al asta ventral) del tubo neural ventral (Weston, 1963; Loring & Erickson, 1987; Lunn *et al.*, 1987; Carpenter & Hollyday, 1992). Las células de la cresta (o el tubo neural), pasan por tres transiciones antes de convertirse en una célula de Schwann: célula precursora, célula de Schwann inmadura y después del nacimiento, uno de los dos tipos de célula de Schwann descritos: mielinizante o no mielinizante (Bhatheja & Field, 2006).

### Tipos de células de Schwann.

Una célula de Schwann es mielinizante o no mielinizante, dependiendo del o los axones a los que se encuentre asociada (**fig. 3**). Los axones con un diámetro igual o mayor a 1 micrómetro secretan niveles elevados de neuroregulina-III (NRG-III), lo cual promueve la mielinización; por su parte, aquellos axones con un diámetro inferior a 1 micrómetro secretan bajos niveles de NRG-III, lo que favorece el ensamblaje de una estructura denominada “paquete de Remak”, la cual está compuesta por varios axones rodeados y sostenidos por una célula de Schwann. Sin embargo, este destino no es permanente, pues se sabe que este tipo celular posee gran plasticidad, siendo capaz de retroceder al estadio inmaduro y convertirse en el otro tipo mielinizante dependiendo del microambiente tisular (Taveggia *et al.*, 2005 y Bhatheja & Field, 2006).

Célula de Schwann mielinizante



Célula de Schwann no mielinizante



Fig. 3. Tipos de células de Schwann: mielinizante y no mielinizante. (N) núcleo de la célula de Schwann; (A) axón. Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration.

## **Mielina**

La mielina es el plegamiento continuo de la membrana citoplasmática de las células de Schwann sobre un sólo nervio que promueve y mantiene un aislamiento eléctrico, facilitando la correcta transmisión de impulsos nerviosos (Perdomo & Spinel, 2004). La mielina se compone de agua (40%), una alta proporción de lípidos que en peso seco representa cerca del 90% y una baja proporción de proteínas (Morrel *et al.*, 1989; Linington *et al.*, 1980).

Los principales componentes de la mielina en mamíferos son el colesterol, fosfolípidos, glicolípidos y la esfingomielina (Spritz *et al.*, 1973; Linington *et al.*, 1980); que junto a las proteínas son cruciales para la estabilidad de esta estructura. Dentro de este último grupo destaca, la proteína de mielina 0 (P0 o MPZ del inglés Myelin Protein Zero), presente de forma abundante en la mielina periférica (>50%), es característica de las células de Schwann, así como vital en el mantenimiento de la estructura multilamelar de la mielina en el SNP, al estabilizar el ensamblaje y la proteína de mielina periférica 22 (PMP22 del inglés Peripheral Myelin Protein 22), la cual representa del 2 al 5% de las proteínas y resulta esencial en la formación y mantenimiento de la mielina (Magnaghi *et al.*, 2001).

## Cultivo de células de Schwann

A finales del siglo pasado inició el estudio *in vitro* de las células de Schwann que incluyó, en general, la búsqueda y caracterización de varios marcadores y mitógenos propios de este tipo celular, la descripción de proteínas y lípidos implicados en la formación de mielina, la interacción de las células de Schwann con las neuronas y su participación en enfermedades neurodegenerativas (Boutry *et al.*, 1992).

Estos estudios además de iniciar con el entendimiento de las células de Schwann, y la relevancia de éstas en el SNP, promovieron el desarrollo de diferentes técnicas de aislamiento, siembra de cultivos primarios y posteriormente el establecimiento de diferentes líneas celulares derivadas de distintas especies de mamíferos (**tabla 1 y 2**).

Tabla 1. Primeros artículos referentes al establecimiento de técnicas para cultivos primarios de C. Schwann. Información extraída de Boutry *et al.*, 1992.

Año	Autores	Descripción
1975 1976	Wood & Bunge Bunge	Cultivo primario por fragmentación de la raíz gangliar dorsal
1979	Brockes <i>et al.</i>	Cultivo primario por disociación
1980	Bourre <i>et al.</i>	Cultivo primario por fragmentación del nervio ciático.
1980 1980 1983	Skaper <i>et al.</i> Manthorpe <i>et al.</i> White <i>et al.</i>	Cultivo primario de ratón
1980 1988 1991	Askanas <i>et al.</i> Scarpani <i>et al.</i> Morrissey <i>et al.</i>	Cultivo primario de primate
1989	Dubois-Dalcq <i>et al.</i>	Cultivo primario de rata

Tabla 2. Primeros artículos referentes al establecimiento de líneas celulares de C. Schwann. información extraída de Boutry *et al.*, 1992.

Año	Autores	Línea celular	Descripción
1972	Pfeiffer & Wechsler	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4	Línea celular a partir de tumores neuronales.
1987 1987 1988 1990	Chen <i>et al.</i> Tennetoon Ridley Watabe	SV40-transformed	Línea celular a través de transformación usando oncogenes.
1987	Porter <i>et al.</i>	1.17	Línea celular de rata utilizando altas concentraciones de mitógenos.
1989	Goda <i>et al.</i>	S16	Línea celular de rata utilizando pases repetitivos.
1992	Boutry <i>et al.</i>	MSC 80	Línea celular de ratón utilizando altas concentraciones de suero.

### Línea celular S16

La línea S16 correspondiente a células de Schwann, fue establecida por Quarles y colaboradores en 1989, de acuerdo con lo documentado en sus trabajos; inmortalizada a partir de pases repetitivos (Goda *et al.*, 1991). La principal característica de esta línea celular al igual que la S42, es la alta expresión en superficie de la proteína MAG (myelin associated glycoprotein), una inmunoglobulina asociada en diversas funciones de la interacción glía-axón, especialmente en el proceso y mantenimiento del recubrimiento mielínico; sin la necesidad de contacto axonal (Quarles, 2007). Además, esta línea celular presenta una alta capacidad proliferativa y la capacidad de formar numerosos procesos citoplasmáticos a altas densidades (Goda *et al.*, 1991).

## **Patologías en células de Schwann**

Diferentes factores, ya sean infecciosos, inmunes, traumáticos, tóxicos, tumorales o genéticos, pueden afectar la función de las células de Schwann ocasionando la aparición de diversas enfermedades (Castañeda-Fernández & del Corral García; 2003). Las patologías asociadas con las células de Schwann se dividen en trastornos desmielinizantes, lesiones y trastornos tumorales (Bhatheja & Field, 2006).

Los trastornos desmielinizantes se caracterizan por ocasionar un daño directo a la membrana mielínica o a la célula de Schwann; estos pueden tener un origen genético o adquirido. En el primer caso la desmielinización se debe a desordenes hereditarios del sistema inmune, del metabolismo de la mielina o de la célula de Schwann; por ejemplo, la enfermedad Charcot-Marie-Tooth (CMT), es un trastorno desmielinizante hereditario ocasionado por un defecto en los genes mielinizantes clave como *mpz* mientras que el síndrome de Guillain-Barré se trata de un trastorno autoinmune. Por su parte en las polineuropatías desmielinizantes adquiridas las causas van desde exposición a agentes mielintóxicos (como la toxina diftérica) hasta daños mecánicos (Hughes-García, 2007).

En las lesiones, generalmente ocasionadas por traumas, isquemia, trastornos metabólicos, ataques inmunológicos o tóxicos; varios componentes del SNP son afectados, sufriendo alteraciones estructurales y funcionales, interrumpiendo la correcta conducción de las señales.

En estos casos, la célula de Schwann lleva a cabo, varias acciones en favor de la regeneración a través de la degeneración walleriana (**fig. 4**), la cual es descrita como un proceso direccional que busca regenerar total o parcialmente el nervio lesionado, teniendo como protagonistas a las células de Schwann, encargadas de liberar citocinas pro-inflamatorias, ayudar a fagocitar las zonas dañadas del axón y atraer macrófagos del sistema circulatorio; posteriormente, forman un tubo de regeneración conocido como Banda de Bugner, por el cual el axón comienza su regeneración teniendo la dirección correcta de crecimiento (Bhatheja & Field, 2006; Dubový *et al.*, 2014).

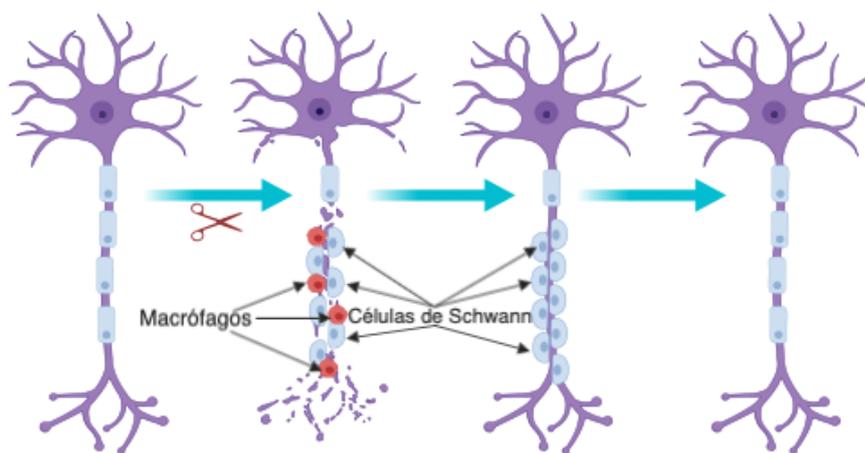


Fig. 4. Representación esquemática de la degeneración y regeneración de un nervio periférico. Modificado de Jessen & Mirsky, 2016 en bioRender.

La célula de Schwann es afectada por dos trastornos tumorales hereditarios: la neurofibromatosis tipo 1 y tipo 2. En la neurofibromatosis tipo 1, la mutación heterocigótica se presenta en el gen *nf1*, mientras que para el tipo 2 la mutación ocurre en el gen *nf2*. En el primer caso los tumores están formados por células de Schwann, fibroblastos, células perineuriales y mastocitos (Huson, 1998.; Yang *et al.*, 2003). A diferencia de la neurofibromatosis tipo 2, en la que los tumores están formados únicamente por células de Schwann (schwannomas) (Huson, 1998). En ambos casos las células de Schwann son las células patógenas primarias, es decir, son las responsables de presentar la mutación bialélica (Shackleford *et al.*, 2018).

## Receptor de Hidrocarburos de Arilo (AhR)

El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), es un factor de transcripción citoplasmático dependiente de ligando perteneciente a la súper familia de proteínas basic-helix-loop-helix (bHLH) - PER ARNT-SIM (PAS) (Gu *et al.*, 2000); cuya función canónica es el metabolismo de xenobióticos (compuestos exógenos, ajenos a la vida, que en concentraciones excesivas pueden producir trastornos tóxicos (Repetto-Jiménez & Repetto-Kuhn, 2009); (Stevens *et al.*, 2009).

El receptor de hidrocarburos de arilo posee tres dominios funcionales (**fig. 5**):

- ✦ Dominio bHLH (hélice-loop (bucle) –hélice), sumamente conservado en anfibios, reptiles, aves y mamíferos, ubicado en el extremo amino terminal con una extensión de 4-6 aminoácidos. Esta región participa en la unión del AhR con el DNA y en los procesos de dimerización (Vázquez-Gómez, *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013; Fukunaga *et al.* 1995).
- ✦ Dominio PAS, con dos repeticiones degeneradas (PAS-A y PAS-B), ubicados en la zona media de la proteína, con una extensión aproximada de 110 aminoácidos cada una y separadas entre sí, por 50 aminoácidos. La región PAS tiene como funciones principales la heterodimerización de AhR con ARNT (translocador nuclear de AhR) y reconocimiento del DNA (Vázquez-Gómez, *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013; Stevens *et al.* 2009). Se sabe que PAS-B posee un dominio de unión al ligando y un dominio útil para la unión de AhR con HSP90 (Wu *et al.*, 2013).
- ✦ Dominio Q es un dominio poco conservado, debido a que es variable, es responsable de las diferencias en el peso molecular del receptor entre las diferentes especies. Se encuentra ubicado en el extremo carboxilo terminal, rico en glutamina; es sumamente importante en la transactivación o transrepresión, ya que interactúa con diversos coactivadores y corepresores (Vázquez-Gómez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013; Stevens *et al.* 2009).



Fig. 5. Composición de la proteína de AhR. En la que se aprecian los tres dominios funcionales: Dominio con estructura básica hélice-bucle-hélice (bHLH); Dominio PAS con sus dos repeticiones degeneradas (A y B); Dominio Q rico en glutamina. Además del dominio TAD importante en la activación transcripcional. Los números indican el número de aminoácidos de la proteína. Modificado de Wu *et al.*, 2013.

### Vía canónica de activación del AhR

En su forma inactiva, el AhR se encuentra en el citoplasma, como parte de un complejo multimérico, formado por la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23kDa (p23), el receptor de AhR asociado 9, conocida como XAP2 o Ara9 y una proteína tirosina-cinasa pp60<sup>src</sup> (Stevens *et al.*, 2009). En conjunto estas proteínas preservan al AhR en un estado conformacional que es capaz de unirse al ligando, pero previene su translocación al núcleo (Vázquez-Gómez *et al.*; 2016).

Aunque el sitio de unión a ligandos es estructuralmente flexible y acepta una gran diversidad de moléculas (identificándose más de 400 compuestos (Wu *et al.*, 2013), los principales ligandos presentan estructuras planas y una naturaleza hidrofóbica, por lo que algunos metabolitos secundarios de plantas (indoles y flavonoides) o xenobióticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos HAP, dioxinas que incluyen los dibenzofuranos y los bifenilos policlorados planos PCB) son excelentes activadores de este receptor (Dietrich & Kaina, 2010); además se ha reportado que el AhR es capaz de unirse a compuestos endógenos como la bilirrubina, lipoxina A4, 7-ceto-colesterol, derivados del triptófano y otros compuestos con grupos indol en su estructura (Busbee, *et al.*, 2013 y Vázquez-Gómez *et al.*, 2016).

Cuando el AhR se une a ligandos, su estructura conformacional cambia, permitiendo su translocación al núcleo. En el núcleo el AhR se disocia del complejo que lo mantenía secuestrado en el citoplasma y se une a ARNT (proteína translocadora nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo) formando un heterodímero el cual se une al DNA en secuencias promotoras de genes diana (**fig. 6**), también llamados como “batería de genes”, cuya regulación depende de varios coactivadores (Stevens *et al.*, 2009). La secuencia 5' GCGTG 3' por consenso, ha sido establecida como el Xenobiotics Response Elements o “elemento de respuesta a xenobióticos o dioxinas”, de manera que la unión del complejo AhR/ARNT a esta secuencia, incita/induce la expresión de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos, siendo los seis genes más importantes de esta vía: Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, glutatión S-transferasa Ya, NADPH/quinona oxidoreductasa y aldehído deshidrogenasa 3 (Hankinson *et al.*, 1995; Busbee, *et al.*, 2013 y Vázquez-Gómez *et al.*; 2016).

El cómo es regulada la actividad de AhR transcripcional, aún no es del todo elucidado (Yang *et al.*, 2018), sin embargo, se han propuesto como los posibles mecanismos de regulación, la degradación proteolítica inducida por ligando a través de la ruta ubiquitina/proteosoma, el aumento del metabolismo del ligando activador y la retroalimentación negativa mediada por el represor de AhR (AhRR) (Hankinson *et al.*, 1995; Mimura *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2018). El AhRR es una proteína perteneciente a la familia bHLH/PAS, cuya expresión es mediada por AhR; este represor compite con el mismo AhR por la formación del heterodímero con ARNT capaz de unirse al elemento de respuesta a xenobióticos, inhibiendo así la transcripción de los genes blanco (Mimura *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2018) aunque también se ha propuesto que tal competencia no se da y se trata de una transrepresión, a través de la interacción proteína-proteína (Hahn, 2002).

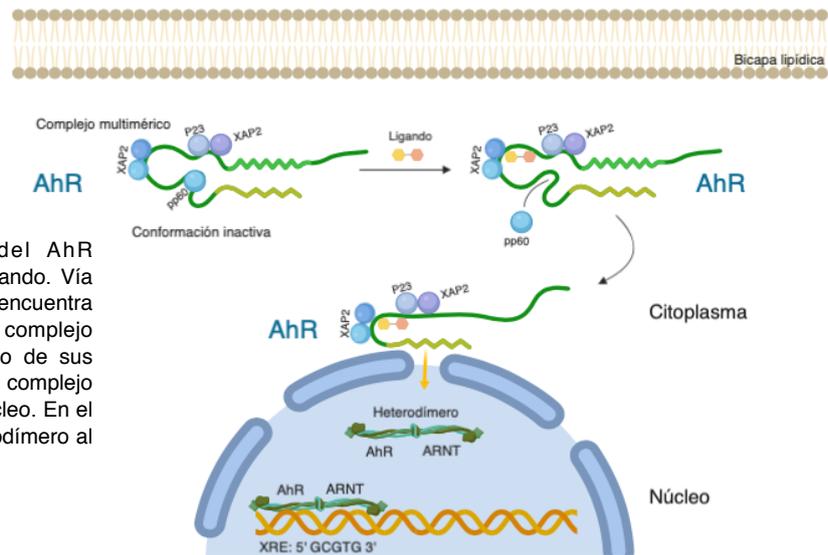


Fig. 6. Cascada de señalización del AhR desencadenada por la presencia de un ligando. Vía canónica. En su forma inactiva, el AhR se encuentra en el citoplasma, como parte de un complejo multimérico. Cuando el AhR se une a uno de sus ligandos, la estructura conformacional del complejo cambia, permitiendo su translocación al núcleo. En el núcleo el AhR se une a ARNT y este heterodímero al DNA. Elaborado en bioRender.

## Funciones del AhR

Considerando la expresión del AhR durante el desarrollo y en etapa adulta en varios tipos celulares y tejidos, el alto grado de conservación de este receptor (parte de su estructura proteica) en varias especies, incluyendo invertebrados (Fernández-Salguero *et al.*, 2010) con papeles fundamentales, como en *Caenorhabditis elegans*, donde participa en la regulación de la especificación del destino neuronal GABAérgico (Huang *et al.*, 2004) y su evidente surgimiento en épocas tempranas de la escala evolutiva, (la evidencia filogenética sugiere que el AhR en vertebrados surgió hace más de 450 millones de años) (Hahn *et al.* 2017), se ha reportado que el AhR posee otras funciones fisiológicas celulares, además del metabolismo de xenobióticos, la cual muy probablemente surgió como una función secundaria durante la evolución de los vertebrados (Stevens *et al.* 2009 y Fernández-Salguero *et al.*, 2010).

En los últimos años, se han estudiado los roles en los que participa el AhR destacando su papel en la reproducción (formación de los folículos), en la respuesta inmune, en la inflamación, en el desarrollo de hígado y sistema vascular, así como en la proliferación y migración celular (Fernández-Salguero *et al.*, 2010). Recientemente, en 2018 Shackleford y colaboradores, realizaron uno de los primeros estudios sobre las funciones de AhR, directamente en las células de Schwann y su participación en los eventos que

desencadenan la transformación de los neurofibromas plexiformes en tumores malignos de la vaina del nervio periférico.

### **Importancia de los conocimientos etnobiológicos.**

En la actualidad, los estudios etnobiológicos, implican la participación de diferentes disciplinas como la antropología, la farmacología, la biología, la química, la investigación clínica, entre otras; quienes aportan amplia información desde sus área de conocimiento, yendo desde los aspectos simbólicos y cognitivos de las etnias, hasta el descubrimiento, descripción y aplicación de compuestos bioactivos útiles en el desarrollo de nuevos fármacos, tratamientos y la elaboración de farmacopeas; todo esto regulado por dependencias gubernamentales, a través de diferentes leyes y acuerdos locales e internacionales (Heinrich & Gibbons, 2001).

### **Metabolitos secundarios**

En los últimos años, las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en uno de los mayores problemas de la salud pública en todo el mundo; hecho por el cual, se han destinado recursos y esfuerzos a la investigación y desarrollo de tratamientos efectivos. Una de las áreas con mayor crecimiento para este fin, es el de los productos naturales quienes muestran potentes actividades neuroprotectoras, con un prometedor perfil terapéutico para el diseño de medicamentos y activación cerebral (Xu *et al.*, 2014).

Los productos naturales, también llamados metabolitos secundarios son producidos por plantas para su desarrollo y supervivencia, resultan de las estrategias ecológicas que han podido desarrollar los organismos vegetales y muchos de ellos son exclusivos de ciertos grupos o incluso de ciertas especies (Anaya & Cruz-Ortega, 2001).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular con diversas funciones, que incluyen: atracción de polinizadores, establecimiento de asociaciones simbióticas, defensa contra depredadores, actividad antifúngica, antibiótica, antiviral y antioxidante, competencia por recursos (alelopáticos); principalmente. Por lo general, la síntesis de estos metabolitos se da en cada tipo de órgano, tejido y tipo celular de la planta; aunque la concentración entre un tejido y otro varía debido a la redistribución y capacidad de almacenamiento, así como a la etapa de desarrollo del organismo y a las presiones ambientales en las que se encuentra en determinado momento (Sepúlveda-Jiménez, 2004).

En la actualidad, se han identificado más de 200,000 metabolitos secundarios, número que sigue en aumento (Hartmann, 2004); sin embargo, es posible agruparlos de acuerdo con las características comunes; ya sea por estructuras base, acción biológica o biosíntesis; ésta última ha sido la clasificación más utilizada y consiste en agruparlos de acuerdo con la ruta metabólica que les dio origen, las tres grandes rutas a partir de las cuales se originan la mayoría de los metabolitos secundarios, son:

- ◆ La ruta del ácido mevalónico (terpenoides, carotenoides y esteroides).
- ◆ La ruta del ácido shikímico (fenilpropanoides, flavonoides y alcaloides).
- ◆ La ruta del acetato-malonato (acetogeninas y ácidos grasos).

La biosíntesis de los polifenoles (que comprenden varias clases y subclases) se da a través de la ruta del ácido shikímico (que genera aminoácidos aromáticos, ácidos cinámicos y sus derivados) y de la ruta de los poliacetatos (que da origen a quinonas y xantonas) (Quiñones *et al.*, 2012).

## Polifenoles

Los polifenoles conforman uno de los más grandes grupos de compuestos sintetizados por las plantas, utilizados como parte de las estrategias de interacción con el ambiente y con otros organismos; aunque su popularidad e importancia se debe a los múltiples beneficios en la salud que su consumo ofrece al ser humano.

Las potentes propiedades antioxidantes que poseen, han demostrado ser útiles en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidante, debido a las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o de transferencia de un solo electrón (SET) (Lambert *et al.*, 2010; Manach *et al.*, 2004; Gómez-Caravaca *et al.*, 2014); y aunque este efecto protector ocurre en la mayoría de los casos, se debe tomar en cuenta que bajo condiciones específicas, también presentes en los sistemas vivos, tales como un exceso de iones metálicos libres o cuando las defensas antioxidantes han sido superadas, estas moléculas pueden cambiar su comportamiento a moléculas prooxidantes (Hoult & Payá *et al.*, 1996).

Propiamente, los polifenoles son una familia de compuestos químicos caracterizados por la presencia en su estructura espacial de dos o más anillos fenólicos (benceno con uno o más hidróxilos como sustituyentes); los cuales junto con otros sustituyentes les confieren características de ácidos débiles y reductores fuertes (excepto la resorcina). Además, al interactuar con hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) los compuestos resultantes presentan un color rojo violáceo (Primo-Yúfera, 1996; Gómez-Caravaca *et al.*, 2014).

Los polifenoles se clasifican de acuerdo con el número de anillos y tipo de sustituyentes en varias clases y subclases, siendo las más importantes para la salud humana: ácidos

fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonoles, 3-flavonoles, isoflavonas, antocianinas), lignanos y estilbenos (Hooper & Cassidy, 2006).

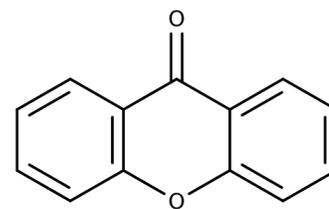
La síntesis de los polifenoles se da a través de dos rutas primarias básicas:

La ruta del ácido shikímico, que inicia con la condensación de la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato, que tras varias modificaciones da lugar al ácido shikímico del cual derivan: los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, al igual que fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano.

La ruta de los poliacetatos, que inicia con una molécula de Acetil CoA, que después de varias condensaciones da paso a poliacetatos, estos al reducirse se transforman en ácidos grasos que al ciclarse e interactuar con productos de la ruta del ácido shikímico forman un gran número de compuestos aromáticos como las quinonas, xantonas y flavonoides (Bravo, 1998; Quiñones, 2012).

## Xantonas

Las xantonas son metabolitos secundarios encontrados de manera restringida en líquenes (3 especies), hongos (19 especies) y plantas superiores (122 especies de 44 géneros)



(Negi, *et al.*, 2013). Poseen un esqueleto tricíclico básico C3-C6-C6 (**fig. 7**) con sustituyentes específicos en los

Fig. 7. Esqueleto básico de xantonas. Imagen hecha con el programa MarvinSketch 18.8.

anillos A y B (metilos, hidróxilos e isoprenos), estructura que le permite a este grupo de compuestos interactuar con diversos objetivos farmacológicos. La estructura base de las xantonas es simétrica, posee un origen biogénico mixto en plantas superiores, pues el anillo A esta conformado por derivados de acetatos mientras que el anillo B por residuos de productos de la vía del ácido shikímico (El-Seedi *et al.*, 2010).

Las rutas de biosíntesis para la formación de las xantonas se han estudiado por casi 50 años y han sido analizadas en diferentes trabajos. Una de las propuestas más aceptadas es la vía cuyo precursor es la fenilalanina (formada a partir del shikimato); la cual después de perder dos carbonos de la cadena lateral y sufrir una oxidación da lugar al ácido m-hidroxibenzoico (C6-C1), que al unirse con 3 unidades de acetato y sufrir un cambio conformacional (doblez y cierre del anillo) forma una benzo-fenona que a través de una reacción de acoplamiento genera el anillo central (**fig. 8**) (El Seedi, et al. 2010).

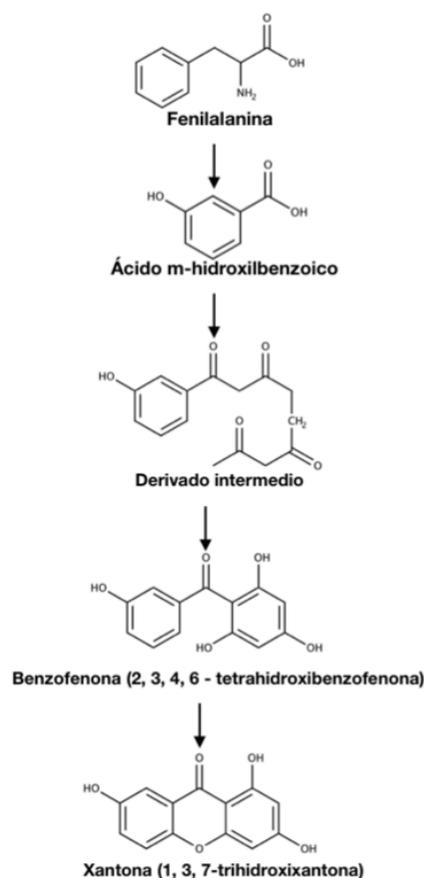


Fig. 8. Propuesta de ruta de biosíntesis de xantonas en *Gentia lutea* a partir del aminoácido fenilalanina. Modificado de El-Seedi et al. 2010.

Otras rutas alternas implican una glucosidación en etapas tempranas de la biosíntesis de la benzofenona, a través de una hidrólisis ácida o enzimática del glucósido y una posterior deshidratación (El Seedi *et al.* 2010); la combinación de una unidad C6-C3 con dos unidades de malonato para obtener benzofenona (Estrada Muñiz, 1998 y Serrano López, 2014), entre otras.

Comúnmente son clasificadas en seis grupos: xantonas simples, xantonas glucosílicas, xantonas preniladas, xantonas lignoides, bisxantonas y xantonas miscelaneas. Las principales propiedades que les han sido atribuidas a este grupo de metabolitos secundarios son: antimicrobianas, anticancerígenas, antileprosas, antioxidantes, antiparasitarias, anti-VIH, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, cardioprotectoras, hipoglucemiantes, analgésicas, larvicidas, ovidas y estimulantes del Sistema Nervioso (Negi, *et al.*, 2013).

A inicios de la década de 1980, se publicaron dos de los primeros trabajos en los que se evaluaba la actividad de las xantonas en el Sistema Nervioso. Prakash y cols. (1982) evaluaron el extracto de *Swertia paniculata* en el tratamiento de algunos trastornos mentales. Mientras que Ghosal y cols. (1980) evaluaron los constituyentes que incluían xantonas de *Swertia hookeri* en infecciones microbianas y el estado de ánimo.

### Xantona V

La xantona V (**fig. 9**), es aislada del duramen de la especie vegetal *Calophyllum brasiliense* Cambess., que habita en selvas tropicales lluviosas del continente americano con temperaturas promedio de 25°C.

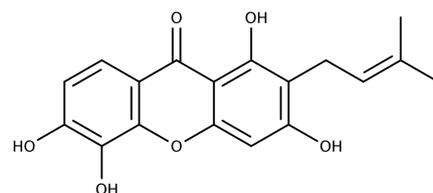


Fig. 9. Estructura de: 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroxixantona (Xantona V). Imagen hecha con el programa MarvinSketch 18.8.

Existen muy pocos estudios realizados con Xantona V, destacando el de Mesía-Vela y cols. (2001) en el cual se aisló la xantona V junto con otras tres xantonas, un derivado aceitado y dos flavonas de *Calophyllum brasiliense* Cambess.; el de Blanco-Ayala y cols. (2013), en el que se evaluó la Xantona V y la Xantona III aisladas del duramen de *Calophyllum brasiliense* contra el estrés oxidante y su relación con enfermedades neurodegenerativas. La tesis de licenciatura de Serrano López (2014), donde describe la actividad de xantona V como modulador de marcadores neuroinflamatorios en astrocitos corticales de ratas.

### Descripción taxonómica de *Calophyllum brasiliense* Cambess.

*C. brasiliense* Cambess., es una especie vegetal perteneciente a la clase *Equisetopsida*, subclase *Magnoliidae*, superorden *Rosanae*, orden *Malpighiales*, familia *Calophyllaceae* y género *Calophyllum* de acuerdo con la clasificación del Missouri Botanical Garden.

El árbol llega a medir hasta 30 metros de altura, posee hojas perennifolias (aunque en zonas secas algunos árboles pueden llegar a tirar sus hojas en abril-mayo), simples, opuestas, elípticas u oblongas, coráceas con el margen entero; haz verde oscuro y brillante, envés verde pálido.

La corteza (**fig. 10**) con un grosor de 10 a 20 mm, está longitudinalmente fisurada, es de color pardo moreno a café, laminada, fibrosa, con un exudado lechoso intensamente amarillo; el duramen por su parte es de color rosa claro a café rojizo. Las inflorescencias



Fig. 10. Corteza de *Calophyllum brasiliense* Cambess. Autor: Tarciso Leao

son de tamaño pequeño y color blanco, se distribuyen en panículas axilares, siendo la característica principal que éstas son dioicas.

El fruto es una drupa ovoide, verde-amarillenta en la madurez, con el endocarpio duro y una semilla relativamente grande (1.7-2.2 cm de largo y ancho), la cual es blanco-amarillenta (Joker & Salazar, 2000; Pennington & Sarukhán, 1998; García-Zebadúa *et al.*, 2014).

La floración y fructificación son anuales, iniciando en julio y octubre respectivamente, ambas terminan en diciembre. La polinización se da gracias a insectos mientras que la diseminación es realizada por murciélagos y otros animales silvestres que consumen los frutos (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

### **Distribución de *Calophyllum brasiliense* Cambess.**

En México, se distribuye en la costa del Golfo, desde el sur de Veracruz hasta la península de Yucatán y en la costa del Pacífico lo hace desde Nayarit hasta Chiapas. En América es posible encontrarlo desde la zona centro-sur de México a través de Centroamérica y las Antillas hasta el norte de Sudamérica (**fig. 11**) (Mesía-Vela *et al.*, 2001.; Flores *et al.*, 1994.; García-Zebadúa *et al.*, 2014).



Fig. 11. Mapas de la distribución continental y nacional de *Calophyllum brasiliense* Cambess. Elaborados en mapchart.net © con información de Agroforestry Database 4.0 (Orwa *et al.* 2009) y la base de datos Tropicos ®.

### **Usos etnobotánicos de *Calophyllum brasiliense* Cambess.**

Esta especie es aprovechada por diferentes pueblos americanos en su medicina tradicional. En Brasil es empleada como tratamiento de úlceras, reumatismo, varices, hemorroides, hipertensión, dolor, inflamación afecciones gástricas y hepáticas (Sartori *et al.*, 1999; da Silva *et al.*, 2001). En México se emplea para lesiones cutáneas, infecciones, dolor de dientes y de parto (Soto-Núñez; 1995 & González-Paredes; 2006). En Colombia se aplica en llagas y heridas; para aliviar el dolor y reducir la inflamación y en Perú es utilizada contra patologías virales y tumorales (García Barriga, 1992 y Flores, 2008).

## **Justificación**

El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) es una proteína involucrada en múltiples funciones dependiendo del tipo celular o tejido en el que se exprese. La relación del AhR y las células de Schwann ha sido poco explorada; sin embargo, estudios recientes (Shackleford *et al.*, 2018; Juricek *et al.*, 2017) han demostrado su participación en la correcta formación y mantenimiento de la mielina, a través de individuos deficientes/nulos, en cuyos casos la ausencia del receptor derivó en distintas neuropatías mielínicas.

Además, es probable su participación, de manera indirecta, en la transformación maligna de ciertos neurofibromas, por su relación con la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Estas evidencias sugieren un papel relevante del AhR en la función de las células de Schwann, y entender cuáles son los mecanismos moleculares y celulares en los que está involucrado este receptor, podría permitir el desarrollo de tratamientos dirigidos contra enfermedades asociadas a las células de la glía del SNP.

En este trabajo se busca aportar más información al campo de conocimiento de la biología de las células de Schwann. Además de ampliar la información sobre la función del AhR, y su interacción *in vitro* con un potencial ligando de origen natural, la xantona V, sentando antecedentes para investigaciones futuras.

## **Pregunta científica**

¿La xantona V interacciona con el receptor AhR en células de Schwann?

## **Hipótesis**

La xantona V funciona como ligando de AhR y promueve su activación en células de Schwann.

## **Objetivo general**

Determinar el efecto de la xantona V y elucidar si en este efecto está involucrado el receptor AhR en células de Schwann de rata.

## **Objetivos particulares**

Determinar:

1. La citotoxicidad de la xantona V en las células de Schwann.
2. El efecto de la xantona V sobre el receptor AhR.

## **Material y Métodos**

### Cultivo de células de Schwann

Para este trabajo, se utilizaron células de Schwann de la línea celular S16 (ATCC <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2941.aspx>), aisladas del nervio ciático de ejemplares neonatos de la especie *Rattus norvegicus*. Las células fueron sembradas en botellas de cultivo (pretratadas con poli-L lisina PLL por dos horas antes de la siembra) con medio DMEM de la marca Gibco by Life Technologies Ref: 12800-058, adicionado con Suero Bovino Fetal (Bio-West SBF S1650) al 10% y antibióticos/antimicóticos al 1% (Gibco by Life Technologies Ref: 15240-062); y mantenidas a una temperatura de 37°C y humificación de 5% de CO<sub>2</sub>; hasta una confluencia de 85%.

Se monitoreó la morfología de las células de Schwann en diferentes condiciones y se documentó con fotografías (aumento 10X), utilizando un microscopio óptico invertido Olympus Modelo: CKX41SF, una cámara microscope eyepiece camera AmScope MU500 y el programa: ToupView (X64) ®.

### Xantona V

La xantona V fue proporcionada por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, investigador del Instituto de Química-UNAM; ésta fue aislada del duramen de un ejemplar de la especie *Calophyllum brasiliense* colectado e identificado por J. I. Calzada en la Selva Lacandona, México; con etiqueta JIC-3116 en el herbario XAL y de madera simple (00011-XALw) en la xiloteca "Dr. Faustino Miranda". Ambos pertenecientes al Instituto de Ecología, A. C. en Jalapa, Veracruz, México (Blanco-Ayala, 2013).

El modelo experimental se dividió en dos partes:

- Evaluación de la citotoxicidad de la xantona V en las células de Schwann.
- Evaluación del efecto de la xantona V sobre el Receptor de Hidrocarburos de Arilo (AhR).

#### Preparación de los stocks de xantona V

La xantona V con fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_6$  y un peso molecular de 328 g/mol fue disuelta en DMSO para obtener un stock de 10 mM. Se utilizaron 2.7 mg de xantona V en 800  $\mu$ L de DMSO. A partir de la concentración de 10 mM se prepararon por dilución los stocks para las concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M, utilizadas en los siguientes experimentos. La concentración del disolvente (DMSO) fue del 0.001%.

#### Citotoxicidad de la xantona V en células de Schwann.

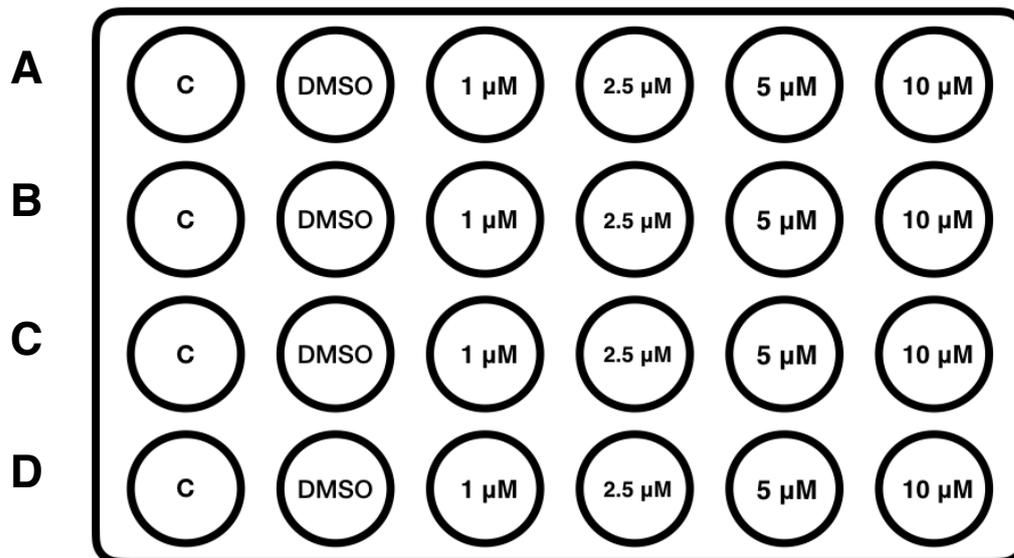
##### Tratamiento con xantona V

Durante los tratamientos con xantona V, fueron utilizadas placas de 24 pozos, las cuales se trataron con PLL, 2 h antes de la siembra. La PLL es un homopolipéptido que mejora la adhesión celular mediante la modificación de las cargas superficiales del sustrato de cultivo permitiendo el establecimiento y proliferación de la línea celular S16.

Cuando la confluencia de las células de Schwann en las botellas de cultivo era igual a 85%, éstas eran tratadas con tripsina al 0.5%, enzima peptídica que rompe las uniones celulares (establecidas entre ellas y con el sustrato de cultivo) permitiendo el cambio del frasco Roux a cada pozo de la placa.

En todos los experimentos se utilizaron  $7 \times 10^3$  células/pozo. Después de 48 h mantenidas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  se aplicó el tratamiento correspondiente a cada pozo (**fig. 12**).

Fig. 12. Tratamiento aplicado a las células de Schwann durante los experimentos de citotoxicidad (método de reducción metabólica del MTT).



Las filas A y B fueron tratadas un día antes que las filas C y D, debido a que en las primeras se probó y observó el efecto de la xantona V (a diferentes concentraciones) durante 48 h, mientras que en C y D se determinó a las 24 h.

Para la caracterización de la morfología, se observaron las células en proliferación, establecidas y bajo los distintos tratamientos de xantona V, utilizando un microscopio óptico invertido Olympus Modelo: CKX41SF y se tomaron fotografías, utilizando el programa: ToupView (X64) ®; de las células más representativas vistas en un aumento de 10 y 40X.

### Ensayo de MTT

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de la xantona V en células de Schwann, se empleó el ensayo de MTT, método basado en medir la actividad de las deshidrogenasas, a través de la cuantificación fotométrica de los cristales de formazán (azules e insolubles en agua) acumulados en las células vivas, producto de la reducción enzimática del MTT 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-ilo)-2,5-difenil-tetrazol bromuro (color amarillo y soluble en agua) (Mosmann, 1983; Fotakis & Timbrell, 2006; Montaner-Villalonga, 2008).

Cumplido el tiempo de los tratamientos con xantona V (24 y 48 h), se añadió medio DMEM con MTT a cada pozo y se incubó durante una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se solubilizó el formazán obtenido de cada uno de los pozos en DMSO y fue leído en un espectrofotómetro a 570 nm.

### Inmunofluorescencia

Para reconocer el efecto de la xantona V sobre el AhR, se utilizó el método de inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia es una técnica que permite la identificación y localización celular de proteínas específicas al promover una interacción antígeno-anticuerpo, donde la proteína blanco es el antígeno y el anticuerpo (monoclonal o policlonal) acoplado directa o indirectamente a un fluoróforo, interacciona con dicho antígeno, evidenciando su localización cuando el fluoróforo es excitado (Coons & Kaplan, 1950; Fiorentino *et al.*; 1994).

Para evaluar la presencia y localización celular de AhR en las células de Schwann, se sembraron 7 mil células por pozo en placas de 24 pozos, cada pozo contenía un cubreobjetos de vidrio y se iniciaron los tratamientos, dos días después de su siembra, con 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M de xantona V por 24 y 48 h. Las células se fijaron a  $-6^{\circ}\text{C}$  con paraformaldehído al 4% durante 20 min y se permeabilizaron a  $4^{\circ}\text{C}$  con metanol durante 10 min, con la finalidad de permitir el paso de los anticuerpos primario y secundario.

Las células fueron bloqueadas con suero de cabra (Equitech-Bio Inc. SG30-0100) al 4% durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se añadió el anticuerpo primario (Ah Receptor M-20 goat polyclonal igG SC-8089 Santa Cruz Biotechnology) disuelto en la solución de bloqueo (suero de cabra al 4%) en una concentración 1:200 y se incubó durante una noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en una cámara húmeda.

Después de una noche con el anticuerpo primario, fue colocado el anticuerpo secundario disuelto en PBS 1X (Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG Ref: A11055 Life technologies) en una concentración 1:200 y se incubó durante una hora en completa oscuridad. Finalmente se montaron los cubreobjetos en portaobjetos utilizando la solución de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories Inc. H-1200 Lot. ZA0620) y se observaron en el microscopio de fluorescencia NIKON KCC-REM-NCY-E200LEDMV modelo Eclipse E200LED MV R del Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Las fotos se tomaron con una cámara Evolution VF Cooled Color/ MediaCybernetics modelo F-CLR-12-C.

### Cuantificación de la inmunofluorescencia

Se realizó el conteo de todas las células en un campo, de tres campos aleatorios para cada tratamiento de tres experimentos independientes, por duplicado. La cuantificación se expresó en porcentaje.

### Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar. El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **Resultados**

### Caracterización morfológica de las células de Schwann en cultivo.

De acuerdo con Goda *et al.* (1991), Toda *et al.* (1994), Sasagasako *et al.* (1996), Boutry *et al.* (1992) y lo observado es posible afirmar que la morfología de las células de Schwann es heterogénea y depende de distintos factores, dentro de los que destacan los diferentes tiempos en los que se pueden encontrar las células en cultivo, establecimiento, proliferación/crecimiento, reposo, senescencia y apoptosis; el tamaño poblacional asociado al espacio disponible, así como la sensibilidad de las células a cambios de pH, concentración de CO<sub>2</sub>, a la disminución de la concentración de suero fetal bovino y exposición a compuestos propios de los tratamientos.

Con el objetivo de evaluar la morfología de las células S16, se monitorearon las células con un microscopio óptico invertido. Distinguiéndose las siguientes morfologías: 1) esféricas planas o esféricas con proyecciones, ante una sobrepoblación; 2) bipolares y estrelladas, comunes uno o dos días después de haber sido sembradas, al parecer es la morfología de establecimiento-proliferación y 3) poligonales, caracterizadas por un citoplasma con proyecciones reducidas, el soma presenta un borde poligonal, muy comunes después del tercer día en densidades bajas y similares con la muestra control la empresa ATCC, por lo cual se consideró como la morfología óptima. Ocasionalmente se presentan células anormales con formas irregulares, multinucleadas, con múltiples procesos citoplasmáticos o gigantes (hipertrofiadas), aunque esta última morfología es más común después del octavo pase (**fig. 13**).

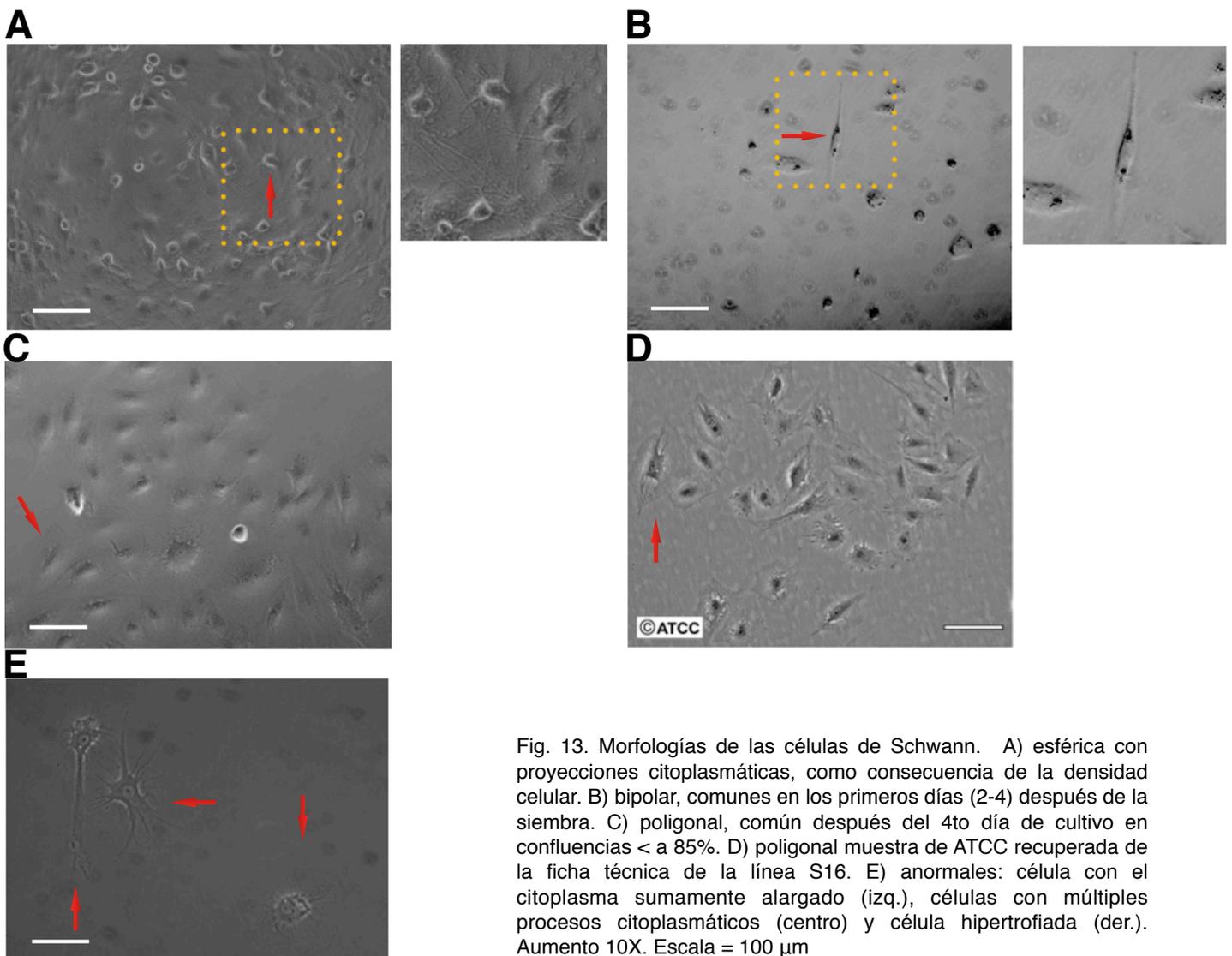


Fig. 13. Morfologías de las células de Schwann. A) esférica con proyecciones citoplasmáticas, como consecuencia de la densidad celular. B) bipolar, comunes en los primeros días (2-4) después de la siembra. C) poligonal, común después del 4to día de cultivo en confluencias < a 85%. D) poligonal muestra de ATCC recuperada de la ficha técnica de la línea S16. E) anormales: célula con el citoplasma sumamente alargado (izq.), células con múltiples procesos citoplasmáticos (centro) y célula hipertrofiada (der.). Aumento 10X. Escala = 100  $\mu$ m

Efecto de la densidad poblacional sobre la localización celular del AhR en células de Schwann.

Un resultado inesperado en el estudio del AhR, fue observar el aparente efecto que tiene la densidad poblacional sobre este factor de transcripción en el 100% de las células, pues una densidad igual o mayor a 95% propicia la translocación del AhR al núcleo y aparentemente acompañado de un incremento en los niveles de la proteína AhR, independiente a cualquier tratamiento incluido el de xantona V a distintas concentraciones. Sin embargo, cuando la densidad celular es menor al 90% la localización celular de AhR es citoplasmática (**fig. 14**).

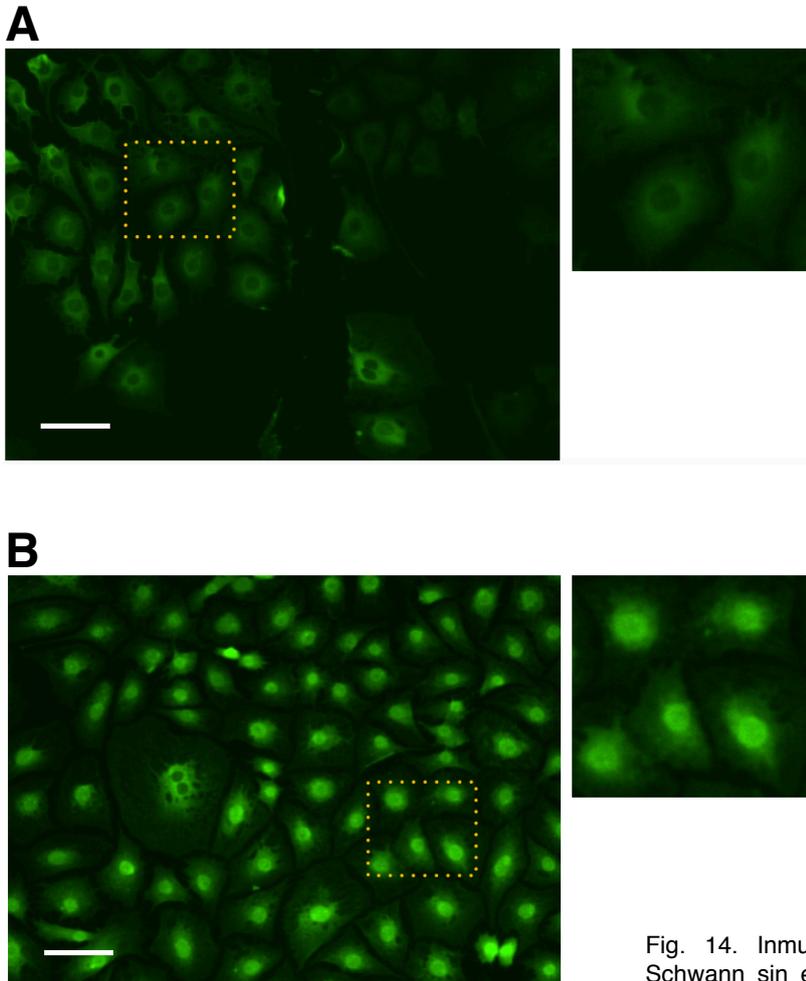


Fig. 14. Inmunolocalización de AhR en células de Schwann sin estímulo A) confluencia de 80-85% y B) confluencia de 100%. Aumento 10X. Escala = 100  $\mu$ m.

## Citotoxicidad de la xantona V en células de Schwann

En todos los experimentos realizados y en todas las concentraciones, incluyendo el control y control-DMSO, se observó la presencia de las 3 morfologías descritas anteriormente, con una mayor incidencia de la morfología poligonal.

La toxicidad de la xantona V en las células S16, fue evaluada por medio de la actividad de las deshidrogenasas a través del método de MTT. Se observó que el tratamiento con xantona V a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  por 24 h no modificó los valores de la concentración de formazán, en comparación con los de las células control y control + vehículo (DMSO), lo que sugiere que la actividad de las deshidrogenasas no presentó cambios significativos en presencia de los diferentes tratamientos de xantona V (**fig. 15**), lo cual se corroboró con la prueba estadística ANOVA de una vía y prueba de Tukey del programa GraphPad-Prism8 <sup>®</sup>, para una N=4. Sin diferencias estadísticamente significativas.

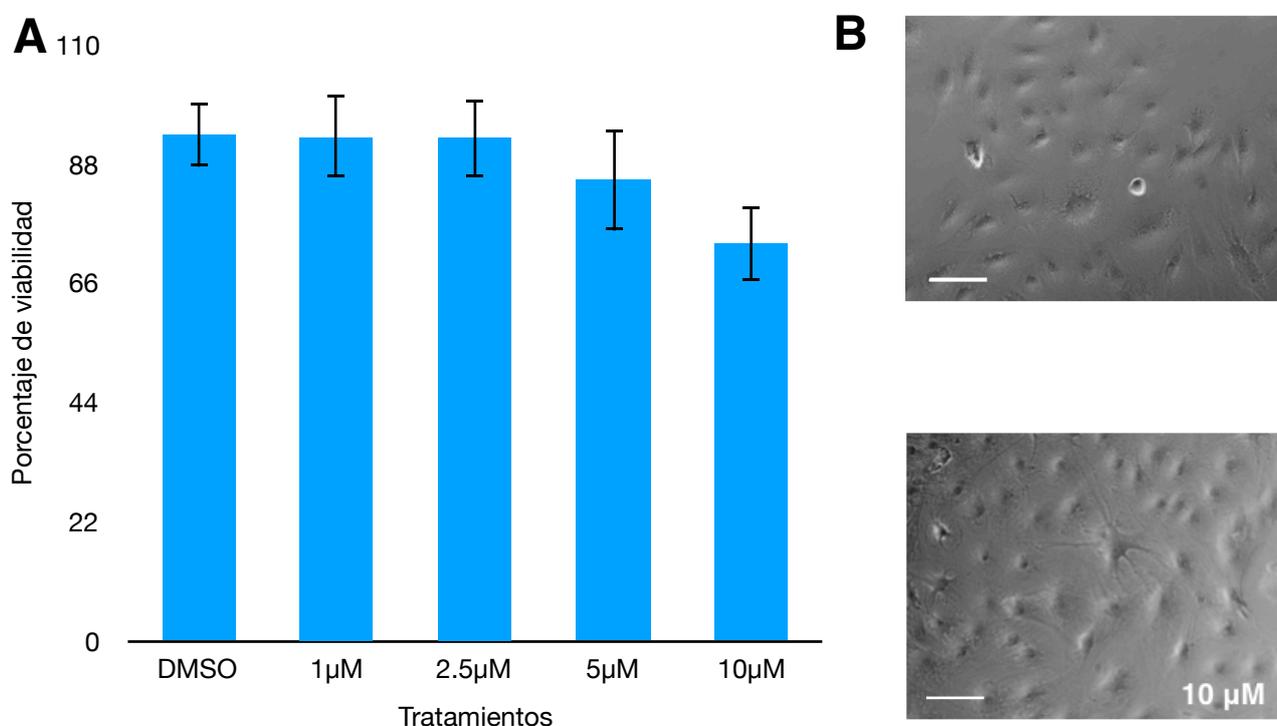


Fig. 15. Tratamiento de células de Schwann (línea S16) con xantona V por 24 h. A) Gráfica que representa el porcentaje de viabilidad para las diferentes concentraciones, evaluada con el método MTT. Prueba estadística ANOVA de una vía. N=4. Sin resultados estadísticamente significativos. B) Células de Schwann Control y con tratamiento de 10  $\mu\text{M}$  observadas en un aumento de 10X con un microscopio óptico invertido. Fotografías tomadas con el programa: ToupView (X64)<sup>®</sup>. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .

La concentración de 10  $\mu\text{M}$  de xantona V a 48 h en células de Schwann, provocó efectos citotóxicos, visibles en la morfología de las células expuestas a este tratamiento (**fig. 16B**) y significativo, al analizar los datos (**fig. 16A**) con ANOVA de una vía y prueba de Tukey con una  $p = 0.0266$ . Lo anterior, sugiere que las concentraciones no citotóxicas de la xantona V para este tipo celular se encuentra entre 1 y 5  $\mu\text{M}$  a 48 h, pues concentraciones mayores a éstas podrían resultar dañinas/tóxicas (reduciendo la viabilidad celular).

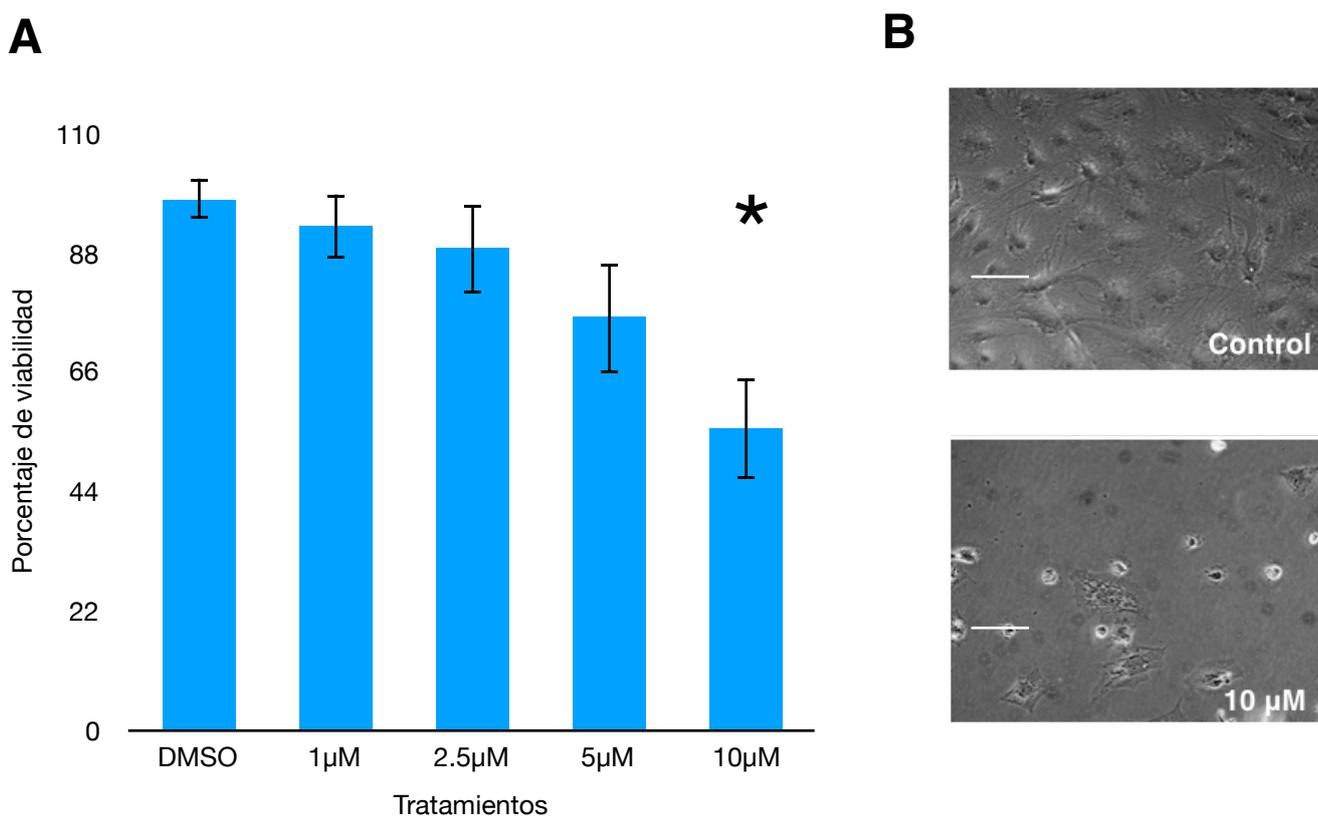


Fig. 16. Tratamiento de células de Schwann (línea S16) con xantona V por 48 h. A) Gráfica que representa el porcentaje de viabilidad para las diferentes concentraciones, evaluada con el método MTT. Prueba estadística ANOVA de una vía.  $N=4$ . 10  $\mu\text{M}$  con un valor de  $p = 0.0266$  (asterisco). B) Células de Schwann Control y tratamiento de 10  $\mu\text{M}$  con daño morfológico visible, observadas en un aumento de 10X con un microscopio óptico invertido. Fotografías tomadas con el programa: ToupView (X64)<sup>®</sup>. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .

El valor obtenido de las células control fue utilizado como el valor de referencia para normalizar los datos obtenidos de los distintos tratamientos.

### Localización celular del AhR en células de Schwann tratadas con xantona V

El método de inmunofluorescencia permitió demostrar que el AhR, efectivamente se encuentra presente en células de Schwann y observar el efecto de la xantona V en la localización celular del AhR a 24 y 48 h.

El porcentaje de células con localización citoplasmática, perinuclear o nuclear de AhR se representa en la **figura 17**. A las 24 h, ninguna concentración promovió la translocación nuclear; sin embargo, es posible apreciar un ligero aumento en el número de células que muestran a este factor en la zona perinuclear, aunado con una disminución del número de células que presentan su localización en el citoplasma, evidente en las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  (**fig. 18**).

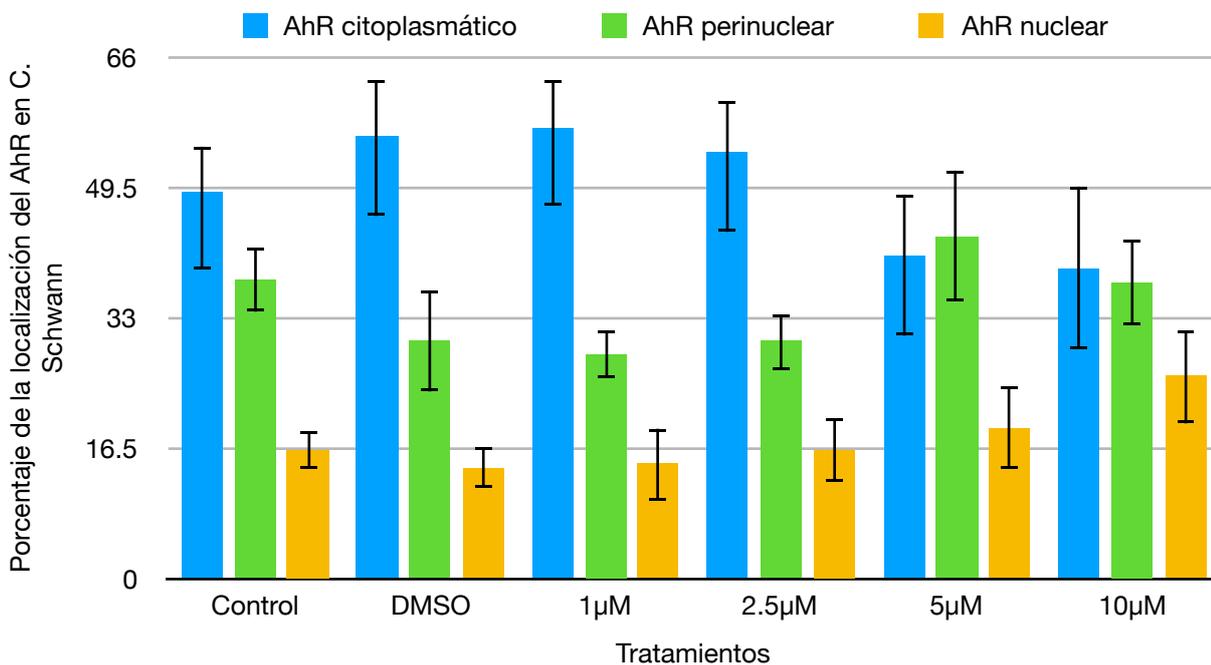


Fig. 17. Tratamiento de células de Schwann (línea S16) con xantona V por 24 h. Porcentaje de la localización celular de AhR (zonas citoplasmática, perinuclear y nuclear). ANOVA de una vía para cada zona N=3. Sin resultados estadísticamente significativos.

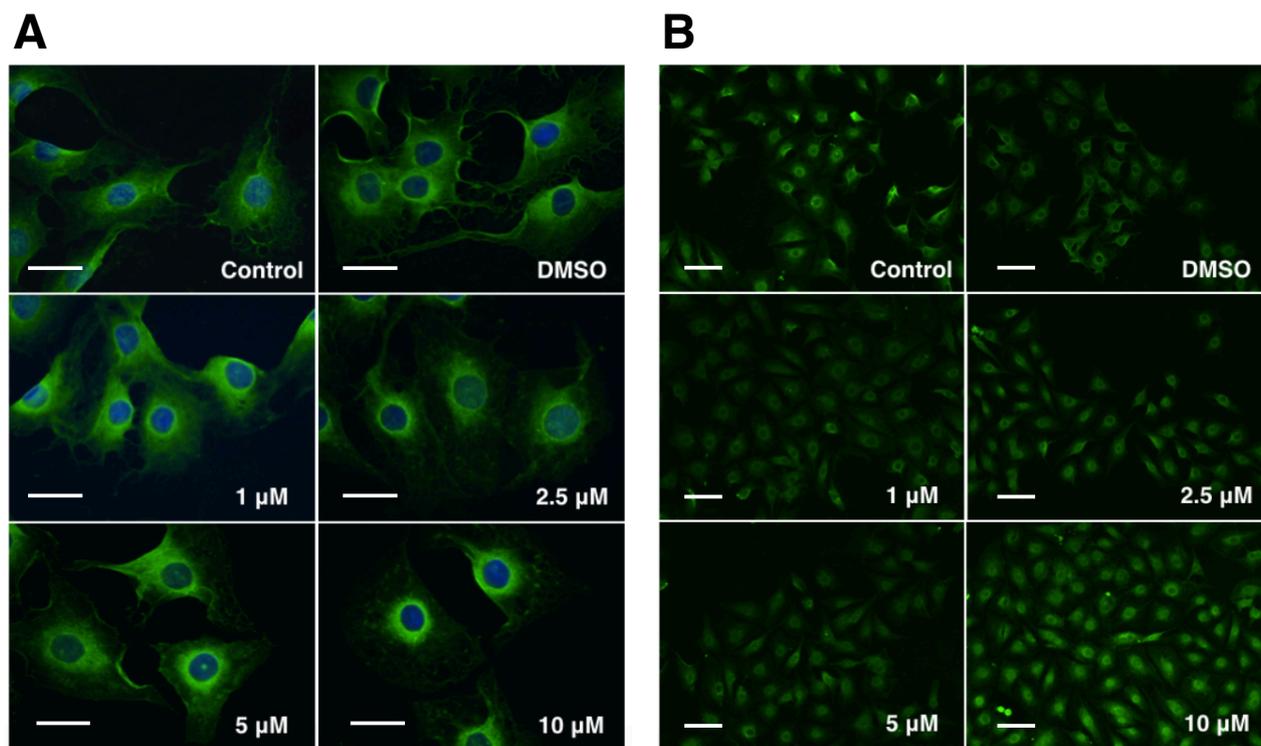


Fig. 18. Tratamiento de células de Schwann (línea S16) con xantona V por 24 h. Localización del AhR en citoplasma (Control, DMSO y concentraciones de 1 y 2.5  $\mu\text{M}$ ) y en la zona perinuclear (concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$ ). Panel A) Células observadas en un aumento de 40X. Panel B) Células observadas en un aumento de 10X. Escala = 100  $\mu\text{m}$ . Anticuerpo primario: AhR de cabra policlonal M-20 Santa Cruz. Anticuerpo secundario: Alexa Fluor 488 burro anti-cabra.

A las 48 h, es posible observar una aparente disminución en el número de células con AhR en el citoplasma, junto con un aumento en el número de células que presentan al AhR en la zona nuclear, en respuesta a las distintas concentraciones. La presencia de AhR en la zona perinuclear se trata de un estado de transición hacia la activación promovida por la xantona V (**fig. 19 y 20**).

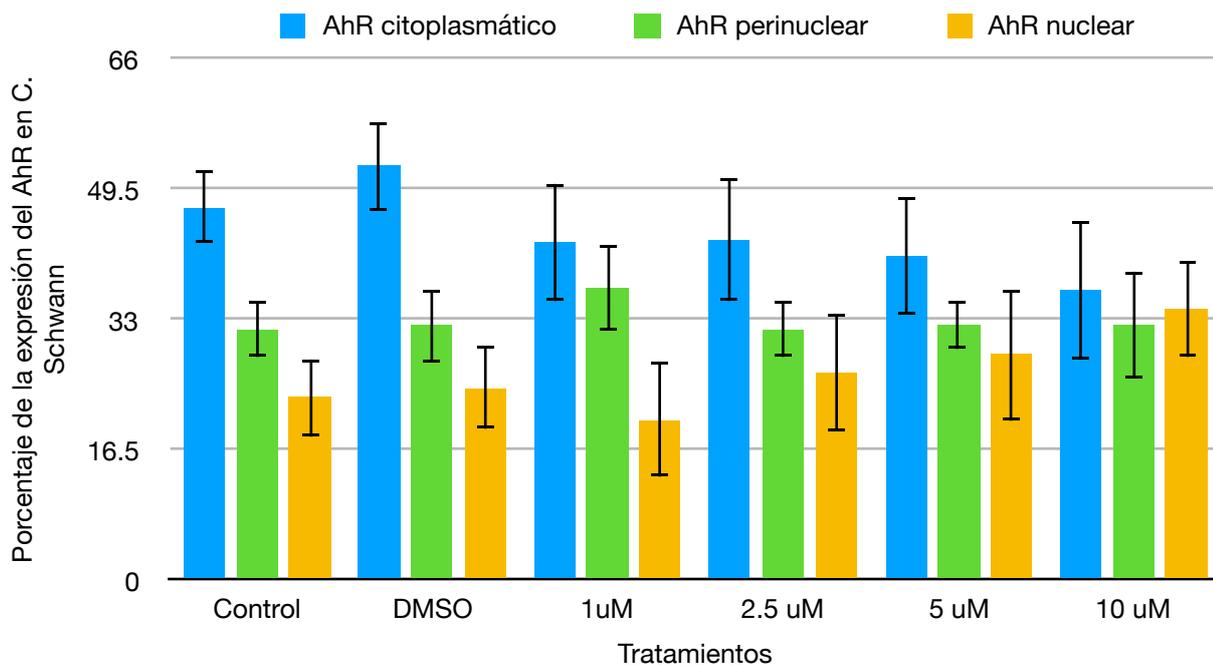


Fig. 19. Tratamiento de células de Schwann (línea S16) con xantona V por 48 h. Porcentaje de la localización celular de AhR (zonas citoplasmática, perinuclear y nuclear). ANOVA de una vía para cada zona N=3. Sin resultados estadísticamente significativos.

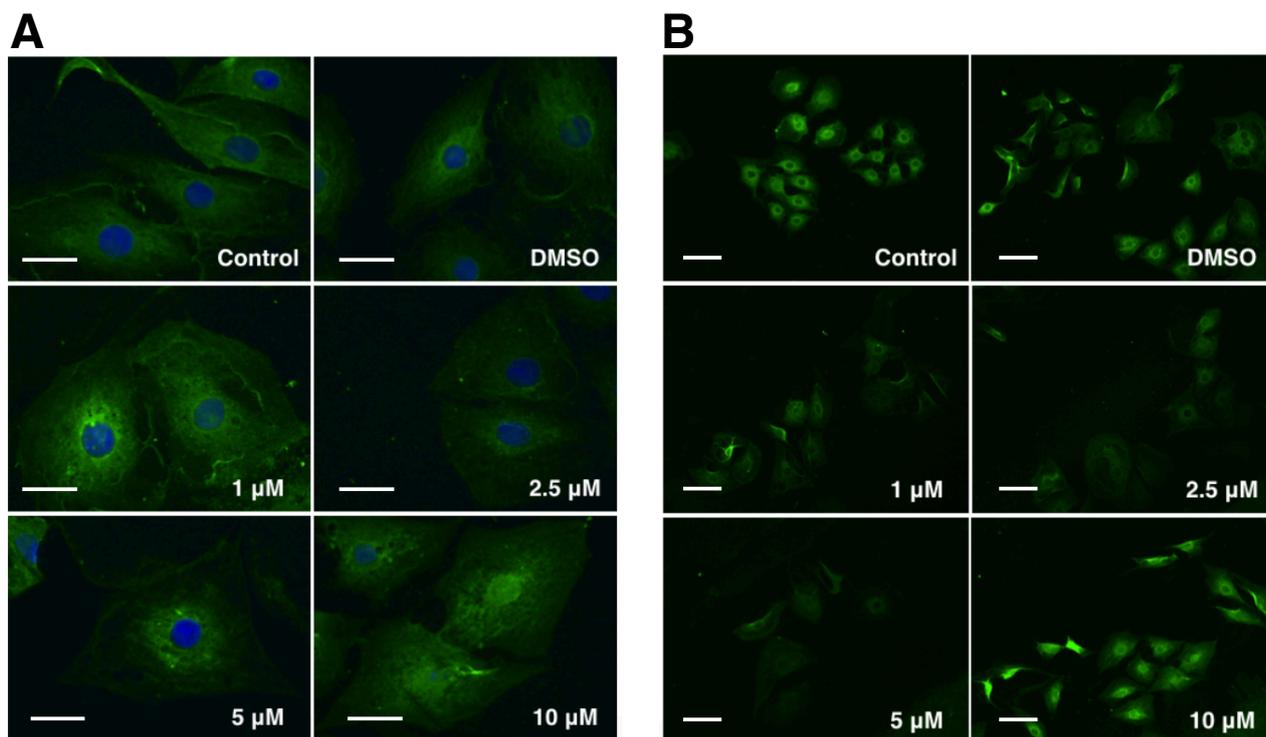


Fig. 20. Tratamiento de células de Schwann (línea S16) con xantona V por 48 h. Localización del AhR en citoplasma (Control, DMSO y concentración de 1 μM), en la zona perinuclear (concentraciones de 2.5 y 5 μM) y en núcleo (concentración de 10 μM). Panel A) Células observadas en un aumento de 40X. Panel B) Células observadas en un aumento de 10X. Escala = 100 μm. Anticuerpo primario: AhR de cabra policlonal M-20 Santa Cruz. Anticuerpo secundario: Alexa Fluor 488 burro anti-cabra.

## **Discusión**

### **Citotoxicidad de la xantona V en células de Schwann**

Los metabolitos secundarios de organismos vegetales, también llamados productos naturales, poseen diversos efectos, algunos de los cuales pueden ser adversos e incluso perjudiciales bajo ciertas condiciones; la concentración y tiempo de exposición; o bien, el órgano o célula blanco y su susceptibilidad, son factores que influyen en la actividad de la molécula en cuestión y en su efecto final.

Como se mencionó anteriormente, los polifenoles son los metabolitos secundarios más comunes y con un mayor número de propiedades atribuidas; dentro de este grupo se encuentran las xantonas, familia de compuestos con una estructura base idéntica, que les confiere propiedades y efectos similares; aunque el grado de estos, varía con relación al tipo y posición de los grupos funcionales.

En este trabajo se estudió por primera vez el efecto de la xantona V en células de Schwann; previamente en nuestro equipo de trabajo se determinaron como no citotóxicas las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de xantona V en un tiempo de 48 h en astrocitos corticales de rata en cultivo primario (Serrano-López, 2016).

Bajo condiciones similares, se probaron las mismas concentraciones en dos tiempos (24 y 48 h) y se utilizó el método de MTT para evaluar la respuesta. Se obtuvieron resultados que indicaban la disminución de la viabilidad de las células de Schwann de rata a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de xantona V si la exposición tenía una duración de 48 h; lo que fue consistente con lo observado al microscopio.

En 2008, Isakovic y cols. evaluaron los efectos de dos xantonas de la especie *Gentiana kochiana* en células del glioma, astrocitos y macrófagos, encontrando una mayor resistencia a los compuestos por parte de los astrocitos y macrófagos en comparación a las células de glioma. Por lo tanto, estos resultados sumados a lo reportado por Serrano-López, 2016, sugieren que los astrocitos corticales son más resistentes que las células de Schwann de rata y otros tipos celulares ante compuestos de la familia de las xantonas.

Se sabe que las xantonas preniladas como la xantona V; poseen actividades antiproliferativas y algunos efectos citotóxicos. La estructura base, el tipo de sustituyentes y la posición molecular de estos, determinan las formas en que las xantonas interactúan en los sistemas vivos e influyen en la efectividad de su participación en los procesos celulares a través de los cuales llevan a cabo el arresto del ciclo celular y en algunos casos la muerte celular (Isakovic *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2004; Sato *et al.* 2004).

### **1. Citotoxicidad dependiente de la estructura molecular**

Los efectos citotóxicos de las xantonas, se atribuyen por un lado a la versatilidad de muchos polifenoles de formar compuestos prooxidantes como las quinonas; en especial aquellos con catecoles en su estructura y que se encuentran en contacto directo con especies reactivas de oxígeno (ROS)(Pardo-Andreu *et al.*, 2007), pues son capaces de afectar las estructuras y funciones de organelos u otras moléculas clave como el glutatión, DNA o proteínas de membrana y generar distintos efectos tóxicos (Andreu *et al.*, 2005; Awad *et al.*, 2002; Galati *et al.*, 2001; Walle *et al.* 2003).

En el trabajo de Sang y cols., 2005, se demostró con la epigallocatequina-3-galato, uno de los polifenoles más abundante del té verde; que ciertas condiciones en el cultivo celular como el pH, temperatura, los niveles de oxígeno, los iones metálicos, así como la concentración del compuesto disuelto en el medio, afectan la estabilidad de éste, reduciendo o manteniendo su vida media e incluso promoviendo la aparición de moléculas prooxidantes que contribuyen a la apoptosis celular. Lo que también se ha reportado en otros estudios (Hong *et al.*, 2002).

## **2. Citotoxicidad por la interacción con mitocondrias celulares.**

Las xantonas pueden desempeñar diferentes papeles, a través de múltiples vías, para llevar al arresto y/o muerte celular. De acuerdo con la evidencia reportada en la literatura una de las principales formas es la despolarización de la membrana mitocondrial, la cual es entendida como una “permeabilidad transicional”, que al impedir la función de la membrana como barrera selectiva, desencadena una pérdida del gradiente protónico, ocasionando el desacoplamiento de la cadena respiratoria y un cese en la producción de ATP, lo que aunado con la ruptura de la membrana externa y la liberación del contenido mitocondrial, que incluye factores apoptóticos como el citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF), Smac/Diablo, HyrA2/Omi, endonucleasa G, finalmente provocan la muerte celular (Dallaporta *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 2004). La disipación del potencial de membrana mitocondrial es uno de los primeros eventos en el proceso de muerte celular; el cual, además es irreversible (Kroemer, 2003).

El mecanismo por el que se da esta despolarización mitocondrial no se tiene del todo claro, dado el número de causantes (concentraciones elevadas de calcio, especies reactivas de oxígeno, esfingolípidos, estrés genotóxico, proteasas, etc. (Kroemer, 2003)) y/o las vías involucradas (vía de de la familia Bcl-2, vía MAPK, vía de las caspasas, vía de

JNK, etc. (Surh, 2003; Tsujimoto, 2003)) en donde las xantonas podrían ser promotoras de manera indirecta.

Aunque también es posible que las xantonas actúen en o sobre la mitocondria directamente, como mencionan Matsumoto y cols. en su estudio de 2004 con células HL60 en el que ellos no encontraron una participación significativa de vías importantes como la de las caspasas, la de Bcl-2 o MAPK; sin embargo, encontraron una relación entre el número de hidróxilos y la capacidad de la molécula de reducir la selectividad de la membrana mitocondrial, esta posibilidad de la unión directa entre la xantona y la mitocondria se refuerza al comparar estructuralmente derivados xantónicos y tintes fluorescentes específicos de mitocondria como dihidrorodamina 123 y Mito Tracker Orange CM-H2TMRos (Isakovic *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2004).

Desafortunadamente por el momento no es posible sugerir algún mecanismo por el cual la xantona V resulta tóxica para las células de Schwann debido a la falta de evidencias que guíen hacia una posibilidad; sin embargo, es probable que se trate por la degradación del compuesto a subproductos prooxidantes, considerando el tiempo que permanece en el medio de cultivo o bien, a través de una vía indirecta ya que los efectos tóxicos se presentan hasta las 48 h.

### **Activación de AhR en presencia de xantona V**

En 2003, Amakura y cols. evaluaron la capacidad de 95 compuestos diferentes de origen vegetal para activar al Receptor de Hidrocarburos de Arolo (AhR); este estudio permitió obtener varias conjeturas. La primera de ellas se relaciona con las dosis efectivas de estos compuestos, las cuales oscilan entre 1 y 100  $\mu\text{M}$  con incubaciones de 24 h, rango en el que se encontró actividad por parte de la xantona V (10  $\mu\text{M}$  desde 24 h). Además, se

reportó la relación estructura-actividad al translocar y activar de forma efectiva el AhR, siendo los aspectos más importantes el tamaño molecular, la polaridad y la distribución espacial.

Las isoflavonas se presentan como los compuestos con mayor potencial inductor, cuya estructura base presenta los mismos grupos funcionales y una vez más, se recalcó la importancia de los sustituyentes en la actividad. La presencia de grupos hidróxilo en ciertos carbonos (como el grupo hidroxilo en C-3 del anillo C) debilita la actividad de los compuestos o la aumenta (como los grupos hidróxidos en C-4, C-5 y C-6 del anillo A en baicaleína y crisina) en flavonas y flavonoles. De la misma manera se reportó que los grupos glucósidos, reducen la capacidad inductora de los compuestos (Amakura *et al.*, 2003). Posteriormente; en 2008, el mismo grupo de trabajo, describió los efectos agonistas (altas concentraciones) y/o antagonistas (bajas concentraciones) en la activación de AhR dependientes de la dosis de algunos polifenoles *in vitro*.

En vertebrados, el AhR se expresa en varios tipos celulares y tejidos en donde desempeña diferentes funciones, como las mencionadas con anterioridad. Particularmente en el SNP, las investigaciones han sido escasas. Shackleford y cols. en 2018, reportaron la presencia de AhR en células de Schwann, lo cual se corroboró en este trabajo y en nervio ciático. Sus estudios, determinaron un papel fundamental del AhR en células de Schwann durante el proceso de mielinización, en etapas tempranas del desarrollo; así como su participación, aunada con la de otras vías, en el desarrollo de neurofibromas plexiformes (PNFs) y tumores malignos de la vaina del nervio periférico (MPNSTs), lo que implica su participación en el ciclo celular.

Desde finales del siglo pasado, se tiene conocimiento sobre la participación reguladora (proliferativa y pro-apoptótica, dependiendo de las condiciones) del AhR en el ciclo celular, independientemente del ligando (Marlowe & Puga, 2005; Puga *et al.*, 2002). Sin embargo, este papel del AhR se ve alterado en presencia de ciertos ligandos. Se ha demostrado que diferentes ligandos, incluyendo los canónicos y de interés para este trabajo como TCDD y algunos flavonoides como la quercetina, son capaces de arrestar el ciclo celular y/o provocar apoptosis a través de AhR (Laiosa *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2003; Hamidullah *et al.*, 2015). O bien, participar en el arresto celular y/o apoptosis a través de otras vías con un papel menos protagónico como ligando de AhR (Reiners *et al.*, 1999; Koliopanos *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2012).

En el caso de la xantona V, es muy probable que participe en acciones anti-proliferativas y apoptóticas de forma independiente a AhR, pues en los experimentos realizados en este proyecto, no coincidió la expresión del factor de transcripción en núcleo con los primeros efectos de muerte celular. Ciertamente, se observó una movilización celular del AhR dependiente de la concentración de la xantona y el tiempo de exposición, hacia la zona periférica del núcleo en la mayoría de los casos, aunque sin el ingreso del factor de transcripción al núcleo hasta la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (a 48 h), lo que sugiere que la xantona V funciona como un ligando que modifica la estructura conformacional de la proteína, promoviendo su movilización, aunque considerando que el AhR interviene en múltiples eventos celulares y que es activado por ligandos exógenos, algunos de los cuales tienen gran afinidad hacia el sitio de unión; existen otros mecanismos de regulación para este factor de transcripción (Oesch-Bartlomowicz, 2009)

En 2004, Ikuta y cols., propusieron un mecanismo de dos pasos para la importación nuclear dependiente de ligando de AhR; en primer lugar es necesario la interacción de un ligando de AhR al sitio de unión, que modifique la conformación espacial, facilitando la interacción de las secuencias de localización nuclear (NLS) del dominio bHLH (AhR 13-16: RKRR y AhR 37-39: KRH) con los componentes de importación nuclear y en segundo lugar la desfosforilación de los dos sitios PKC adyacentes a la NLS bipartita (Ser-12 y Ser-36), ya que la fosforilación de estos sitios participa de manera negativa (inhibe) en la importación del factor.

La relación entre AhR y la fosforilación ha sido estudiada a lo largo de estos años, aumentando nuestro conocimiento sobre estos procesos y los escenarios en los que están involucrados. Particularmente, en la regulación de la importación nuclear de AhR, se ha identificado la importancia de la proteína XAP2; por un lado se reconoció como trascendente la fosforilación de Ser-53 de XAP2, pues sin ello dicha proteína asociada a AhR en el citoplasma es incapaz de ingresar al núcleo (Dull *et al.*, 2002); así como la interacción entre XAP2 y PDE2A (fosfodiesterasa tipo 2A), ya que resulta reducida la translocación nuclear de AhR dependiente de dioxinas y de cAMP, cuando XAP2 y PDE2A se unen a través la región carboxilo terminal rica en tetratricopéptidos (TPR) que median interacciones proteína-proteína de XAP2 y el dominio GAF-B de PDE2A (de Oliveira *et al.*, 2007). También se ha reconocido la participación de la proteína tirosina-cinasa pp60<sup>src</sup>, asociada al complejo de arresto de AhR en citoplasma que, al activarse por la unión del ligando a AhR y dependiente de la dosis, se libera de dicho complejo desencadenando una serie de fosforilaciones de varias cinasas, que posiblemente estén implicadas en la translocación nuclear de AhR (Blankenship & Matsumara, 1997).

Estas evidencias, resaltan la relación entre afinidad de ligando, la dosis y la efectividad para desencadenar la fosforilación de cinasas que pudiesen estar implicadas en la translocación nuclear. Además de demostrar que la regulación de la actividad del AhR inicia desde la translocación, aunque existen otros a diferentes niveles de la ruta; lo que resulta lógico considerando el número de procesos celulares en los que participa y el sitio de unión a ligando promiscuo que posee, pues ante una exposición prolongada a contaminantes como la que se tiene en la actualidad, su activación incontrolada afectaría una gran variedad de funciones celulares. Por otro lado, resultaría sumamente útil conocer el mecanismo puntual que regula la entrada al núcleo de AhR aunado a la unión con ligando en células de Schwann que pudiera incluso participar en la producción de mielina, función que, salvo los oligodendrocitos, ningún otro tipo celular posee. Este conocimiento permitiría proponer alguna de las vías como blanco para tratamientos de diferentes enfermedades asociadas a mielinización, inflamación, inmunidad o bien, a aspectos relacionados con el ciclo celular.

### **Densidad celular y su relación con AhR en células de Schwann.**

Durante el establecimiento del cultivo de las células de Schwann S16 se notó la activación y translocación de AhR al núcleo, independientemente a la presencia de un ligando, inducida, en este caso, por la densidad celular, lo cual también había sido reportado por el grupo de Ikuta y el de Cho en 2004, en sus estudio realizado con una línea celular de queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos (10T1/2), respectivamente; ellos notaron que el AhR es nuclear en densidades dispersas mientras que es citoplasmática a mayor confluencia, efecto que asociaron con el contacto celular. El comportamiento de las células de Schwann S16 fue completamente opuestos a lo encontrado en queratinocitos y fibroblastos, ya que confluencias de 95-100% promovían la translocación del AhR a núcleo, el cual se encontraba en citoplasma en células dispersas.

Se debe tener en cuenta las propiedades intrínsecas de cada tipo celular, pues tales experimentos fueron realizados en queratinocitos y fibroblastos, respectivamente; a diferencia de los nuestros, en células de Schwann, por lo que existen discrepancias en múltiples factores; sin embargo; son interesantes los resultados obtenidos en sus estudios. En primer lugar, y como ya se había abordado con anterioridad la caracterización de los elementos y sitios de las señales de localización nuclear y exportación nuclear de AhR; así como la propuesta de un sistema de encendido y apagado dependiente de procesos de fosforilación y desfosforilación, lo que invariablemente participa en la distribución de AhR en la célula. Las vías involucradas, así como los factores que promueven estos eventos muy posiblemente depende de cada tipo celular, sus funciones y el ambiente en el que se presenten.

Igual de importante resultaron algunos otros descubrimientos durante su estudio, tales como el mantenimiento de la actividad de importación nuclear aún a alta confluencia, la relación entre la localización de AhR con las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular lo que se relaciona con las E-cadherinas, la aparente irrelevancia del ciclo celular en la distribución de AhR, la actividad transcripcional del AhR cuando es nuclear, así como la activación de AhR en los queratinocitos involucrados en una lesión (situación similar en la que células de Schwann están involucradas) y la propuesta de participación de p38-MAPK, relacionado a eventos de estrés (Ikuta *et al.*, 2004).

Además de identificar que la inhibición del contacto célula-célula y célula-sustrato (a través de suspensión celular, agitación mecánica y siembra subconfluente), promueve la activación de AhR transitoria, independiente a algún ligando (agonistas endógenos y exógenos o antagonistas exógenos), aunque si afectado por la formación de agregados celulares. Tal activación es independiente al ciclo celular como lo descrito en el trabajo de

Ikuta y cols. 2004. La promoción de AhR al núcleo comparte ciertos elementos, aunque posee particularidades dependiendo del promotor (HSP90, proteosoma) incluyendo los sitios de unión (niveles de AhR nucleares similares, diferente tasa de transcripción) (Cho *et al.*, 2004).

Es prudente destacar que ellos se enfocan en la señal de exportación nuclear para explicar sus resultados, sin involucrarse con la señal de localización nuclear, la cual posee el mismo sistema de encendido y apagado dependiendo de los eventos de fosforilación, por lo que la desfosforilación, que ellos proponen para NES, cuando se da el contacto célula-célula, también podría aplicar para LNS. Esto en conjunto con la activación de AhR en los queratinocitos involucrados en la reparación de una lesión, permite pensar que la LNS es desfosforilada cuando el contacto celular se da en los tipos involucrados en regeneración, como es el caso de las células de Schwann, quienes participan en la degeneración walleriana inducida por una lesión, así como en eventos posteriores (Jessen & Mirsky, 2016).

Sasagasaki y colaboradores en 1996 demostraron que las condiciones de cultivo de la línea S16 (presencia/ausencia de SBF y densidad celular) influyen en la expresión de las proteínas mielinizantes, particularmente P0 y MAG. Notando que la expresión de proteínas mielinizantes tiene una relación directamente proporcional a la densidad y a la tasa de proliferación, lo que aunado a la participación de AhR en células de Schwann, como un regulador de la expresión de ciertas proteínas mielinizantes y reafirmado con lo demostrado por Juricek y colaboradores en 2017, en donde la ausencia de AhR se asocia con una vaina de mielina del nervio óptico alterada al presentar modificaciones en la composición lipídica de ésta, así como en la expresión de MAG, permiten suponer otras hipótesis en donde efectivamente la localización de AhR se asocia a la densidad celular

(contacto celular) dado su papel regulatorio en la expresión a la alza de las proteínas mielinizantes, en especial MAG, característica muy particular de la línea S16 y relevante en una de las fases con mayor proliferación, los primeros días de nacimiento (Yin *et al.*, 1998), su papel junto a P0 y PMP22 en la remielinización posterior a la degeneración walleriana (Lemke, 1988) o bien, un regulación a la baja importante en la degeneración walleriana, ya que las células de Schwann sufren una conversión de mielinizantes o no mielinizante, a través de la supresión de las proteínas mielinizantes a un fenotipo de reparación que promueve la generación de factores tróficos, citocinas inflamatorias, reclutamiento de macrófagos, autofagia de la mielina y aumentan su proliferación formando cadenas longitudinales conocidas como bandas de Büngner, a través de las cuales guían y estimulan el crecimiento del nuevo axón (Lemke, 1988; Jessen & Mirsky, 2016).

De cualquier manera, estos resultados muestran algunos de los elementos celulares que influyen en la localización celular y los posibles caminos en los que se pueden enfocar futuras investigaciones con el objetivo de elucidar cuales son los factores que involucrados en distribución nuclear de AhR en células de Schwann en confluencia y el porqué de las diferencias con otros tipos celulares.

## Conclusiones

- La xantona V (1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona) no mostró toxicidad en células de Schwann a concentraciones iguales o menores de 10  $\mu\text{M}$  a 24 h; sin embargo, a 48 h, la concentración 10  $\mu\text{M}$  disminuyó la viabilidad celular en un 40%. Efecto independiente a AhR.
- La xantona V, como algunos otros polifenoles, posee actividad en los sistemas biológicos y tiene un efecto sobre el AhR, apreciable a 48 h en concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$ , observándose una movilización celular de dicho factor de transcripción.
- Otro de los elementos que influye sobre la localización del AhR además de ligandos, es la densidad celular, pues se observó una translocación del AhR al núcleo cuando las células eran mantenidas en una confluencia del 90-100%, sin aplicar tratamiento alguno. Este resultado es importante en el estudio del AhR, ya que este factor debe ser regulado y cuidado para no obtener falsos positivos en otros estudios.

## **Perspectivas**

En este trabajo se probó que ciertas concentraciones de xantona V, resultan tóxicas para las células de Schwann *in vitro*; el siguiente paso es determinar el o los mecanismos a través de los cuales la xantona promueve la muerte celular, lo que resultaría útil para evitar tal efecto citotóxico o en casos particulares, inducirlo.

Por otro lado, se demostró que la xantona V es capaz de promover la movilización celular de AhR. Evaluar los efectos a nivel molecular, de la traslación de AhR, al inducirlo con un ligando exógeno natural, permitiría conocer las vías en las que está involucrado AhR en células de Schwann y comparar los resultados, con lo ya reportado en otros tipos celulares y con otros ligandos (exógenos y endógenos), así como con los nuevos descubrimientos, probablemente ayude a encontrar diferencias y similitudes que nos permitan, a futuro, predecir los efectos según la naturaleza del ligando en distintos tipos celulares.

Finalmente, considero necesario continuar con el estudio de la localización celular de AhR y su aparente relación con la densidad celular, que resultó diferente en este trabajo con lo reportado hasta entonces, ya que aumentaría el saber de los roles fisiológicos que tiene AhR en las células de Schwann, lo que además podría buscarse en otros tipos celulares involucrados en la reparación o mielinización (oligodendrocitos), permitiendo conocer el porqué de las discrepancias, complementando lo dicho en el párrafo anterior.

## Referencias

1. Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Kitagawa, H., Fujino, J., Sasaki, K., Toyoda, M., Yoshida, T., Maitani, T. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay. *Biol Pharm Bull*, 26(4), 532-539.
2. Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Nakamura, M., Yoshida, T., & Maitani, T. (2008). Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay. *Phytochemistry*, 69(18), 3117-3130. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.022
3. Anaya Lang, A. L. y Cruz-Ortega, R. (2001). La alelopatía: algunos estudios de caso y posibles aplicaciones en: Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. 1 ed. Instituto de Ecología-UNAM. Plaza y Valdés Editores. México.
4. Andreu, G. L., Delgado, R., Velho, J. A., Curti, C., & Vercesi, A. E. (2005). Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch Biochem Biophys*, 439(2), 184-193. doi:10.1016/j.abb.2005.05.015
5. Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van der Woude, H., van Zanden, J., van Bladeren, P. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M. (2002). Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett*, 520(1-3), 30-34.
6. Bhatheja, K., & Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(12), 1995-1999. doi:10.1016/j.biocel.2006.05.007
7. Blanco-Ayala, T., Lugo-Huitrón, R., Serrano-López, E. M., Reyes-Chilpa, R., Rangel-López, E., Pineda, B., Medina-Campos, O. N., Sánchez-Chapul, L., Pinzón, E., Trejo-Solís, C., Silva-Araya, D., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., Pérez de la Cruz, V., Torres-Ramos, M. (2013). Antioxidant properties of xanthenes from *Calophyllum brasiliense*: prevention of oxidative damage induced by FeSO<sub>4</sub>. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 262. doi:10.1186/1472-6882-13-262
8. Blankenship, A., & Matsumura, F. (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol*, 52(4), 667-675.
9. Boutry, J. M., Hauw, J. J., Gansmuller, A., Di-Bert, N., Pouchelet, M., & Baron-Van Evercooren, A. (1992). Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin in vivo. *J Neurosci Res*, 32(1), 15-26. doi:10.1002/jnr.490320103
10. Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.
11. Busbee, P. B., Rouse, M., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2013). Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev*, 71(6), 353-369. doi:10.1111/nure.12024
12. Cardinali, D. P. (1992). Manual de Neurofisiología. Ediciones Díaz de Santos, S. A. España.

13. Carpenter, E. M., & Hollyday, M. (1992). The location and distribution of neural crest-derived Schwann cells in developing peripheral nerves in the chick forelimb. *Developmental Biology*, 150(1), 144-159. doi:[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90014-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90014-8)
14. Castañeda Fernández, J. A.; del Corral García, J. (2003). Neuropatías Periféricas. Artículo de Revisión. *MEDISAN* Vol. 7(4): 35-41.
15. Cheng, C., Qin, Y., Shao, X., Wang, H., Gao, Y., Cheng, M., & Shen, A. (2007). Induction of TNF-alpha by LPS in Schwann cell is regulated by MAPK activation signals. *Cell Mol Neurobiol*, 27(7), 909-921. doi:10.1007/s10571-007-9215-4
16. Cheng, Y. H., Li, L. A., Lin, P., Cheng, L. C., Hung, C. H., Chang, N. W., & Lin, C. (2012). Baicalein induces G1 arrest in oral cancer cells by enhancing the degradation of cyclin D1 and activating AhR to decrease Rb phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 263(3), 360-367. doi:10.1016/j.taap.2012.07.010
17. Cho, Y. C., Zheng, W., & Jefcoate, C. R. (2004). Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199(3), 220-238. doi:10.1016/j.taap.2003.12.025
18. Coons, A. H.; Kaplan, M. H. (1950). Localization of antigen in tissue cells. *Journal of Experimental Medicine*, 91 (1) 1-13. doi:10.1084/jem.91.1.1
19. Curtis, H.; Barnes, N. S.; Schnek, A.; Massarini, A. (2008). *Biología*. 7a ed. en español. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
20. da Silva, K. L., dos Santos, A. R., Mattos, P. E., Yunes, R. A., Delle-Monache, F., & Cechinel-Filho, V. (2001). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Thérapie*, 56(4), 431-434.
21. Dallaporta, B., Marchetti, P., de Pablo, M. A., Maise, C., Duc, H. T., Métivier, D., Zamzami, N., Geuskens, M., Kroemer, G. (1999). Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. *J Immunol*, 162(11), 6534-6542.
22. de Oliveira, S. K., Hoffmeister, M., Gambaryan, S., Muller-Esterl, W., Guimaraes, J. A., & Smolenski, A. P. (2007). Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 282(18), 13656-13663. doi:10.1074/jbc.M610942200
23. Dietrich, C., & Kaina, B. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*, 31(8), 1319-1328. doi:10.1093/carcin/bgq028
24. Dubový, P.; Klusáková, I.; Svíděnská, I. H (2014). Inflammatory Profiling of Schwann Cells in Contact with Growing Axons Distal to Nerve Injury. *BioMed Research International*. 2014, 7. doi:10.1155/2014/691041
25. Dull, A. B., Carlson, D. B., Petrusis, J. R., & Perdew, G. H. (2002). Characterization of the phosphorylation status of the hepatitis B virus X-associated protein 2. *Arch Biochem Biophys*, 406(2), 209-221. doi:10.1016/s0003-9861(02)00444-7.

26. Estrada Muñiz, E. (1998). Estudio químico y actividad biológica de las xantonas aisladas del duramen de *Calophyllum brasiliensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
27. El-Seedi, H. R., El-Barbary, M. A., El-Ghorab, D. M., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., Goransson, U., & Verpoorte, R. (2010). Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthonones. *Curr Med Chem*, 17(9), 854-901.
28. Fernández-Salguero, P. M.; Merino, J. M. 2010. The dioxin receptor integrates toxicity and physiology and offers a novel therapeutic target en: Elizondo Azuela, G. 2010. Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Xenobiotic Receptors. Pharmacological and Toxicological Aspects. Transworld Research Network. T.C. India.
29. Fiorentino Gómez, S.; Gutiérrez Fernández, M. F.; Rueda Ardila, N. S.; Rodríguez Rodríguez, J. A. (1994). La Inmunología en el Diagnóstico Clínico. CEJA. Ciencias Naturales Puras y Aplicadas. Colección: Textos y Manuales. Colombia.
30. Flores E. (1994). Árboles y semillas del neotrópico. Vol. 3. INISEFOR/Museo Nacional de Costa Rica. Costa Rica. 110 p.
31. Flores, W.; Fuentes, R.; Galindo, D.; González, F.; Hernández, G.; Hernández, K.; Hidalgo, I.; Zamudio del Carpio, D.; Castañeda, B.; Ibañez, L.; Larrea, H. (2008). Evaluación de los efectos antioxidante, antibacteriano y antifúngico de *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Lagarto Caspi). *Rev Horizonte Med*. Vol. 8: 7-16.
32. Fotakis, G.; Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
33. Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 270(49), 29270-29278.
34. Galati, G., Moridani, M. Y., Chan, T. S., & O'Brien, P. J. (2001). Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med*, 30(4), 370-382.
35. García Barriga, H. (1992). Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica, 2ed. Vol. 2. Tercer Mundo Editores. Colombia. 537 p.
36. García-Zebadúa, J. C., Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M., Castillo-Arellano, J. I., Santillán-Hernández, S., Vázquez-Astudillo, B., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2014). El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae*, 21(2), 126-145.
37. Ghosal, S., Biswas, K., & Jaiswal, D. K. (1980). Xanthone and flavonol constituents of *Swertia hookeri*. *Phytochemistry*, 19(1), 123-126. doi:https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85027-8
38. Goda, S., Hammer, J., Kobilier, D., & Quarles, R. H. (1991). Expression of the myelin-associated glycoprotein in cultures of immortalized Schwann cells. *J Neurochem*, 56(4), 1354-1361.

39. Gómez-Caravaca, A. M.; Verardo, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Fiorenza Caboni, M. (2014). Phenolic Compounds and Saponins in Plants Grown Under Different Irrigation Regimes en: Ross Watson, R. [Editor] (2014). *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Elsevier Inc. Book Aid International. USA.
40. González-Paredes M. (2006). Estudio etnobotánico de *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Guttiferae): Anatomía de fruto, fitoquímica y evaluación de la actividad antiviral de hojas y frutos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 129 p.
41. Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 519-561. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519
42. Hahn, M. E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, 141(1-2), 131-160.
43. Hahn, M. E., Karchner, S. I., & Merson, R. R. (2017). Diversity as Opportunity: Insights from 600 Million Years of AHR Evolution. *Curr Opin Toxicol*, 2, 58-71. doi:10.1016/j.cotox.2017.02.003
44. Hamidullah, Kumar, R., Saini, K. S., Kumar, A., Kumar, S., Ramakrishna, E., Maurya, R., Konwar, R., Chattopadhyay, N. (2015). Quercetin-6-C-beta-D-glucopyranoside, natural analog of quercetin exhibits anti-prostate cancer activity by inhibiting Akt-mTOR pathway via aryl hydrocarbon receptor. *Biochimie*, 119, 68-79. doi:10.1016/j.biochi.2015.10.012
45. Hankinson, O. (1995). The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35(1), 307-340. doi:10.1146/annurev.pa.35.040195.001515
46. Hartmann, T. (2004). Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta*, 219(1), 1-4. doi:10.1007/s00425-004-1249-y
47. Heinrich, M., & Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol*, 53(4), 425-432.
48. Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J. H., Hara, Y., & Yang, C. S. (2002). Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 62(24), 7241-7246.
49. Hooper, L., & Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *86(12)*, 1805-1813. doi:doi:10.1002/jsfa.2599
50. Houlst, J. R. S., & Payá, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 713-722. doi:https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02112-4
51. Huang, X., Powell-Coffman, J. A., & Jin, Y. (2004). The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development*, 131(4), 819-828. doi:10.1242/dev.00959

52. Hughes-García, R. (2007). Polineuropatías desmielinizantes crónicas: dificultades en el diagnóstico electrofisiológico. *Rev. HCUCh*, 18: 27-35.
53. Huson, S. (1998). Neurofibromatosis type 1: Historical perspective and introductory overview. En Cooper, D. & Upadhyaya, M. Neurofibromatosis type 1 from genotype to phenotype. BIOS Scientific Publishers Ltd. UK.
54. Ikuta, T., Kobayashi, Y., & Kawajiri, K. (2004a). Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 279(18), 19209-19216. doi:10.1074/jbc.M310492200
55. Ikuta, T., Kobayashi, Y., & Kawajiri, K. (2004b). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(2), 545-550. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.076
56. Isakovic, A., Jankovic, T., Harhaji, L., Kostic-Rajacic, S., Nikolic, Z., Vajs, V., & Trajkovic, V. (2008). Antiglioma action of xanthenes from *Gentiana kochiana*: Mechanistic and structure-activity requirements. *Bioorg Med Chem*, 16(10), 5683-5694. doi:10.1016/j.bmc.2008.03.069
57. Jessen, K. R., Mirsky, R. 2016. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*, 594(13), 3521–3531.
58. Joker, D. y Salazar, R. (2000). *Calophyllum brasiliense* Cambess. Seed Leaflet. CATIE Nota Técnica Num. 46. [Internet]. Denmark: Danida Forest Seed Centre. Available from: [http://curis.ku.dk/portal-life/files/20646780/calophyllum\\_brasiliense\\_int.pdf](http://curis.ku.dk/portal-life/files/20646780/calophyllum_brasiliense_int.pdf).
59. Juricek, L., Carcaud, J., Pelhaitre, A., Riday, T. T., Chevallier, A., Lanzini, J., Auzeil, N., Laprévotte, O., Dumont, F., Jacques, S., Letourneur, F., Massaad, C., Agulhon, C., Barouki, R., Beraneck, M., Coumoul, X. (2017). AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. *Sci Rep*, 7(1), 9794. doi:10.1038/s41598-017-09621-3
60. Koliopanos, A., Kleeff, J., Xiao, Y., Safe, S., Zimmermann, A., Buchler, M. W., & Friess, H. (2002). Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Oncogene*, 21(39), 6059-6070. doi:10.1038/sj.onc.1205633
61. Kroemer, G. (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 433-435. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00614-4
62. Laiosa, M. D., Wyman, A., Murante, F. G., Fiore, N. C., Staples, J. E., Gasiewicz, T. A., & Silverstone, A. E. (2003). Cell proliferation arrest within intrathymic lymphocyte progenitor cells causes thymic atrophy mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *J Immunol*, 171(9), 4582-4591.
63. Lambert, J. D.; Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 65-72. doi:10.1016/j.abb.2010.06.013
64. Lemke, G. (1988). Unwrapping the genes of myelin. *Neuron* 1335-543 en: Gillen, C.; Gleichmann, M.; Spreyer, P.; Müller, H. W. (1995). Differentially Expressed Genes After Peripheral Nerve Injury. *J. Neuroscience Research*, 42, 159-171.

65. Linington, C., Waehneltd, T. V., & Neuhoff, V. (1980). The lipid composition of light and heavy myelin subfractions isolated from rabbit sciatic nerve. *Neurosci Lett*, *20*(2), 211-215.
66. Loring, J. F., & Erickson, C. A. (1987). Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Dev Biol*, *121*(1), 220-236.
67. Lunn, E. R., Scourfield, J., Keynes, R. J., & Stern, C. D. (1987). The neural tube origin of ventral root sheath cells in the chick embryo. *Development*, *101*(2), 247-254.
68. Magnaghi, V., Cavarretta, I., Galbiati, M., Martini, L., & Melcangi, R. C. (2001). Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins. *Brain Research Reviews*, *37*(1), 360-371. doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00140-0)
69. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, *79*(5), 727-747. doi:10.1093/ajcn/79.5.727
70. Marlowe, J. L., & Puga, A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem*, *96*(6), 1174-1184. doi:10.1002/jcb.20656
71. Marusich, M. F.; Weston, J. A. (1992). Development of the Neural Crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 221-229.
72. Matsumoto, K., Akao, Y., Yi, H., Ohguchi, K., Ito, T., Tanaka, T., Kobayashi, E., Iinuma, M., Nozawa, Y. (2004). Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem*, *12*(22), 5799-5806. doi:10.1016/j.bmc.2004.08.034
73. Mesia-Vela, S., Sanchez, R. I., Estrada-Muniz, E., Alavez-Solano, D., Torres-Sosa, C., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Kauffman, F. C. (2001). Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*, *8*. doi:10.1078/S0944-7113(04)70070-7
74. Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development*, *13*(1), 20-25.
75. Montaner-Villalonga, J. (2008). Fisiopatología de la isquemia cerebral. Marge Medica Books. Colección: Avances en Patología Neurovascular. España.
76. Morrel, P., Quarles, R. H., Norton, W. T. (1989). Formation structure and biochemistry of myelin. In *Basic Neurochemistry Text*, 4 ed. Raven Press. New York en: Lombana, A. P.; Hurtado, H. (1993). La célula de Schwann. *J Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud.* *13*(4).
77. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunological methods*, *65*, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
78. Muñetón, V. C., Garavito, Z. V., & Hurtado, H. (1998). Cultivo de células de Schwann, un modelo del microambiente del sistema nervioso. *J Biomédica* *18*(1), 10 doi:10.7705/biomedica.v18i1.970

79. Negi, J. S., Bisht, V. K., Singh, P., Rawat, M. S. M., & Joshi, G. P. (2013). Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. *Journal of Applied Chemistry*. 2013, 9. doi: 10.1155/2013/621459
80. Oesch-Bartlomowicz, B., & Oesch, F. (2009). Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochem Pharmacol*, 77(4), 627-641. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.017
81. Orlikowski, D., Chazaud, B., Plonquet, A., Poron, F., Sharshar, T., Maison, P., Raphaël, J. C., Gherardi, R. K., Créange, A. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 and chemokine receptor CCR2 productions in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*, 134(1-2), 118-127.
82. Pardo-Andreu, G. L., Cavalheiro, R. A., Dorta, D. J., Naal, Z., Delgado, R., Vercesi, A. E., & Curti, C. (2007). Fe(III) shifts the mitochondria permeability transition-eliciting capacity of mangiferin to protection of organelle. *J Pharmacol Exp Ther*, 320(2), 646-653. doi:10.1124/jpet.106.112003
83. Pennington, T. D. y Sarukhán, J. (1998). Árboles Tropicales de México. 2a Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México. 521 p.
84. Perdomo, S., & Spinel, C. (2004). La célula de Schwann. *J Acta Biológica Colombiana*, 9(2), 10.
85. Prakash, A., Basumatary, P. C., Ghosal, S., & Handa, S. S. (1982). Chemical constituents of *Swertia paniculata*. *Planta Med*, 45(5), 61-62. doi:10.1055/s-2007-971248
86. Primo Yúfera, E. (1996). Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Rojo I. Editorial Reverté. Universidad Politécnica de Valencia. España.
87. Puga, A., Xia, Y., & Elferink, C. (2002). Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem Biol Interact*, 141(1-2), 117-130.
88. Quarles, R. H. (2007). Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem*, 100(6), 1431-1448. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x
89. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr Hosp*, 27(1), 76-89. doi: 10.1590/s0212-16112012000100009
90. Reiners, J. J. J., Clift, R., & Mathieu, P. (1999). Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis*, 20(8), 1561-1566. doi:10.1093/carcin/20.8.1561
91. Repetto Jiménez, M.; Repetto Kuhn, G. (2009). Toxicología Fundamental. 4ed. Ediciones Díaz de Santos.
92. Sang, S., Lee, M.-J., Hou, Z., Ho, C.-T., & Yang, C. S. (2005). Stability of Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Formation of Dimers and Epimers under Common Experimental Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9478-9484. doi:10.1021/jf0519055

93. Sartori, N. T., Canepelle, D., de Sousa, P. T., Jr., & Martins, D. T. (1999). Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *J Ethnopharmacol*, 67(2), 149-156.
94. Sasagasako, N., Toda, K., Hollis, M., & Quarles, R. H. (1996). Myelin gene expression in immortalized Schwann cells: relationship to cell density and proliferation. *J Neurochem*, 66(4), 1432-1439.
95. Sato, A., Fujiwara, H., Oku, H., Ishiguro, K., & Ohizumi, Y. (2004). Alpha-mangostin induces Ca<sup>2+</sup>-ATPase-dependent apoptosis via mitochondrial pathway in PC12 cells. *J Pharmacol Sci*, 95(1), 33-40.
96. Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
97. Serrano López, E. M. (2014). Modulación de Marcadores Neuroinflamatorios por la Xantona V aislada del Duramen de *Calophyllum brasiliense* en Astrocitos Corticales de Rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
98. Shackelford, G., Sampathkumar, N. K., Hichor, M., Weill, L., Meffre, D., Juricek, L., Laurendeau, I., Chevallier, A., Ortonne, N., Larousserie, F., Herbin, M., Bièche, I., Coumoul, X., Beranek, M., Baulieu, E. E., Charbonnier, F., Pasmant, E., Massaad, C. (2018). Involvement of Aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(6), E1319-e1328. doi:10.1073/pnas.1715999115
99. Silverthorn, D. U.; Johnson, B. R. (2013). Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 6 ed. Editorial Médica Panamericana. México.
100. Snell, R. (2003). Neuroanatomía Clínica. Editorial Medica Panamericana. Argentina.
101. Soto-Núñez JC. (1995). Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del río Balsas: Estado de Michoacán y Guerrero, México. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 231 p.
102. Spritz, N., Singh, H., & Geyer, B. (1973). Myelin from human peripheral nerves. Quantitative and qualitative studies in two age groups. *J Clin Invest*, 52(2), 520-523. doi:10.1172/jci107210
103. Stevens, E. A., Mezrich, J. D., & Bradfield, C. A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, 127(3), 299-311. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x
104. Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780. doi:10.1038/nrc1189
105. Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R. M., Loeb, J. A., Shrager, P., Chao, M. V., Falls, D. L., Role, L., Salzer, J. L. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*, 47(5), 681-694. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.017

106. Toda, K., Small, J. A., Goda, S., & Quarles, R. H. (1994). Biochemical and cellular properties of three immortalized Schwann cell lines expressing different levels of the myelin-associated glycoprotein. *J Neurochem*, 63(5), 1646-1657.
107. Tortora, G. J.; Derrickson, B. (2013). Principios de Anatomía y Fisiología. 13 ed. Editorial Médica Panamericana. México.
108. Trapani, V., Patel, V., Leong, C. O., Ciolino, H. P., Yeh, G. C., Hose, C., Trepel, J. B., Stevens, M. F. G., Sausville, E. A., Loaiza-Perez, A. I. (2003). DNA damage and cell cycle arrest induced by 2-(4-amino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazole (5F 203, NSC 703786) is attenuated in aryl hydrocarbon receptor deficient MCF-7 cells. *Br J Cancer*, 88(4), 599-605. doi:10.1038/sj.bjc.6600722
109. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. *Calophyllum brasiliense* Cambess. [Internet]. Saint Louis, Missouri, U.S. [citado 2017 Nov 12]. Available from: <http://www.tropicos.info/Name/7800054?langid=66>.
110. Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*, 195(2), 158-167. doi:10.1002/jcp.10254
111. Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2016). Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(1), 54-67.
112. Wagner, R., & Myers, R. R. (1996). Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience*, 73(3), 625-629.
113. Walle, T., Vincent, T. S., & Walle, U. K. (2003). Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem Pharmacol*, 65(10), 1603-1610.
114. Weston, J. A. (1963). A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev Biol*, 6, 279-310.
115. Wu, D., Potluri, N., Kim, Y., & Rastinejad, F. (2013). Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Mol Cell Biol*, 33(21), 4346-4356. doi:10.1128/mcb.00698-13
116. Xu, J.; Lacoske, M. H., Theodorakis, E. A. (2014). Neurotrophic Natural Products: Chemistry and Biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 956 – 987. doi:10.1002/anie.201302268
117. Yang, F. C., Ingram, D. A., Chen, S., Hingtgen, C. M., Ratner, N., Monk, K. R., Clegg, T., White, H., Mead, L., Williams, D. A., Kapur, R., Atkinson, S. J., Clapp, D. W. (2003). Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1<sup>+/-</sup> mast cells. *J Clin Invest*, 112(12), 1851-1861. doi:10.1172/jci19195

“La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando” - Pablo Picasso

118. Yang, S. Y., Ahmed, S., Satheesh, S. V., & Matthews, J. (2018). Genome-wide mapping and analysis of aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR)-binding sites in human breast cancer cells. *Arch Toxicol*, 92(1), 225-240. doi:10.1007/s00204-017-2022-x
119. Yin, X.; Crawford, T. O.; Griffin, J. W.; Tu, P.; Lee, V. M. Y.; Li, C.; Roder, J.; Trapp, B. D. (1998). Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal that Modulates the Caliber of Myelinated Axons. *J. Neuroscience*, 18(6), 1953–1962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-06-01953.1998>
120. Zimmer, C.; Le Dourain, N. (1993). Neural Crest Lineage. en: Dick, P. J., Thomas P. K. Peripheral Neuropathy. N. Y., USA.

#### Referencias imágenes

Autor desconocido (s/f). Glial Cells of the PNS. The PNS has satellite cells and Schwann cells. [Figura] Recuperado de: Capítulo 12.2. Nervous tissue en: Anatomy and Physiology. Open Textbook en: <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/12-2-nervous-tissue/>

Autor desconocido. (2006). The development of the Schwann cell. [Figura]. Recuperado de: Bhatheja, K., & Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(12), 1995-1999. doi:10.1016/j.biocel.2006.05.007

Autor desconocido. (2016). Abstract image. [Figura]. Recuperado de: Jessen, K. R., Mirsky, R. 2016. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*, 594(13), 3521–3531.

Autor desconocido. (2013). The overall structure of the mouse AHR PAS-A domain. (A) Schematic representation of domain compositions of the AHR and ARNT proteins. [Figura]. Recuperado de: Wu, D., Potluri, N., Kim, Y., & Rastinejad, F. (2013). Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Mol Cell Biol*, 33(21), 4346-4356. doi:10.1128/mcb.00698-13

Autor desconocido. (2010). Proposed xanthone biosynthesis pathway in *Gentiana lutea*, according to analyses in which plants were fed <sup>14</sup>C-labeled phenylalanine or <sup>14</sup>C-labeled acetate. [Figura]. Recuperado de: El-Seedi, H. R., El-Barbary, M. A., El-Ghorab, D. M., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., Goransson, U., & Verpoorte, R. (2010). Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthones. *Curr Med Chem*, 17(9), 854-901.

Tarciso Leao. (2004). Sin título. [Imagen] Recuperado de: <http://www.inaturalist.org/taxa/83122-Calophyllum-brasiliense>

Orwa, C.; Mutua, A.; Kindt, R.; Jamnadass, R.; Simons, A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya. [Imagen] Recuperado de: [http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Calophyllum\\_brasiliense.PDF](http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Calophyllum_brasiliense.PDF)

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. *Calophyllum brasiliense* Cambess. [Internet]. Saint Louis, Missouri, U.S. [citado 2017 Nov 12]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/7800054?tab=distribution>