

# Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central

Marisol Orozco-Ibarra<sup>1</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>2</sup>

## RESUMEN

La hemo oxigenasa (HO) cataliza la conversión del grupo hemo en biliverdina,  $\text{Fe}^{2+}$  y monóxido de carbono. Después, la biliverdina es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa. En mamíferos, se conocen dos isoformas de esta enzima: HO-1 es una proteína de 32 kDa que se induce por numerosos estímulos y la HO-2 es una proteína constitutiva de 36 kDa abundante en cerebro y testículos. A pesar de que ambas isoformas catalizan la misma reacción, difieren en sus características bioquímicas, regulación génica, estructura molecular y distribución tisular, por lo que se ha sugerido que las isoformas de HO podrían tener diferentes funciones celulares. El estudio *pos mortem* de cerebros humanos ha arrojado evidencias que relacionan la expresión de la HO-1 con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington. Por otro lado, la HO-2 es la isoforma predominante en el tejido nervioso y vasculatura cerebral, hay evidencia de su importancia en la señalización celular y como sensor de oxígeno, óxido nítrico y monóxido de carbono también reservorio de grupo hemo. Asimismo, se ha encontrado evidencia de que la HO-2 confiere neuroprotección en procesos de isquemia. Además, se ha encontrado que los productos de la HO poseen una función importante en los procesos celulares; por ejemplo, bilirrubina y biliverdina poseen actividad antioxidante, el monóxido de carbono funciona como molécula de señalización y vasodilatador, el  $\text{Fe}^{2+}$  induce la expresión de ferritina. Estos datos sustentan la necesidad de profundizar el estudio de la función de la HO en el sistema nervioso central.

**Palabras clave:** bilirrubina, monóxido de carbono, hemo oxigenasa, sistema nervioso central.

.....

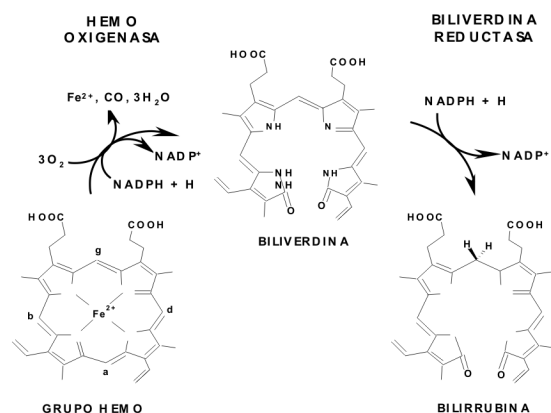
## Heme oxygenase: general aspects and importance in the central nervous system

## ABSTRACT

Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme that degrades heme and produces ferrous iron, carbon monoxide and biliverdin, the latter being converted to bilirubin through biliverdin reductase. In mammals, there are at least two functionally active HO isozymes, HO-1 is a 32-kDa protein that is inducible by numerous noxious stimuli and HO-2 is a constitutively synthesized 36-kDa protein that is abundant in brain and testis. In spite of both isozymes catalyze heme degradation by a similar mechanism, they exhibit significant differences in their molecular structure, biochemical characteristics, tissue distribution and gene regulation, which suggests that HO isoforms may have distinct cellular functions. *Pos mortem* studies on human brains have shown that HO-1 expression is involved with the pathology of neurodegenerative diseases such as Alzheimer, Parkinson and Huntington. On the other hand, HO-2 is the predominant isozyme of the nervous tissue and cerebral vessels and is evidence about its role in cell signaling, as intracellular sensor of oxygen, nitric oxide and carbon monoxide is increasing. Also, it has been found that HO 2 confers neuroprotection against cerebral ischemia. In addition, it is now known that the products of HO reaction have an important role in the cell. For example, bilirubin and biliverdin exhibit antioxidant activity, carbon monoxide is a signaling molecule and a vasodilator and  $\text{Fe}^{2+}$  induces ferritin expression. Therefore, additional studies about the HO function in the nervous system are needed.

**Key words:** bilirubin, carbon monoxide, heme oxygenase, central nervous system.

La hemo oxigenasa (HO, EC 1.14.99.3) es la enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de degradación del grupo hemo; sus productos son monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina. En una reacción posterior, la biliverdina reductasa (EC. 1.3.1.24) produce bilirrubina a partir de biliverdina (figura 1)<sup>1,2</sup>. La mayor actividad de HO se encuentra en el bazo, aunque se ha detectado en otros tejidos. En mamíferos, se ha descrito la expresión de al menos dos isoformas funcionales de HO codificadas por genes diferentes, cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas sólo en 43%<sup>2,3</sup> y se denominan HO-1 y HO-2. Aunque la reacción que catalizan es esencialmente la misma, estas isoenzimas presentan diferencias en sus características bioquímicas, peso molecular, distribución tisular y regulación génica<sup>2</sup>. En la tabla 1 se resumen algunas de sus características.



**Figura 1.** Reacción que catalizan hemo oxigenasa y biliverdina reductasa.

**Tabla 1.** Características de las isoformas de la HO.

| Característica    | HO-1                             | HO-2                      | Referencia     |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------|
| Tipo de expresión | Inducible                        | Constitutiva              | 2, 3, 4, 5, 6. |
| PM (kDa)          | 32                               | 36                        |                |
| Km*               | 0.24 $\mu\text{M}$               | 0.40 $\mu\text{M}$        |                |
| Vmax*             | 3.4 $\mu\text{mol/mg/h}$         | 0.24 $\mu\text{mol/mg/h}$ |                |
| Sitios            | NF $\kappa$ B, Nrf2, AP-1, AP-2, | Glucocorticoide           | 7, 8           |
| Regulatorios**    | C/EBP, USF, MRE, HSE             | s                         |                |

\*Datos obtenidos usando como sustrato el grupo hemo. \*\* C/EBP: proteínas de unión al intensificador CCAAT, USF: factor de estimulación en el extremo, MRE: elemento de respuesta a metales, HSE: elemento de respuesta a choque térmico.

### Grupo hemo

Es un complejo de  $\text{Fe}^{2+}$  con protoporfirina IX (figura 1), si el estado de oxidación del hierro es 3+, la molécula se conoce como hemina. El grupo hemo es una molécula esencial para la vida de los organismos aerobios, al servir

como grupo prostético de numerosas hemoproteínas con funciones biológicas diversas. Asociado a proteínas, el grupo hemo participa en reacciones de óxido reducción, oxigenación, hidroxilación, transporte y almacenamiento de oxígeno, monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO). La función del grupo hemo es determinada por las propiedades de la apoproteína a la que se une<sup>9</sup>. Por ejemplo, cuando el CO o el NO se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa, esta enzima se activa para formar GMPc y con ello dar inicio a una cascada de señalización. Algunas hemoproteínas son: hemoglobina y mioglobina (transporte de oxígeno), citocromos (transferencia de electrones), las oxidasas, peroxidasas y catalasas (metabolismo del oxígeno), la sintasa de óxido nítrico (NOS), la guanilato ciclasa y la NADPH oxidasa.

En contraste, cuando el grupo hemo se encuentra libre en altas concentraciones es un pro-oxidante lipofílico que promueve la lipoperoxidación de las membranas lipídicas y organelos tales como mitocondria y núcleo; también desestabiliza el citoesqueleto y proteínas asociadas a membrana, con lo que compromete estructura y transporte<sup>2</sup>. Se ha demostrado que el grupo hemo promueve oxidación de lipoproteínas de baja y alta densidad, formando dienos conjugados, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico e isoprostanos F2<sup>10,11</sup>. También se ha observado que el grupo hemo es capaz de oxidar el ADN mitocondrial y nuclear<sup>12,13</sup>.

### Hemo oxigenasa-1

La primer isoforma de HO en ser identificada se denominó hemo oxigenasa-1 (HO-1), que inicialmente se reconoció como una proteína de choque térmico, con un peso molecular de 32 kDa<sup>3</sup>. En condiciones fisiológicas, la expresión de esta enzima sólo ocurre en bazo<sup>14</sup> y en la mayoría de las células no se detecta o es muy baja. En el cerebro, se ha encontrado en poblaciones neuronales del cerebelo, tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral<sup>15,16</sup> y en el endotelio cerebral<sup>17</sup>. Sin embargo, la expresión de la HO-1 se induce principalmente como respuesta a su sustrato, el grupo hemo, y también por una gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran medicamentos, metales, radiación ultravioleta, hipoxia,

Recibido: 6 octubre 2009. Aceptado: 30 octubre 2009.

<sup>1</sup>Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. Correspondencia: Marisol Orozco-Ibarra Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Insurgentes Sur # 3877. Col. La Fama, 14269. México DF. México. E-mail: marisol.rozco.ibarra@gmail.com

hiperoxia, isquemia,  $H_2O_2$  y depleción de glutatión entre otros<sup>1</sup>. Estos estímulos extracelulares activan la transcripción (síntesis de ARNm) del gen de la HO-1 por medio de los factores AP-1, AP-2, NF- $\kappa$ B o Nrf2, entre otros<sup>8</sup>. En la tabla 2 se mencionan diferentes compuestos que ejercen una acción neuroprotectora relacionada con la sobreexpresión de la HO-1.

**Tabla 2.** Compuestos que ejercen una acción neuroprotectora relacionada con la sobreexpresión de la HO-1.

| Compuesto              | Modelo                                                              | Referencia |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| Hemina                 | Daño al hipocampo inducido por CO                                   | 18         |
| Ginkgo biloba (EGb761) | Oclusión de la arteria cerebral media en ratón                      | 19         |
| Kahweol                | Neurotoxicidad de la 6-hidroxidopamina en células SH-SY5Y           | 20         |
| Epibatidina            | Toxicidad de una mezcla de rotenona con oligomicina en células PC12 | 21         |
| NEPP                   | Toxicidad del glutamato en células HT22                             | 22         |
| Propofol               | Daño inducido por peroxinitro en cultivos de células gliales        | 23         |
| Catalpósido            | Neurotoxicidad del $H_2O_2$ en células neuro 2A                     | 24         |

NEPP: prostaglandina promotora del desarrollo de neuritas

En humanos, se ha encontrado presencia de polimorfismo satélite en el promotor del gen de HO-1 que podría regular la respuesta transcripcional a diferentes estímulos. Se ha observado que los individuos con un menor número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> presentan una mayor expresión de HO-1 que los individuos con un mayor número de repeticiones (GT)<sub>n</sub>. Hay estudios que indican que los individuos con un menor número de repeticiones; por lo tanto una mayor expresión de HO-1 presentan menor susceptibilidad a presentar patologías, principalmente cardiovasculares y renales<sup>25</sup>. Sin embargo, aún queda pendiente confirmar o descartar asociaciones entre este polimorfismo y susceptibilidad a presentar diferentes padecimientos neurológicos.

Hasta ahora, a pesar de que se ha encontrado que el nivel de HO-1 en suero se encuentra incrementado en pacientes con Parkinson<sup>26</sup>, no se ha detectado alguna asociación entre polimorfismo de repeticiones (GT)<sub>n</sub> con esta enfermedad<sup>27</sup>. Sin embargo, se ha descrito que los pacientes con aneurisma cerebral presentan alelos con repeticiones (GT)<sub>n</sub> largas<sup>28</sup>, y por el contrario, los pacientes con malaria cerebral presentan una mayor incidencia de alelos con repeticiones (GT)<sub>n</sub> cortas<sup>29</sup>.

La importancia fisiológica de la HO-1 se demostró en

forma contundente por medio de estudios en un paciente humano con deficiencia congénita de HO-1, de los estudios con ratones transgénicos deficientes en la enzima. En 1999 se informó un caso de deficiencia de HO-1 en un niño japonés de 6 años de edad que sufría fiebre recurrente y retraso severo en el crecimiento. Este niño presentó un nivel bajo de bilirrubina sérica (~0.3 mg/dL, normal 0.2-1.3) asociado con anemia hemolítica persistente y concentraciones muy altas de grupo hemo en plasma (490  $\mu$ M, cuando normalmente no se detecta o es <1  $\mu$ M), lo que sugería defecto en el catabolismo del grupo hemo. La secuencia de nucleótidos del gen de HO-1 del paciente reveló la delección del exón 2 en el alelo materno y delección de dos bases dentro del exón 3 en el alelo paterno. La combinación de estas dos mutaciones resultó en la imposibilidad de sintetizar HO-1 funcional. El paciente también presentó hiperlipidemia, altos niveles de haptoglobina, niveles indetectables de hemopexina, acumulación de hierro en tejido renal y hepático, proteinuria y hematuria persistentes debido al daño tubular renal, hepatomegalia, asplenia y producción excesiva de glóbulos blancos y plaquetas. No se encontró evidencia de anomalías en el cerebro, a excepción de una hemorragia subdural<sup>30,31</sup>.

La mayoría de estas características también se encontraron en ratones transgénicos deficientes en HO-1, al presentar hepatomegalia, anemia, acumulación de hierro, mayor lipoperoxidación, oxidación de proteínas en hígado y riñón que los ratones normales<sup>32</sup>. Además, estos ratones fueron más sensibles al daño por isquemia y endotoxina que los ratones silvestres. En conjunto, estos datos sugieren que la HO-1 juega un papel esencial en la defensa contra el estrés oxidante y en el metabolismo del hierro. Aunque estos estudios en el paciente y los ratones deficientes en HO-1 revelaron un gran número de anomalías, es importante señalar que no se describió anomalía alguna en el tejido nervioso.

Como varios de los estímulos que inducen la expresión de la HO-1 son pro-oxidantes y se ha encontrado evidencia que indica que la inducción de HO-1 provee de efecto protector en modelos *in vitro* e *in vivo* asociados al estrés oxidante, se ha considerado que la activación del gen de HO-1 representa un mecanismo de defensa celular<sup>33-35</sup>.

### HO-1 y neurodegeneración

Se acepta ampliamente que la sobreexpresión de la HO-1 ocurre como respuesta a una multitud de factores que generan estrés oxidante, y que esta sobreexpresión provee protección antioxidante en una gran variedad de células y tejidos<sup>1,36</sup>. Sin embargo, recién se ha estado acumulado evidencia de que la HO-1 también confiere neuroprotección en diferentes modelos de daño inducido

por diferentes mecanismos<sup>33,34,37</sup>.

Aunque en condiciones fisiológicas la expresión de la HO-1 es casi indetectable y se limita sólo a algunas poblaciones neuronales, bajo condiciones patológicas se incrementa dramáticamente. De hecho, estudios de inmunohistoquímica en cerebro humano *pos mortem* han revelado un incremento en la expresión de HO-1 en pacientes de enfermedades neurodegenerativas, como se describe a continuación.

1. En cerebros provenientes de pacientes con enfermedad de Alzheimer, la expresión de HO-1 se encontró aumentada en neuronas de la corteza y el hipocampo, en placas de  $\beta$ -amiloide y en ovillos neurofibrilares<sup>38,39</sup>. No se encontró aumento de HO-1 en zonas menos afectadas durante esta enfermedad, como cerebelo o la *sustancia negra*. Por otra parte, en ratones transgénicos que sobre expresan la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide (PPA), se encontraron las mismas evidencias de daño oxidante que en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, incluyendo aumento en la expresión de HO-1 en la periferia de las placas seniles. Estos datos y el hallazgo de que el tratamiento de células PC12 con péptido  $\beta$ -amiloide aumenta la expresión de la HO-1 en forma dependiente de la concentración<sup>40</sup>, sugiere que la acumulación de  $\beta$  amiloide sería un estímulo que induce la expresión de la HO-1 en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, para tratar de explicar el papel funcional de la HO-1 en la enfermedad de Alzheimer, se han realizado varios estudios *in vitro* e *in vivo*. Así, se ha demostrado que al inhibir la actividad de la HO-1 disminuye la acumulación mitocondrial de hierro en astrocitos<sup>41</sup>, lo que sugiere un papel perjudicial a la actividad de la HO-1. Por el contrario, estudios con ratones que sobre expresan la PPA, indican que esta proteína interacciona con la HO-1 inhibiendo su actividad<sup>42</sup>. Por otra parte, se ha encontrado que un ensayo cuantitativo del ARNm de HO-1 en linfocitos podría ser útil como marcador biológico al inicio de la enfermedad de Alzheimer<sup>43</sup>.
2. Mediante el estudio de cerebros *pos mortem*, se ha demostrado que la expresión de la HO-1 se encuentra sobrerregulada en neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson, pero no en neuronas control, lo cual es una evidencia de la presencia de estrés oxidante crónico. Se ha encontrado inmunoreactividad de HO-1 en neuronas globulares, cuerpos de Lewy, neurópilo e inclusiones giales (las dos últi-

mas en el caso de degeneración corticobasal). La inmunoreactividad de HO-1 en los cuerpos de Lewy se encontró asociada fuertemente con los filamentos anormales que comprenden la inclusión. En todos los casos, las neuronas aparentemente no afectadas sólo presentaron inmunoreactividad basal de HO-1<sup>44,45</sup>. En otro estudio, la HO-1 se identificó mediante un análisis de microarreglo como uno de los genes de respuesta antioxidante más activos al incubar células dopaminérgicas SN4741 con  $H_2O_2$  o 1-metil-4-fenilpiridinio<sup>46</sup>. Por lo tanto, se ha postulado que la HO-1 es uno de los genes de respuesta más comunes durante la muerte celular inducida por neurotoxinas relacionadas con la enfermedad de Parkinson. En esta enfermedad, se ha propuesto que la inducción de HO-1 se debe a la liberación de dopamina,  $H_2O_2$  derivado de dopamina o neurotoxinas endógenas, además se piensa que tal inducción está involucrada con deficiencias en la cadena de transporte de electrones y deposición anormal de hierro. Se ha propuesto que el hierro liberado durante el catabolismo del grupo hemo podría exacerbar el estrés oxidante y ser mediador del daño cerebral.

3. En cerebro *pos mortem* de pacientes con enfermedad de Huntington, se detectó el incremento de la inmunoreactividad de HO-1 en el estriado, aunque no se conoce aún el significado de este hallazgo. En esta región del cerebro también se detectó daño oxidante mediante los siguientes marcadores: mayor incidencia de fragmentación del DNA, acumulación de lipofusina, incremento de malondialdehído, de 3-nitrotirosina y de 8-hidroxi-desoxiguanosina<sup>47</sup>.
4. El análisis de cerebros *pos mortem* provenientes de pacientes de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) ha revelado una fuerte asociación con el estrés oxidante. Sin embargo, los datos de expresión de HO-1 no presentan con claridad el papel de esta enzima, ya que Ferrante, *et al*,<sup>48</sup> describió la sobre expresión de HO-1 en motoneuronas de la médula espinal tanto de pacientes con ELA tanto familiar como esporádica. Por el contrario, Dwyer *et al*,<sup>49</sup> no detectaron la inducción de HO-1 en un modelo de ELA en ratones transgénicos.
5. En la ataxia de Friedreich no se ha establecido una relación clara con la HO-1, pero se cree que el ambiente oxidante y disfunción del metabolismo de hierro podrían resultar en la sobre expresión de HO-1 como en otras patologías.

## HO-1 en modelos de daño al tejido del sistema nervioso central

Mediante estudios de inmunohistoquímica en cerebro *pos mortem*, se encontró la sobreexpresión de HO-1 en oligodendrocitos de lesiones tempranas de esclerosis múltiple lo cual se correlacionó con daño morfológico severo. Además, en una línea celular de oligodendrocitos (OLN-93) el estrés oxidante inducido por  $H_2O_2$  llevó a daño mitocondrial y desorganización de la red de microtúbulos, efectos que se exacerbaban al inhibir la actividad de HO, sugiriendo que la HO-1 inicialmente jugaría un papel protector<sup>50</sup>. En cerebro *pos mortem*, también se determinó la sobreexpresión de HO-1 en células gliales de fases agudas de encefalomielitis autoinmune experimental y leucoencefalomielitis aguda<sup>50</sup>.

Además, diversos estudios sugieren un efecto protector de la HO-1: **a.** cultivos de astrocitos aislados de ratones *knockout* para HO-1 son más vulnerables al daño oxidante mediado por el grupo hemo<sup>51</sup>; **b.** la sobreexpresión de HO-1 atenúa el daño celular causado por infarto isquémico en ratones transgénicos<sup>52</sup>; **c.** la ausencia de HO-1 facilita la muerte neuronal excitotóxica de las neuronas estriatales *in vivo*<sup>53</sup>; **d.** la inhibición de la HO exagera la muerte neuronal inducida por etanol en neuronas de hipocampo<sup>54</sup>; **e.** la sobreexpresión de HO-1 protege contra la muerte neuronal y previene la acumulación intracelular de ERO inducidas por glutamato<sup>55</sup>; **f.** la inducción de la HO-1 en cultivos primarios de neuronas de rata previno la muerte neuronal inducida por el 3-nitropropiónico, un tóxico mitocondrial<sup>56,57</sup> o el yodoacetato, un inhibidor de la glucólisis<sup>58</sup>.

Por otro lado, en un modelo de hipoxia-isquemia en ratas, se detectó un aumento de la inmunoreactividad de la HO-1 en poblaciones neuronales y gliales de corteza cerebral, hipocampo y tálamo; además, la inmunoreactividad de la HO-1 también se detectó en macrófagos/microglía en la zona de infarto<sup>59</sup>.

Estos datos demuestran que la HO-1 posee un efecto neuroprotector en diferentes tipos de células cerebrales.

## Características de la HO-2

La isoforma constitutiva de la HO se denomina HO-2, y su expresión se ha detectado predominantemente en cerebro, testículos, endotelio, hígado y la porción distal de la nefrona. Es abundante en el cerebro de una gran variedad de especies, incluyendo ratón, cerdo, rata y humano. Se ha demostrado que tanto en animales recién nacidos como en maduros, la HO-2 se expresa en neuronas<sup>60</sup> y vasos cerebrales<sup>17</sup>.

A diferencia de la HO-1, cuya traducción ocurre a partir de un sólo ARNm de 1.8 kpb, la HO-2 es producto de dos o más transcritos, siendo los más ubicuos los de 1.3 y

1.9 kpb. Estos transcritos surgen del uso de dos señales de poliadenilación diferentes que están separadas por 560 nucleótidos<sup>61</sup>. El nivel de transcripción de HO-2 es sensible a hipoxia y el estado redox de la célula, lo que afecta la relación de los transcritos 1.3/1.9, ya que el transcrito de 1.3 kpb se traduce más eficientemente que el de 1.9 kpb<sup>62</sup>. Así, el mecanismo para regular la actividad de la HO-2 es a través del control de los transcritos más que por la modulación de la expresión génica, dado que el único elemento de respuesta transcripcional es un sitio de unión a glucocorticoides<sup>7</sup>. Otro nivel de regulación de la actividad de HO-2 es postranscripcional, mediante fosforilación de la serina 79 por la caseína cinasa 2<sup>63</sup>.

Otra diferencia entre la HO-1 y la HO-2 estriba en que esta última posee dos sitios de unión al grupo hemo independientes del sitio catalítico, por lo que se ha sugerido que esta enzima además de degradar al grupo hemo, podría mantenerlo *secuestrado*<sup>64</sup>, lo que limitaría su disponibilidad para participar en reacciones de oxidación y en formación de hemoproteínas. Además, la capacidad de HO-2 para unirse a moléculas de hemo también es importante ya que éste se une con gran afinidad al  $O_2$ , NO y CO, por lo que se ha postulado que la HO-2 controla el nivel de estos gases. De acuerdo con esto, la presencia de una secuencia de TTTTGCA en el gen de la HO-2 es 100% idéntica a la secuencia del gen de la eritropoyetina que se relaciona con su función como sensor de oxígeno y nitrógeno<sup>3</sup>.

## HO-2 en el tejido del sistema nervioso

Recien, la HO-2 ha atraído la atención de varios grupos de investigación debido a que el trabajo con animales genéticamente modificados ha revelado evidencia que apoya que la HO-2 es un agente protector, principalmente para el endotelio del sistema nervioso<sup>65</sup>.

Para establecer la importancia *in vivo* de una disminución en la actividad de la HO-2, se ha recurrido al uso de ratones transgénicos que no producen HO-2, que en contraste con los ratones deficientes en HO-1, presentan menos alteraciones, ya que no tienen problemas de fertilidad pero son obesos y presentan hipertensión y resistencia a la insulina<sup>66,67</sup>. Sin embargo, estos ratones presentan mayor susceptibilidad al daño por isquemia inducida al ocluir la arteria cerebral media, ya que mostraron una lesión de infarto de aproximadamente el doble que los ratones silvestres<sup>68</sup>. Además, los ratones que no producen HO-2 también se usaron en un modelo de traumatismo cerebral y se encontró que la expresión de la HO-2 tiene un efecto neuroprotector al reducir la lipoperoxidación generada por el catabolismo del grupo hemo libre<sup>69</sup>.

Por otro lado, mediante el uso de cultivos de células endoteliales provenientes de la vasculatura cerebral de ratones que no producen HO-2, se demostró que la HO-2 es

factor clave para la protección del endotelio cerebrovascular contra cambios apoptóticos inducidos por glutamato<sup>70</sup>, privación de suero o factor de necrosis tumoral  $\alpha$ <sup>71</sup>. En estos trabajos, las células endoteliales carentes de HO-2 presentaron una mayor susceptibilidad a la apoptosis y estrés oxidante, por lo que se postuló que HO-2 basal confiere citoprotección en un efecto que estaría relacionado con su producción de bilirrubina y CO.

Además de la producción de CO y bilirrubina, se ha sugerido que el efecto citoprotector de la HO-2 se explicaría considerando que **a.** al unirse al NO, la HO-2 limitaría la producción de especies reactivas de nitrógeno, ya que todas ellas se derivan del peroxinitrito, agente oxidante producido por la reacción entre el NO y el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y tiene una participación importante en diferentes patologías<sup>72</sup>; y **b.** al controlar el nivel de hemo, la HO-2 podría limitar la síntesis de NOS; hemoproteína cuya actividad enzimática produce NO.

La producción de  $Fe^{2+}$ , CO, biliverdina y bilirrubina también la realiza la HO-1, pero como en cerebro la expresión de esta isoforma es muy baja en condiciones fisiológicas, la actividad de la HO-2 se convierte en fuente primaria de defensa contra ERO. Es notable que la regulación transcripcional de HO-2 y la NOS por glucocorticoides en el cerebro presenta una relación recíproca: mientras que los glucocorticoides inducen la HO-2, reprimen la NOS<sup>73</sup>.

#### Efecto celular de los productos de la reacción de la HO

En el pasado, los productos de degradación del grupo hemo sólo se consideraban metabolitos tóxicos, debido a que únicamente se conocían sus efectos adversos. Sin embargo, se ha demostrado que uno o más de los productos generados por actividad enzimática de HO como CO, biliverdina o bilirrubina, serían responsables del efecto protector conferido por la enzima. El CO es vasodilatador y antiapoptótico<sup>74</sup> y tanto la biliverdina como la bilirrubina son antioxidantes<sup>75,76</sup>. Además, en algunos casos se ha demostrado que el aumento en la actividad de HO-1 induce la salida de hierro de la célula<sup>77</sup> y aumenta la expresión de ferritina, la proteína intracelular de almacenamiento de hierro<sup>78,79</sup>, como se describe a continuación.

$Fe^{2+}$ : la inducción de la HO-1 tiene como resultado el aumento en la cantidad de  $Fe^{2+}$  al ser liberado del grupo hemo, este metal cataliza la producción de ERO mediante la reacción de Fenton. Sin embargo, en varios casos se ha demostrado que la inducción de HO-1 se acompaña de un aumento en la expresión de ferritina<sup>78,80</sup>, proteína intracelular de alto peso molecular que almacena el hierro celular que se encuentre en exceso. También, se ha observado que al inhibir la expresión de la HO disminuye la expresión de ferritina<sup>78</sup>. Esto es, la inducción de la HO-1 se encuentra acompañada de un mecanismo que impide que el  $Fe^{2+}$  par-

ticipa en la generación de ERO. Se ha calculado que cada molécula de ferritina de 450 kDa puede almacenar alrededor de 4 500 átomos de hierro. Además, se ha comprobado que la sobre expresión de HO-1 acelera el flujo de hierro, al promover mayor actividad de la ATPasa que disminuye el nivel intracelular de hierro<sup>77</sup>. Lo anterior es consistente con la acumulación de hierro en ratones deficientes en HO-1, y con la disminución en el flujo de hierro que se da cuando se inhibe la actividad de la HO-1. No se tiene claro qué tanto el incremento de ferritina y actividad de la ATPasa de hierro contribuyen al efecto citoprotector global de la HO-1, pero se ha sugerido que ambos mecanismos contribuyen en forma crucial al efecto antioxidante global que se da como resultado del incremento de la expresión de la HO-1.

CO: recién, el CO ha atraído la atención ya que se ha demostrado que se trata de un neuromodulador con efectos similares a los del NO y también tiene funciones antiapoptóticas<sup>70,71</sup>, anti-inflamatorias<sup>71,81</sup> y es un vasodilatador<sup>82</sup>. Se ha demostrado que el CO modula la regulación del tono de los vasos *in vitro* y presión sanguínea *in vivo*<sup>83</sup>. Algunos han llamado a la HO *sinetasa* de CO para establecer una analogía con la NOS.

La unión del CO a la guanilato ciclasa soluble (sGC) activa a esta enzima<sup>84</sup>, estimulando la producción de guanosina-3,5-monofosfato cíclico (GMPc). Se ha encontrado que la vía GCs/GMPc actúa mediando los efectos del CO en numerosos modelos, incluyendo el trasplante de órganos, inflamación pulmonar, hepatitis, daño por isquemia/reperfusión y daño vascular<sup>74</sup>. Por tanto, se ha sugerido que el efecto citoprotector que confiere la HO se debe, en parte, a la producción de CO.

BV y BR: la bilirrubina es un pigmento amarillo y lipofílico, que parece ser uno de los antioxidantes endógenos más abundantes en mamíferos, y es el compuesto con mayor actividad antioxidante en el suero humano. Al igual que la BV, este compuesto posee una potente actividad atrapadora de varias ERO, incluyendo  $O_2^{\cdot -}$ , radical peroxilo y peroxinitrito<sup>76,85</sup>. Interesantemente, cuando la concentración de bilirrubina en tejido es baja (20-50 nM), la bilirrubina entra en un ciclo de amplificación, en donde es oxidada a BV y entonces es reciclada por biliverdina reductasa nuevamente a bilirrubina, con lo que la concentración efectiva de bilirrubina se mantiene<sup>81</sup>. Este ciclo explica el potencial antioxidante de la bilirrubina, más allá de la estequiometría 1:1, y su importancia fisiológica al atrapar las ERO. Por tanto, es razonable pensar que la capacidad antioxidante de la bilirrubina pueda ejercer el efecto antiapoptótico de la HO-1 al atrapar las ERO.

A pesar de lo descrito, cada uno de los productos de la HO-1 también puede ejercer efectos adversos, como se describe a continuación:  $Fe^{2+}$ . El hierro libre en estado ferroso es capaz de ocasionar estrés oxidante al facilitar la descomposición de los peróxidos lipídicos a radicales

alcoilo y peroxilo, y cataliza la formación de OH a partir de  $H_2O_2$  en la reacción de Fenton. Este metal también está implicado en la formación de  $O_2$  y  $H_2O_2$  debido que favorece reacciones de oxidación no enzimática. Además, la acumulación mitocondrial de hierro es una característica común de enfermedades neurodegenerativas<sup>86</sup>.

**CO.** Durante mucho tiempo, el CO se ha considerado un gas tóxico y peligroso. Este gas se une al hierro en su estado reducido ( $Fe^{2+}$ ), por lo que interfiere la función de las hemoproteínas. Por ejemplo, al unirse a la hemoglobina (con 200 veces más afinidad que el oxígeno), forma carboxihemoglobina y con ello, disminuye el transporte de oxígeno a los tejidos. Además, al unirse a citocromos dificulta la transferencia de electrones, lo que explica su capacidad de inhibir el transporte de electrones en mitocondria. También se ha demostrado que las altas concentraciones de CO incrementan la producción intracelular de  $H_2O_2$  en el cerebro, evento que se acompaña por el incremento en la producción de OH y disminución del cociente de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en la mitocondria<sup>87</sup>.

**BR.** Es un compuesto potencialmente tóxico en altas concentraciones ( $>3\text{mg/dL}$  en suero humano), que cuando se acumula en suero causa ictericia. En el neonato, si la concentración de BR es demasiado alta, este compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica causando daño neuronal asociado con *kernicterus*<sup>88</sup>. El tratamiento más común para la hiperbilirrubinemia es la fototerapia; sin embargo, recién se ha propuesto el uso de inhibidores competitivos de la actividad de HO, así que compuestos como las mesoporfirinas de estaño y zinc se encuentran en investigación<sup>89,90</sup>.

En la tabla 3, se mencionan los efectos biológicos de los productos de la HO.

**Tabla 3.** Efectos biológicos de los productos de la HO.

| Producto                  | Efectos favorables                                                                                                                                                                         | Efectos adversos                                                                                                                                      |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CO                        | Actúa como vasodilatador                                                                                                                                                                   | Se une a hemoglobina, con lo que impide la oxigenación de los tejidos<br>Inhibe a la citocromo oxidasa, con lo que impide el transporte de electrones |
|                           | Inhibe genes proinflamatorios                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                       |
|                           | Aumenta la producción de citocinas anti-inflamatorias                                                                                                                                      |                                                                                                                                                       |
|                           | Inhibe la agregación plaquetaria                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                       |
|                           | Actúa como antiapoptótico<br>Actúa como neuromodulador                                                                                                                                     |                                                                                                                                                       |
| $Fe^{2+}$                 | Incrementa la biosíntesis de ferritina                                                                                                                                                     | Cataliza la producción de OH                                                                                                                          |
|                           | Incrementa la actividad de que transporta el Fe al exterior celular                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |
| Biliverdina y bilirrubina | Es una molécula antioxidante, que actúa sobre LOO <sup>*</sup> , $O_2^{\cdot-}$ , ROO <sup>*</sup> , OH <sup>*</sup> , HOCl, NO <sup>*</sup> , ONOO <sup>*</sup> y radical a-tocoferoxilo. | Puede producir ictericia, hiperbilirrubinemia y kernicterus                                                                                           |

\*LOO: Radical lipoperoxilo.  $O_2^{\cdot-}$ : singulete de oxígeno. ROO: radical peroxilo. OH: Radical hidroxilo. NO: óxido nítrico. ONOO: peroxinitrito.

## CONCLUSIÓN

Los datos que se presentaron en este trabajo sustentan la necesidad de profundizar el estudio de la función de la HO en el sistema nervioso central, al tratar de una enzima cuya forma constitutiva se encuentra en cerebro en condiciones fisiológicas y su forma inducible es susceptible de ser regulada mediante diferentes compuestos. Además, esta enzima se ha encontrado involucrada con enfermedades que tienen mecanismos de progresión diferentes, y su inducción ha mostrado su potencial como agente citoprotector por lo que se trata de un blanco terapéutico atractivo.

## Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (48812) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN207007 e IN201910) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## REFERENCIAS

- Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Hemooxygenasa. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. En Konigsberg M, editor, México: Manual Moderno, 2008.
- Mahin MD. Heme oxygenase: clinical applications and functions. Florida: CRC Press Inc., 1992.
- Maines MD, Gibbs PE. 30 some years of heme oxygenase: from a «molecular wrecking ball» to a «mesmerizing» trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:568-77.
- Maines MD, Trakshel GM, Kury RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase: only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986; 261:411-9.
- Trakshel GM, Kurn RK, Maines MD. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase: the noninducible isoform. *J Biol Chem* 1986; 261:11131-7.
- Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988; 2:2557-68.
- Raju VS, McCoubrey Jr WK, Maines MD. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1351:89-104.
- Alam J, Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:166-74.
- Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 2005; 157:175-88.
- Camejo G, Halberg C, Manschik-Lundin A, Hurt-Camejo E, Rosengren B, Olsson H, et al. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* 1998; 39:755-66.
- Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002; 100:879-87.
- Suliman HB, Carraway MS, Velsor LW, Day BJ, Ghio AJ, Piantadosi CA. Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:246-56.

13. Rahman Q, Mahmood N, Khan SG, Arif JM, Athar M. Mechanism of asbestos-mediated DNA damage: role of heme and heme proteins. *Environ Health Perspect* 1997;105:1109-12.
14. Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 141:528-33.
15. Bergeron M, Ferriero DM, Sharp FR. Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 1998; 105:181-94.
16. Colombrita C, Calabrese V, Stella AM, Mattei F, Alkon DL, Scapagnini G. Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes. *Exp Biol Med* 2003; 228:517-24.
17. Parfenova H, Neff III RA, Alonso JS, Shlopov BV, Jamal CN, Sarkisova SA, et al. Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:1954-63.
18. Guan L, Wen T, Zhang Y, Wang X, Zhao J. Induction of heme oxygenase-1 with hemin attenuates hippocampal injury in rats after acute carbon monoxide poisoning. *Toxicology* 2009; 262: 146-52.
19. Saleem S, Zhuang H, Biswal S, Christen Y, Doré S. Ginkgo biloba extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury. *Stroke* 2008; 39:3389-96.
20. Hwang YP, Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett* 2008; 582:2655-62.
21. Egea J, Rosa AO, Cuadrado A, García AG, López MG. Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* 2007; 102:1842-52.
22. Satoh T, Baba M, Nakatsuka D, Ishikawa Y, Aburatani H, Furuta K, et al. Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects by cyclopentenone prostaglandin derivatives as a sustained phase of neuronal survival promoting mechanism under oxidative stress. *Eur J Neurosci* 2003; 17:2249-55.
23. Acquaviva R, Campisi A, Murabito P, Raciti G, Avola R, Mangiameli S, et al. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism. *Anesthesiology* 2004; 101:1363-71.
24. Moon MK, Choi BM, Oh BS, Pae HO, Kim JD, Oh H, et al. Catalposide protects neuro 2A cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity via the expression of heme oxygenase-1. *Toxicol Lett* 2003; 145:46-54.
25. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1097-104.
26. Mateo I, Infante J, Sánchez JP, García-Gorostiaga I, Rodríguez-Rodríguez E, Vázquez-Higuera JL, et al. Serum heme oxygenase-1 levels are increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009. En prensa.
27. Funke C, Tomiuk J, Riess O, Berg D, Soehn AS. Genetic analysis of heme oxygenase-1 (HO-1) in German Parkinson's disease patients. *J Neural Transm* 2009; 116:853-9.
28. Morgan L, Hawe E, Palmen J, Montgomery H, Humphries SE, Kitchen N. Polymorphism of the heme oxygenase-1 gene and cerebral aneurysms. *Br J Neurosurg* 2005; 19:317-21.
29. Takeda M, Kikuchi M, Ubalee R, Na-Bangchang K, Ruangwee-rayut R, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:268-71.
30. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999; 103:129-35.
31. Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Akanishi N. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 2002; 33:125-30.
32. Poss K, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase-1 deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10925-30.
33. Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascallovic JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem* 2009; 110:469-85.
34. Cuadrado A, Rojo AI. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr Pharm Des* 2008; 14:429-42.
35. Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med* 2009; 15:50-8.
36. NG Abraham, A Kappas. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 2008; 60:79-127.
37. Orozco-Ibarra M, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Papel de la hemo oxigenasa-1 en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol* 2006; 43:556-562.
38. Smith MA, Kutty RK, Richey PL, Yan SD, Stern D, Chader GJ, et al. Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1994; 145:42-7.
39. Schipper H, Cisse S, Stopa E. Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann Neurol* 1995; 37:758-68.
40. Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, et al. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152:871-7.
41. Song W, Su H, Song S, Paudel HK, Schipper HM. Over-expression of heme oxygenase-1 promotes oxidative mitochondrial damage in rat astroglia. *J Cell Physiol* 2006; 206:655-63.
42. Takahashi M, Dore S, Ferris CD, Tomita T, Sawa A, Wolosker H, et al. Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuron* 2000; 28:461-73.
43. Ishizuka K, Kimura T, Yoshitake J, Akaike T, Shono M, Takamatsu J, et al. Possible assessment for antioxidant capacity in Alzheimer's disease by measuring lymphocyte heme oxygenase-1 expression with real-time RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 977:173-8.
44. Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1998; 150:60-8.
45. Castellani R, Smith MA, Richey PL, Perry G. Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res* 1996; 737:195-200.
46. Chun HS, Gibson GE, DeGiorgio LA, Zhang H, Kidd VJ, Son JH. Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxins shares the common molecular mechanism. *J Neurochem* 2001; 76:1010-21.
47. Browne S, Ferrante R, Beal M. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* 1999; 9:147-163.
48. Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1997; 69:2064-74.
49. Dwyer BE, Lu SY, Nishimura RN. Heme oxygenase in the experimental ALS mouse. *Exp Neurol* 1998; 150:206-12.
50. Stahnke T, Stadelmann C, Netzler A, Brück W, Richter-Landsberg C. Differential upregulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in glial cells after oxidative stress and in demyelinating disorders. *J Mol Neurosci* 2007; 32:25-37.
51. Chen-Roetling J, Benvenisti-Zarom L, Regan RF. Cultured astrocytes from heme oxygenase-1 knockout mice are more

- vulnerable to heme-mediated oxidative injury. *J Neurosci Res* 2005; 82:802-10.
52. Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* 1999; 72:1187-1203.
  53. Ahmad AS, Zhuang H, Dore S. Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity. *Neurosci* 2006; 141:1703-8.
  54. Ku BM, Joo Y, Mun J, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, et al. Heme oxygenase protects hippocampal neurons from ethanol-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 2006; 405:168-71.
  55. Chen K, Gunter K, Maines MD. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J Neurochem* 2000; 75:304-313.
  56. Orozco-Ibarra M, Estrada-Sánchez AM, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: role of CO and bilirubin. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41:1304-14.
  57. Guzmán-Beltrán S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. Nrdihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 2008; 447:167-71.
  58. González-Reyes S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radic Res* 2009; 43:214-23.
  59. Sutherland BA, Rahman RM, Clarkson AN, Shaw OM, Nair SM, Appleton I. Cerebral heme oxygenase 1 and 2 spatial distribution is modulated following injury from hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Res* 2009. En prensa.
  60. Bidmon H, Emde B, Oermann E, Kubitz R, Witte OW, Zilles K. Heme oxygenase-1 (HSP-32) and heme oxygenase-2 induction in neurons and glial cells of cerebral regions and its relation to iron accumulation after focal cortical photothrombosis. *Exp Neurol* 2001; 168:1-22.
  61. McCoubrey WK Jr, Ewing JF, Maines MD. Human heme oxygenase: characterization and expression of a full length cDNA and evidence suggesting the two HO-2 transcripts differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295:13-20.
  62. Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD. Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain: Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem* 1990; 265:8212-17.
  63. Boehning D, Moon C, Sharma S, Hurt KJ, Hester LD, Ronnett GV, et al. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron* 2003; 40:129-37.
  64. McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 1997; 272:12568-74.
  65. Parfenova H, Leffler CW. Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr Pharm Des* 2008; 14:443-53.
  66. Doré S. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:1276-82.
  67. Sodhi K, Inoue K, Gotlinger K, Canestraro M, Vanella L, Hyun Kim D, et al. EET agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2 null mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2009, en prensa.
  68. Doré S, Sampei K, Goto S, Alkayed NJ, Guastella D, Blackshaw S, et al. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol Med* 1999; 5:656-63.
  69. Chang EF, Wong RJ, Vreman H, Igarashi T, Galo E, Sharp FR, et al. Heme oxygenase-2 protects against lipid peroxidation - mediated cell loss and impaired motor recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci* 2003; 23:3689-96.
  70. Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Raymond F. et al. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:1399-410.
  71. Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, Lefler CW, et al. HO-2 provides endogenous protection against oxidative stress and apoptosis caused by TNF- $\alpha$  in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291:897-908.
  72. Chirino YI, Orozco Ibarra M, Pedraza Chaverri J. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Rev Invest Clin* 2006; 58:350-8.
  73. Hartsfield CL. Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4:301-7.
  74. Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004; 26:270-80.
  75. Sedlak TW, Snyder SH. Billirubin benefits: celular protection by a biliverdin reductase antioxidante cycle. *Pediatrics* 2004; 113: 1776-82.
  76. Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6:841-9.
  77. Barañano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem* 2000; 275:15166-73.
  78. Erdmann K, Grosser N, Schipporeit K, Schröder H. The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *J Nutr* 2006; 136:2148-52.
  79. Balla J, Varcellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, et al. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food* 2005; 49:1030-43.
  80. Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A, Schroder H. Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314:351-5.
  81. Kirby KA, Adin CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:563-71.
  82. Harder Y, Amon M, Schramm R, Rücker M, Scheuer C, Pittet B, et al. Ischemia-induced up-regulation of heme oxygenase-1 protects from apoptotic cell death and tissue necrosis. *J Surg Res* 2008; 150:293-303.
  83. Ndisang JF, Tabien HE, Wang R. Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens* 2004; 22:1057-74.
  84. Olson KR, Donald JA. Nervous control of circulation the role of gasotransmitters, NO, CO, and H<sub>2</sub>S. *Acta Histochem* 2009;111: 244-56.
  85. Mancuso C, Pani G, Calabrese V. Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep* 2006; 11:207-13.
  86. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:205-14.
  87. Piantadosi CA, Tatro L, Zhang J. Hydroxyl radical production in the brain after CO hypoxia in rats. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:603-9.
  88. Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* 2004; 66:773-9.
  89. Morioka I, Wong RJ, Abate A, Vreman HJ, Contag CH, Stevenson DK. Systemic effects of orally-administered zinc and tin (IV) metalloporphyrins on heme oxygenase expression in mice. *Pediatr Res* 2006; 59:667-72.
  90. Drummond GS, Kappas A. Sn-mesoporphyrin suppression of hyperbilirubinemia in EHBR/Eis rats, an animal model of Dubin-Johnson syndrome. *Pharmacology* 1998; 56:158-64.