



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

**VENTANA TERAPÉUTICA DEL EXTRACTO DE AJO
ENVEJECIDO EN UN MODELO DE ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

RANFERI JOSDEFF RAMÍREZ HARO

Tutora: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

MÉXICO, D.F.

2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Homero Hernández Montes
Vocal	Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Secretario	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
1er. Suplente	Prof. Sobeida Sánchez Nieto
2º. Suplente	Prof. Iliana Elvira González Hernández

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Patología Vascular. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Este trabajo se realizó con el apoyo de CONACYT, proyecto No. 52222-M

Ranferi Josdeff Ramírez Haro

SUSTENTANTE

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez

ASESORA

DEDICATORIAS.

Especialmente para ustedes, que durante toda mi vida me han brindado su amor, apoyo, confianza, comprensión, regaños y jalones de oreja. Infinitamente agradecido por haberme dejado el mejor legado que alguien pudiera dejar; ese espíritu de lucha, superación y triunfo, con el que podré salir adelante en este difícil andar de la vida.

A ustedes... MAMÁ y PAPÁ.

A mis hermanos JON Y JAN, esperando que este logro y esta satisfacción les sirva de ejemplo y los invite a que se sigan preparando y superando para todo aquello que la vida les tenga preparado.

A EDITH y CARLOS; tíos y padres. Eternamente agradecido por ser ese gran soporte en mi vida. Sin ustedes este camino en verdad hubiera sido sufrido.

Y a ti, que no permitiste que perdiera de vista el objetivo principal, que me ayudaste a darle la prioridad adecuada a las cosas, a ti que me acompañaste durante todo este trayecto, apoyándome y sobretodo regañándome, haciendo muchísimo muy fácil la estadía en la Universidad. Pero sobretodo te agradezco ese amor que me has brindado durante todo este tiempo, el cual ha servido para hacer de mi una mejor persona.

GRACIAS PAOLA!!!!!!

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme todo lo necesario para que haya podido llegar a cumplir esta meta tan importante.

A todos mis profesores, que me guiaron durante todo este complicado trayecto y que sembraron en mi la semilla de la necesidad del conocimiento.

A la Dra. Perla Maldonado Jiménez, por haberme tenido la confianza, por haber aceptado dirigir este proyecto, por todo el apoyo que me ha brindado durante los 3 años y medio que estuve en el laboratorio, pero sobretodo, gracias por la amistad.

A mis sinodales, los doctores Homero Hernández Montes y Javier Plasencia de la Parra, por haber revisado y corregido esta tesis.

A las Dras. Penélope Aguilera, María Elena Chánez y Helgi Jung por todo el apoyo, los consejos y asesorías que me han brindado no sólo durante el tiempo de la realización de este trabajo, si no desde el primer momento en que nos conocimos.

A mis compañeros de laboratorio: Adriana, Araceli, Gabriela, Selene, Alejandra, Nancy y Daniel. Sin ustedes seguramente el trabajo en el laboratorio no hubiera sido tan divertido y sin su ayuda, seguramente seguiría en estos momentos peleándome con algún equipo o rompiendo tubos en el laboratorio (aunque esa sea especialidad tuya Adys).

A todos mis familiares que desafortunadamente no puedo mencionar uno por uno, pero que de alguna forma estuvieron vinculados y preocupados por mi desempeño durante la licenciatura.

Y un especial agradecimiento a ustedes mis amigos, mis mejores momentos durante todo este trayecto: Pao, Neto, Olguita, Sebas, Karina, Ximena, Toño, Vic, Gerardo, Ivette, Memo, Rodrigo, Odin, Paguas, Isabel, Palacios, Omar, Jocz, Daniela, Luis, Abril, Claudia, Josué, Juan. Gracias por impedir que me aburriera o pasara un mal rato, gracias por su compañía y apoyo, gracias por su amistad y cariño, gracias por todo.

GRACIAS TOTALES!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Planteamiento del problema	1
2. Hipótesis	4
3. Objetivos	5
II. ANTECEDENTES	6
1. Isquemia	6
2. Patofisiología del síndrome de isquemia/reperfusión	7
3. Generalidades sobre estrés oxidativo	8
3.1 Especies reactivas de oxígeno	8
3.2 Especies reactivas de nitrógeno	11
3.3 Defensas antioxidantes	13
3.3.1 Antioxidantes enzimáticos	13
3.3.2 Antioxidantes no enzimáticos	16
4. Estrés oxidativo en el síndrome de isquemia/reperfusión	19
4.1 Antioxidantes en la isquemia/reperfusión	20
5. El ajo	22
5.1 Extracto de ajo envejecido	23
III. MATERIAL Y MÉTODOS	26
1. Reactivos	26
2. Animales	26
3. Diseño experimental	27
3.1 Efecto de la reperfusión	27
3.2 Ventana terapéutica	27
3.3 Optimización de la ventana terapéutica	28
3.4 Efecto del EAE sobre el estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes	29
4. Métodos	30
4.1 Inducción de la isquemia cerebral	30
4.2 Área de infarto	30
4.3 Inmunohistoquímica de nitrotirosina	31
4.4 Homogenización de tejidos para la actividad enzimática	32
4.5 Actividad de la catalasa (CAT)	32
4.6 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	32
4.7 Glutatión reducido	33
4.8 Análisis estadístico	33
IV. RESULTADOS	34
1. Efecto de la reperfusión	34
2. Tiempo óptimo de administración del EAE	35
3. Ventana terapéutica	36
4. Optimización de la ventana terapéutica	38
5. Mecanismos de protección	39
5.1 Inmunohistoquímica	39
5.2 Antioxidantes enzimáticos	41
5.3 Glutatión	44
V. CONCLUSIONES	45
VI. BIBLIOGRAFÍA	46

I. INTRODUCCION

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En países industrializados, el infarto cerebral representa la tercera causa de muerte y se espera que la incidencia aumente conforme la población va envejeciendo. En México esta enfermedad representa la quinta causa de muerte y la segunda de demencia [1]. En 1980, su incidencia fue de 32.59 casos por cada 100,000 habitantes [2] y según la Organización Panamericana de la Salud, es un problema que va en aumento en magnitud y en gravedad, lo que a futuro puede provocar un enorme costo social y económico en términos de mortalidad, morbilidad y minusvalía (ya que se considera la causa más importante de incapacidad en sobrevivientes al infarto) [3].

Cuando se interrumpe el flujo sanguíneo (isquemia) hacia algún órgano, se desencadena una serie de eventos que pueden causar daño con diferente grado de severidad. También se ha reportado que el daño causado por algunos de estos eventos se acentúa cuando el flujo sanguíneo se reestablece (reperusión), por lo que es importante encontrar alguna forma de disminuir el daño y/o prevenir la muerte que se induce en los síndromes de isquemia-reperusión como: el infarto al miocardio, el choque circulatorio, el trasplante de órganos, entre otros.

En el caso del cerebro, la disminución del flujo sanguíneo genera un “*área de infarto*”, zona donde se observa muerte neuronal, rodeada por un “*área de penumbra isquémica*”, zona en la que se mantiene el flujo residual dependiente de la circulación colateral, que preserva la viabilidad celular aunque no su función [4]. Debido a que el desencadenante primario del daño por isquemia es la reducción del flujo sanguíneo, la pronta restauración del mismo permitiría la recuperación de las células que aún son viables. Sin embargo, si el aporte sanguíneo no ocurre tempranamente, se propicia la progresión de la lesión celular y ocurren efectos deletéreos que se suman a la cascada de trastornos provocados por la isquemia [5], lo que tiene como consecuencia la extensión del área de infarto.

El daño cerebral isquémico es el resultado de una secuencia compleja de eventos que se desarrollan a lo largo del tiempo y el espacio [6]. Dentro de estos se encuentran: 1) Pérdida de la actividad eléctrica neuronal como una consecuencia de la alteración de los procesos dependientes de ATP; 2) Activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular; 3) Liberación masiva de aminoácidos excitadores y su consecuente acumulación en el espacio extracelular (excitotoxicidad); 4) Inhibición de la síntesis de proteínas; 5) Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), generando un estado de estrés oxidativo; 6) Reacción inflamatoria y 7) Apoptosis.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo es un evento importante que causa daño en el infarto cerebral isquémico. Lo anterior se debe a que comparado con otros órganos, el cerebro parece ser particularmente sensible al estrés oxidativo [6] como lo indican las siguientes evidencias: 1) Las células del cerebro humano utilizan el 20% del oxígeno consumido por el cuerpo, aunque constituyen solo el 2% del peso corporal. Esto indica que el cerebro genera mas ERO, ERN y radicales libres, comparado con otros órganos; 2) En varias regiones se encuentran concentraciones elevadas de hierro, que puede catalizar la formación de radicales libres; 3) Es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, los cuales son blanco de los radicales libres (lipoperoxidación); y 4) Posee un bajo nivel de sistemas antioxidantes comparado con otros órganos como el hígado o el riñón.

La hipótesis de que el estrés oxidativo (esencialmente durante la etapa de perfusión postisquémica) exagera el daño inducido durante la isquemia, se propuso a finales de los 70 [7], y desde entonces el papel del estrés oxidativo en el daño postisquémico se ha estudiado ampliamente. En este contexto, se han evaluado varios antioxidantes, atrapadores de radicales libres o compuestos que inhiben la producción de radicales libres en modelos experimentales, teniendo éxito en la mayoría de los casos. Sin embargo, cuando éstos compuestos fueron evaluados en humanos, se obtuvieron resultados negativos. Debido a esto, se han propuesto varias razones que intentan explicar la aparente discrepancia entre el efecto protector observado en los modelos experimentales y la ineficacia del tratamiento en humanos. Ya que en humanos es complicado establecer el tiempo de

isquemia y de reperfusión, una de estas razones podría ser la administración del tratamiento fuera de la ventana temporal de eficacia del compuesto evaluado [8].

Debido a lo anterior, en este trabajo se propone evaluar el efecto del extracto de ajo envejecido (EAE), una presentación inodora del ajo que ha mostrado tener propiedades antioxidantes, en un modelo de infarto cerebral [9]. Un estudio previo ha demostrado que la administración del EAE 30 min antes del inicio de la isquemia previene parcialmente el daño inducido por la isquemia y la reperfusión [10]. Sin embargo, este esquema de administración limita el uso del EAE como método profiláctico o en situaciones como cirugías o trasplantes (donde puede determinarse el inicio de la isquemia). Por esta razón, se propone establecer la ventana terapéutica del EAE, así como evaluar su efecto sobre los sistemas antioxidantes celulares con el fin de determinar si sus propiedades antioxidantes están involucradas en su mecanismo neuroprotector.

2. HIPÓTESIS

Debido a que: 1) el estrés oxidativo participa en el daño inducido por la isquemia y la reperfusión; 2) se puede prevenir el daño neuronal cuando se emplean agentes antioxidantes o que inhiben la formación de radicales libres; y 3) se ha observado que la administración previa del EAE protege parcialmente en un modelo de isquemia cerebral, es posible que:

El establecimiento de la ventana terapéutica del EAE, ayude a establecer el mejor esquema de administración del EAE que genere la mayor protección contra el daño oxidativo inducido por la isquemia/reperfusión.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la ventana terapéutica del EAE en un modelo de isquemia-reperfusión cerebral.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de diferentes tiempos de reperfusión en animales sometidos a 2 h de isquemia.
- Evaluar el efecto del EAE sobre el área de infarto que se induce con 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión.
- Evaluar el efecto del EAE sobre la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).
- Evaluar el efecto del EAE sobre los niveles de glutatión (GSH).

II. ANTECEDENTES

La Enfermedad Vascul ar Cerebral (EVC) es una patolog ía cr ónico-degenerativa y se divide en dos clases:

- a) **Isquémica**, se produce cuando se interrumpe el aporte sanguíneo a una región del cerebro causando una alteración neurológica súbita. En México el 80% de los casos son de tipo isquémico [3] y
- b) **Hemorrágica**, que se genera de la ruptura de una arteria cerebral con sangrado en alguna zona del cerebro [11].

1. ISQUEMIA

Se entiende como isquemia cerebral, la disminución o el cese de la circulación sanguínea, lo que desencadena una serie de eventos que a la postre traen consecuencias graves, que pueden llegar hasta la muerte.

La isquemia cerebral se clasifica en dos tipos:

- a) **Global**. Generalmente secundaria a un paro cardíaco o a la oclusión múltiple de arterias cerebrales intra y/o extra craneales (arterias carótidas y vertebrales). En este tipo de isquemia el daño es difuso y se afectan las neuronas que están en las regiones más susceptibles al daño como la región CA1 del hipocampo, el estriado, las capas 3, 5 y 6 de la corteza cerebral y el cerebelo. La pérdida temporal, pero completa, del flujo sanguíneo que acompaña a un paro cardíaco, no debe durar más de 5-10 min, de lo contrario el paciente podría mantenerse con vida pero en estado vegetativo.
- b) **Focal**. En este tipo de isquemia el flujo sanguíneo disminuye en un área definida, debido al bloqueo de algún vaso sanguíneo provocado por una embolia, trombosis u oclusión. En la zona central, donde el flujo sanguíneo es mínimo, las reservas energéticas se agotan por lo que las células de esta región están destinadas a morir (*área de infarto*). A la región que rodea a esta área se le conoce como *área de penumbra*. En esta región el flujo residual depende de la

circulación colateral, que preserva la viabilidad celular aunque no su función [4]. Debido a esto las células de esta zona son susceptibles a ser rescatadas. La isquemia focal cerebral, que dura más de 1 h, invariablemente ocasiona un infarto cerebral [12].

2. PATOFISIOLOGÍA DEL SÍNDROME DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN (I/R)

A pesar de que el cerebro constituye solo el 2% del peso corporal, las neuronas del cerebro humano utilizan el 20% del oxígeno consumido por el cuerpo. Esto indica la alta tasa metabólica de estas células para mantener sus funciones normales y su viabilidad. Por lo tanto, la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo dispara una serie de eventos que finalmente llevarán a la muerte celular si la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) no ocurre oportunamente.

El daño cerebral isquémico es el resultado de una secuencia compleja de eventos que se desarrollan a lo largo del tiempo y el espacio. Dentro de estos eventos se encuentran [12,13].

- a) La disminución del flujo sanguíneo induce hipoxia e hipoglucemia. Al no haber aceptor final de electrones (O_2), disminuye la fosforilación oxidativa y consecuentemente la producción de ATP.
- b) La disminución en el nivel de ATP induce un mal funcionamiento de la ATPasa de Na^+/K^+ , permitiendo la entrada de Na^+ y la salida de K^+ . Esto ocasiona la despolarización de la célula y la liberación de neurotransmisores como el glutamato y el aspartato. La acumulación de glutamato en el espacio extracelular (excitotoxicidad) también se debe a una falla de los sistemas de recaptura y de la enzima que cataliza la conversión de glutamato a glutamina, ya que ambos dependen de ATP.
- c) El término excitotoxicidad se emplea para definir el daño celular inducido por la sobreexcitación de los receptores de glutamato. Los aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato) interactúan por lo menos con dos tipos diferentes de receptores asociados a canales iónicos (ionotrópicos) denominados de acuerdo

a sus agonistas farmacológicos: 1) N-metil-D-aspartato (NMDA), 2) kainato y 3) α -amino-3-hidroxi-5-metililoxazol-4-propiónico (AMPA). La activación de los receptores AMPA/kainato, despolariza las membranas ya que están acoplados a canales iónicos permeables tanto a Na^+ como a K^+ . Además, secundario a la entrada de Na^+ , entra agua, observándose un hinchamiento marcado del soma y las dendritas.

- d) La despolarización de la membrana permite que el ion Mg^{2+} que bloquea al canal iónico de los receptores NMDA sea removido, permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula. El Ca^{2+} también puede entrar a la célula por canales permeables a Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que induce una mayor liberación de glutamato. El aumento intracelular de Ca^{2+} no solo se debe a la entrada de Ca^{2+} , sino también a su liberación de pozas internas (mecanismo mediado por el inositol trifosfato).
- e) El aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} provoca la activación de varias enzimas como: endonucleasas, fosfolipasas, calpaina, sintasa de óxido nítrico, proteína cinasa C, xantina oxidasa, entre otras.
- f) La activación de ciertas enzimas induce la producción de ciertos radicales libres, los cuales generan un estado de estrés oxidativo. A continuación se mencionan algunas de las enzimas que se activan durante el infarto cerebral: la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa-2, la NADPH oxidasa (las 3 productoras de anión superóxido) y la sintasa de óxido nítrico (productora de óxido nítrico que puede reaccionar con otras especies radicales y formar especies más reactivas).

3. GENERALIDADES SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO

3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Aunque los organismos aerobios necesitan el O_2 para vivir, éste en exceso puede ser letal. La toxicidad del O_2 se debe a la formación de las ERO, ya que son más reactivas que el O_2 en su estado basal. La mayor parte del O_2 que consumen los organismos aerobios se reduce a H_2O por el complejo de la citocromo oxidasa

(citocromo aa3) de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 1A). Sin embargo, esta reacción también se puede llevar a cabo en 4 pasos univalentes (Figura 1B).

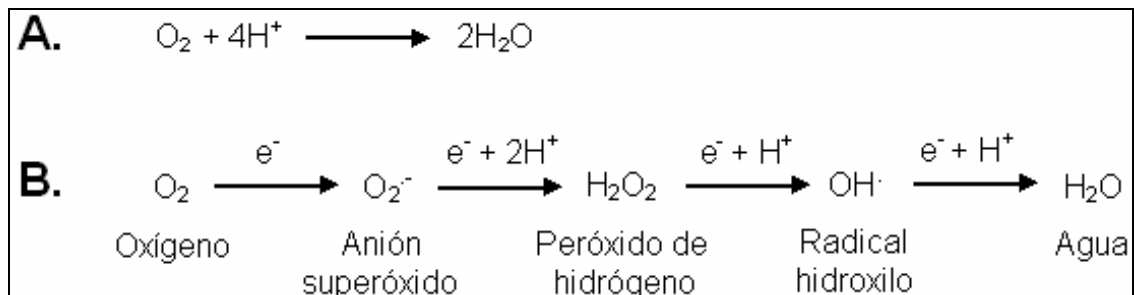


Figura 1. A. Reducción tetravalente del oxígeno. **B.** Reducción univalente del oxígeno.

Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo oxidasa y difunden al resto de la célula [14].

A continuación se mencionan algunas características de las principales ERO y ERN:

A. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Cuando una molécula de O_2 capta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, llamada anión superóxido. La formación de $O_2^{\bullet-}$ ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). Alrededor del 1% del O_2 consumido en la respiración se convierte en $O_2^{\bullet-}$. Se ha calculado que la concentración de este radical en la célula se encuentra en el orden nanomolar. Contrario a lo que se pensaría, el $O_2^{\bullet-}$ es poco reactivo. Solo reacciona a una tasa importante con quinonas, fenoles, Fe, algunas proteínas y con otros radicales como el propio $O_2^{\bullet-}$, el óxido nítrico y los radicales fenoxil. La dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$ ocurre solo cuando se protona para formar el radical hidroperóxilo (HO_2^{\bullet}), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio [15].

B. Peroxido de hidrógeno (H_2O_2). La mayor parte del H_2O_2 proviene de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$. Sin embargo, también se genera durante la β -oxidación que se lleva a cabo en los peroxisomas y de algunas oxidases (xantina oxidasa, oxidases de aminoácidos, hexosas y fenoles). El H_2O_2 no es un radical libre por lo que es poco reactivo; sin embargo, puede difundir a través de los compartimentos celulares,

donde puede encontrar las condiciones para generar especies más tóxicas. El H_2O_2 tiende a formar aductos con carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. No reacciona con compuestos como el NADPH, el ADN o los lípidos; pero inactiva enzimas como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa o la fosfatasa de fructosa 1-6 difosfato. El H_2O_2 es tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 μM [15].

C. Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). Se forma a partir del $\text{O}_2^{\bullet-}$ y del H_2O_2 en presencia de hierro. Es un oxidante en extremo reactivo que interactúa con casi todas las biomoléculas que se encuentran en los organismos (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos). No difunde debido a que reacciona muy rápido ($10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). El H_2O_2 en presencia de iones metálicos como el Cu^+ o el Fe^{2+} produce el $\bullet\text{OH}$ y el ion hidroxilo, a través de la reacción conocida como “Reacción de Fenton” (Figura 2). Se sabe que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ capaz de reducir al Fe^{3+} a Fe^{2+} y O_2 , lo que favorece la Reacción de Fenton. Otra reacción a través de la cual se puede producir el $\bullet\text{OH}$ es la “Reacción de Haber-Weiss”, en la que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ reacciona con el H_2O_2 en presencia de un metal (regularmente Fe^{2+}), produciendo H_2O , O_2 y el $\bullet\text{OH}$ (Figura 2) [14].

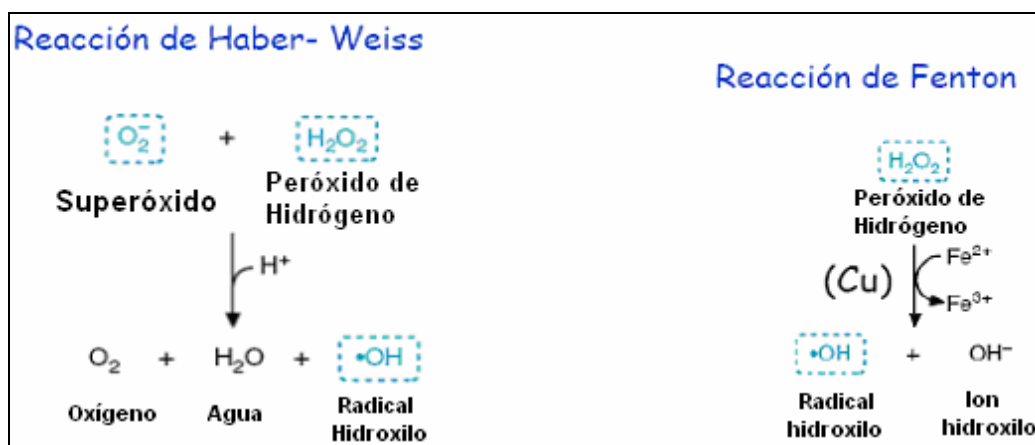


Figura 2. Reacción de Haber-Weiss (izquierda) y de Fenton (derecha).

D. Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). El $^1\text{O}_2$ no es un radical libre, ya que no contiene electrones desapareados, pero se le considera como tal debido a su gran reactividad. El $^1\text{O}_2$ se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Se forma, sobre todo, cuando algunos pigmentos como la clorofila, el retinal, las flavinas y las porfirinas se iluminan en presencia de O_2 [9]. Esta especie es muy

reactiva ya que es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares como los fosfolípidos de las membranas plasmáticas y mitocondriales, las proteínas y el ADN [16].

3.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Además de las ERO, recientemente se ha descubierto que hay otras especies derivadas del nitrógeno y que son importantes en los sistemas biológicos. Al igual que en las ERO existen especies radicales como el: óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y especies no radicales como el: peroxinitrito (ONOO^-), ácido nitroso (HNO_2), cloruro de nitrilo (NO_2Cl), catión nitrosilo (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), tetróxido de dinitrógeno (N_2O_4), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), catión nitronio (NO_2^+) y alquil peroxinitratos (ROONO^-). Las ERN más estudiadas son el $\cdot\text{NO}$, el ONOO^- y el $\cdot\text{NO}_2$; siendo las dos primeras las de mayor importancia en los sistemas biológicos, ya que el $\cdot\text{NO}_2$ ha recibido atención previa debido a su importancia como contaminante ambiental [17]

A. Óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). El $\cdot\text{NO}$ es un gas incoloro, relativamente soluble que es sintetizado en las células por la familia de la sintasa de óxido nítrico, a partir del grupo guanidino de la arginina. El $\cdot\text{NO}$ es una especie radical (ya que posee un electrón desapareado) y al igual que el $\text{O}_2\cdot^-$ es poco reactivo con moléculas biológicas. Sin embargo, reacciona rápidamente con otros radicales como con el O_2 generando el $\cdot\text{NO}_2$ o con el $\text{O}_2\cdot^-$ generando el ONOO^- (Figura 3), siendo ambos compuestos más oxidantes que el $\cdot\text{NO}$ [15].

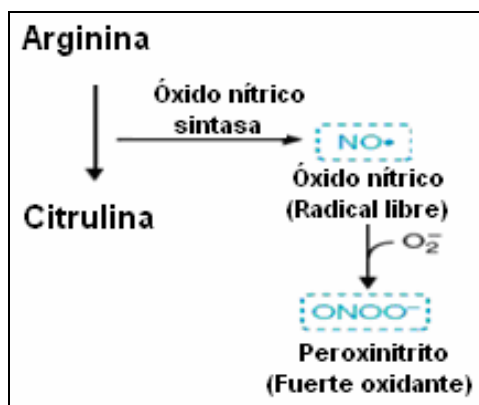


Figura 3. Esquema de producción del óxido nítrico y el peroxinitrito

B. Peroxinitrito (ONOO⁻). El ONOO⁻ es sumamente citotóxico ya que es capaz de interactuar con diversas moléculas para generar especies aun más reactivas. Puede reaccionar con el CO₂ para formar el peroxocarbonato (ONOOCO₂⁻) que es altamente reactivo o puede protonarse para formar el ácido peroxinitroso (ONOOH) que se homolisa en [•]OH y [•]NO₂.

Por otro lado, el ONOO⁻, vía el mismo o sus productos, es capaz de oxidar a las lipoproteínas de baja densidad, liberar iones cobre por la destrucción de la ceruloplasmina o atacar a los residuos de tirosina de diferentes proteínas (Figura 4), como se ha observado en algunas enfermedades inflamatorias [18].

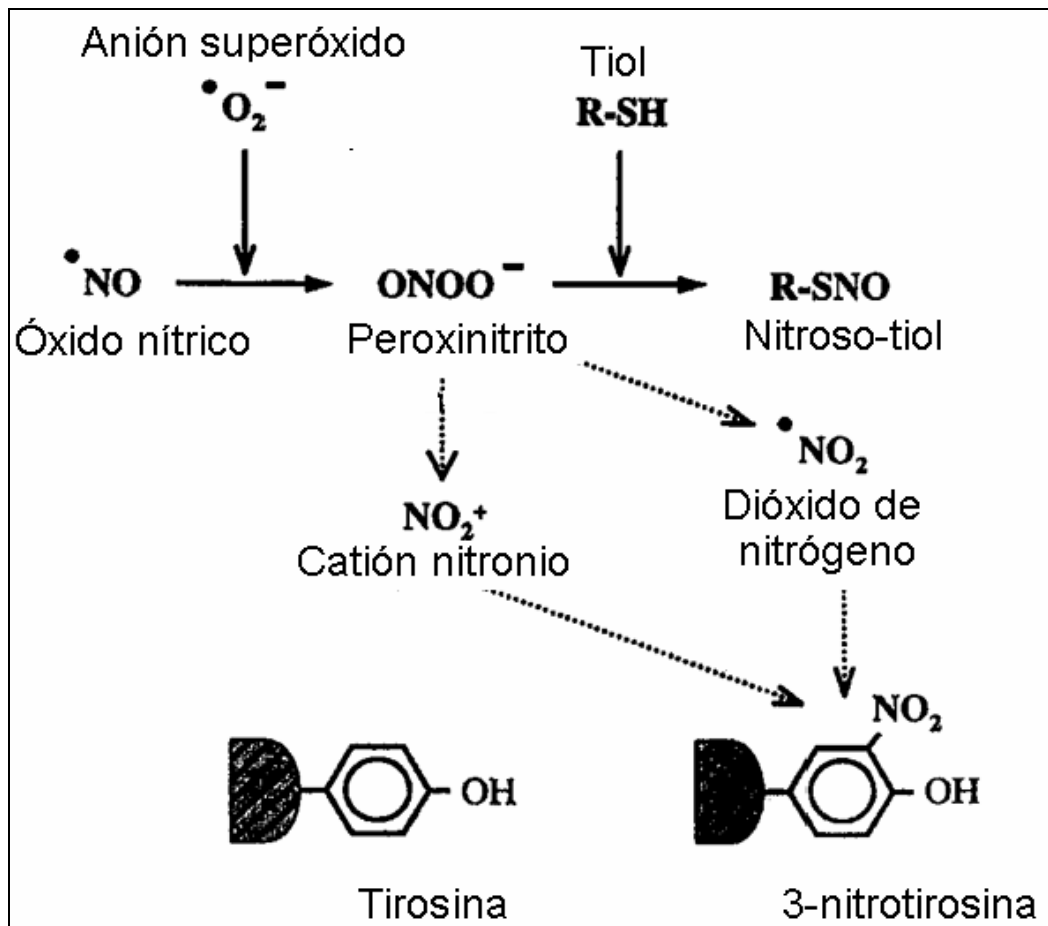


Figura 4. Esquema de la nitración de los residuos de nitrotirosina

Finalmente, en la figura 5 se presenta un esquema general de la producción de radicales libres.

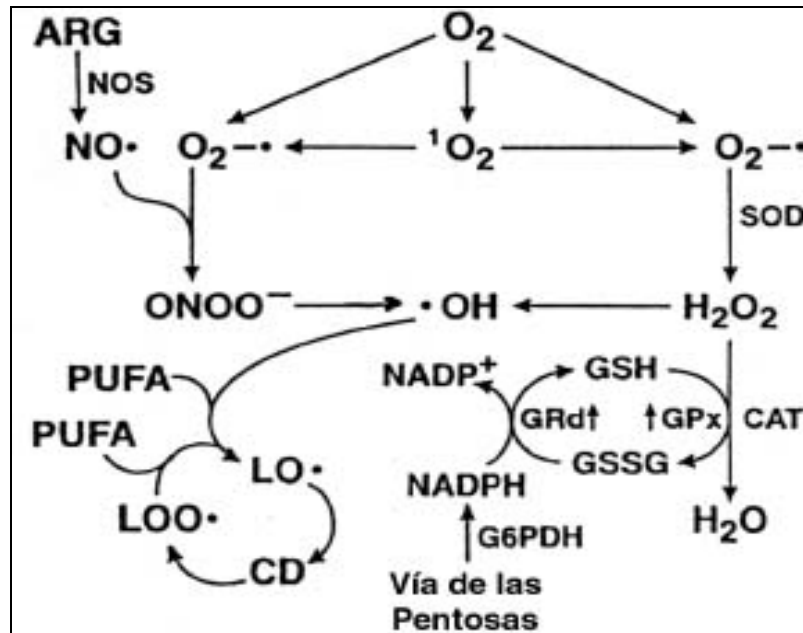


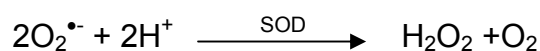
Figura 5. Esquema simplificado (no estequiométrico) de la producción de las principales especies de oxígeno y de nitrógeno y otros radicales. Abreviaturas: NOS, óxido nítrico sintasa; ARG, arginina; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH, glutatión reducido; GRd, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GSSG, glutatión oxidado; G6PDH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; LO• y LOO•, lipoperoxilos; y PUFA, ácidos grasos poliinsaturados.

3.3 Defensas antioxidantes

Dado el potencial efecto destructivo de las ERO y las ERN, la célula cuenta con defensas para evitar el daño oxidativo [14]. Estos sistemas de detoxificación que se encuentran presentes en la célula, pueden ser de tipo enzimático y no enzimático [19].

3.3.1 Antioxidantes enzimáticos

A. Superóxido dismutasa (SOD). La SOD (EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación del anión $O_2^{\bullet -}$ a O_2 y H_2O_2 [12-14]. Esto se logra a través de oxidaciones y reducciones sucesivas del metal de transición del sitio activo de la enzima, en un mecanismo de tipo ping-pong [20].

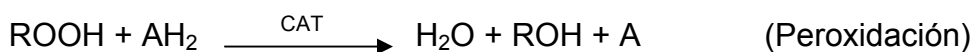
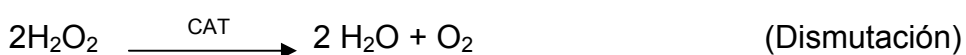


En humanos existen tres isoformas [21-23], que se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos, todos productos de genes diferentes [24]:

- Una SOD mitocondrial, que depende de manganeso (**MnSOD**). Es un homotetrámero (96 kDa) que contiene un átomo de Mn por subunidad. Durante la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ el Mn (III) pasa a Mn (II) y regresa nuevamente a Mn (III) [25]. La Mn-SOD se induce y reprime por citosinas; además es influenciada moderadamente por algunas especies oxidantes [26].
- Una SOD citosólica, que depende de cobre y zinc (**CuZnSOD**). Es una enzima muy conservada. Posee 2 subunidades idénticas de alrededor de 17 kDa cada una. El sitio activo está constituido por un átomo de Cu y uno de Zn unidos por un residuo de histidina. Se cree que esta isoforma tiene una función importante en la primer línea de defensa antioxidante [27-29].
- Una SOD extracelular que también depende de cobre y zinc (**EC-SOD**). Es una glucoproteína tetramérica secretoria. No se induce por su sustrato u otros oxidantes y su regulación se lleva a cabo de manera coordinada por citosinas [30].

La SOD no es realmente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad, el H_2O_2 , es un agente tóxico. Sin embargo, la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ es el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación completa de este radical. El segundo paso depende de las enzimas que metabolizan el H_2O_2 .

B. Catalasa (CAT). La CAT (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína tetramérica de 240 kDa. Se localiza principalmente en peroxisomas. Dismuta H_2O_2 a H_2O y O_2 . Con donadores de protones (metanol, etanol, ácido fórmico, etc.) muestra actividad de peroxidasa [31].



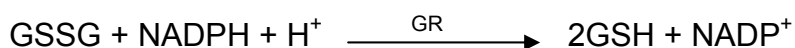
Su tiempo de vida media en la circulación es de 6 a 8 min [32]. En mamíferos está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo [33]. En la célula se localiza en citosol, mitocondrias y organelos subcelulares como los peroxisomas. En los eritrocitos existe en una forma soluble [34].

C. Glutación peroxidasa (GPx). La GPx (EC 1.11.1.19) contiene un residuo de selenocisteína en cada una de sus cuatro subunidades idénticas, que es esencial para la actividad enzimática [35]. La GPx (80 kDa) cataliza la reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos (ROOH) y el H₂O₂ usando al glutatión (GSH) como cofactor. De hecho el metabolismo del GSH es uno de los mecanismos de defensa antioxidante más importante en la célula [36-39].



Existen cinco isoformas de GPx en mamíferos y los niveles de cada isoforma varían según el tejido. La GPx citosólica y mitocondrial (cGPx o GPx1), la GPx plasmática o extracelular (GPxp), la gastrointestinal (GPxgi), la de fosfolípidos (GPxpl) [40] y la quinta es una GPx que se ha encontrado recientemente (GPx5), expresada específicamente en la epidídimo e interesantemente es independiente de selenio [41].

D. Glutación reductasa (GR). La GR (EC. 1.8.1.7) en sí no es una enzima antioxidante, pero se considera dentro de este círculo porque se encarga de reducir al puente disulfuro del glutatión oxidado (GSSG), para formar nuevamente GSH. La GR (107 kDa) mantiene el nivel de GSH en la célula. La GR es reducida por el NADPH, formando una semiquinona de FAD, un radical sulfuro y un grupo tiol. La GR reducida reacciona con el GSSG, resultando en un intercambio disulfuro, que produce una molécula de GSH y un complejo GR_{red}-SG. Un rearrreglo de electrones que resulta en otro intercambio disulfuro libera al segundo GSH y la GR oxidada [42].



3.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

En esta categoría se encuentran las vitaminas A, C y E, la bilirrubina, el GSH, el ácido úrico, y las melaninas, entre otros. Los antioxidantes no enzimáticos pueden dividirse en: 1) Endógenos, ya que se sintetizan en el organismo (GSH, ácido úrico, melaninas y melatonina) y 2) Exógenos, ya que se adquieren en la dieta (vitaminas, compuestos sulfurados, flavonoides, etc).

A. Glutación (GSH). La figura 6 muestra que el GSH es un tripéptido (glu-cys-gly). Se sintetiza continuamente en la célula y se degrada fuera de ella. Es el tiol celular más abundante; se mantiene a una concentración del orden de mM. Algunas de las funciones del GSH son: 1) participar en la formación y ruptura de los puentes disulfuro, 2) contribuir a desechar el H_2O_2 ya que es cofactor de la GPx y 3) actuar como cofactor de algunas enzimas [43]. El GSH se mantiene en forma reducida principalmente a través de la GR [44]. En condiciones de estrés oxidativo se forma gran cantidad de GSSG que se secreta y se degrada [45]. El GSH es capaz de reaccionar con los radicales libres, así como con el 1O_2 , el *OH y el $ONOO^-$.

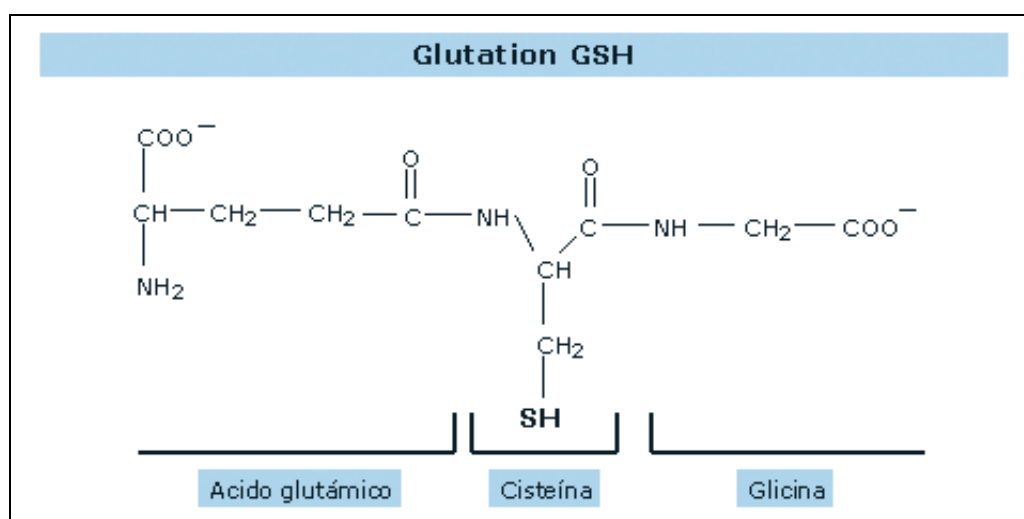


Figura 6. Estructura del glutatión reducido.

B. Ascorbato. Es cofactor de varias hidroxilasas, su deficiencia causa el escorbuto. El ascorbato o vitamina C se encuentra principalmente en frutas y vegetales, y es soluble en agua. Tiene 2 hidroxilos ionizables que hacen de él un excelente agente reductor. Es capaz de reducir el Fe(III), incluso cuando se encuentra unido a proteínas. También reduce aunque a una menor velocidad, el $O_2^{\bullet-}$. Participa en la

eliminación del H_2O_2 por medio de la ascorbato peroxidasa, reacciona con el $^1\text{O}_2$, el ácido hipocloroso, el ONOO^- , los radicales peróxilo y el radical tocoferilo. El radical ascorbilo (monodeshidroascorbato) que se forma es estable y se puede desprotonar espontáneamente generando el ascorbato y el dideshidroascorbato (Figura 7). El ascorbato es un excelente reductor, siempre y cuando no esté en presencia de Fe o Cu, pues en esas condiciones se genera el $\cdot\text{OH}$ [15].

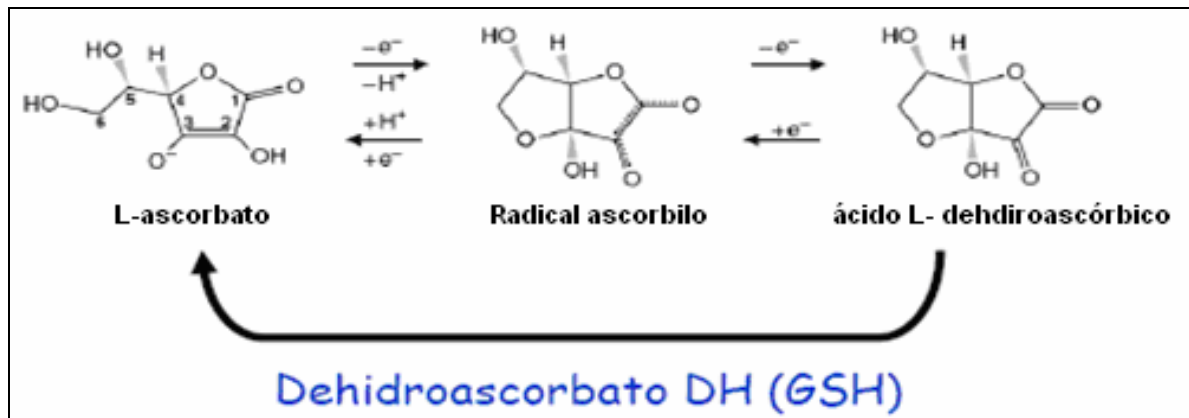


Figura 7. Oxidación del ascorbato.

C. Tocoferol. También conocido como vitamina E, es un compuesto esencial que se obtiene de los aceites vegetales (Figura 8). Existen 8 isómeros, siendo el más activo el RRR- α -tocoferol [46]. Las células incorporan el tocoferol a las membranas plasmáticas. Reacciona con los radicales lipoperóxido y tocoferilo, limitando de esta manera la propagación de la lipoperoxidación. Al igual que el ascorbato, puede reducir el Fe (III) y el Cu (II) por lo que puede ser prooxidante en presencia de estos metales.

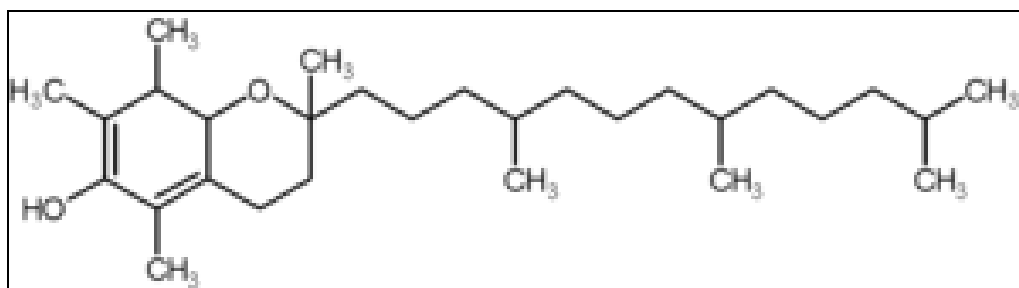


Figura 8. Estructura del α -tocoferol. (Vitamina E).

D. Carotenos. Los humanos obtienen el retinol (Vitamina A) de la dieta, principalmente de alimentos de origen animal, y a partir del β -caroteno (Figura 9), que se encuentra en vegetales como la zanahoria, espinacas, soya, perejil, etc.

Los carotenos se parten en dos mediante la acción de una dioxigenasa para generar el aldehído retinal que después es reducido a retinol. Los carotenos se almacenan principalmente en el tejido adiposo, el hígado, el cuerpo lúteo, la glándula adrenal, la mácula de la retina y los testículos. Gracias a las dobles ligaduras que poseen, son excelentes inactivadores del $^1\text{O}_2$. Los carotenos también reaccionan con los radicales peróxido y el $\cdot\text{NO}_2$, generando un radical estable que puede ser reducido por el ascorbato [15].

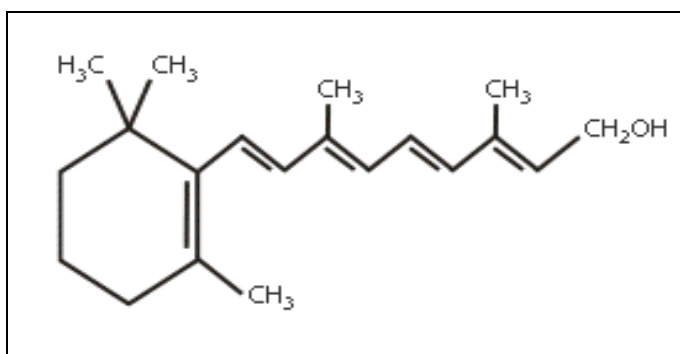


Figura 9. Estructura de la vitamina A.

E. Otros antioxidantes no enzimáticos. El urato (Figura 10) reacciona con ERO generando el radical de urato, el cual es estable por resonancia electrónica y se puede reducir con el ascorbato.

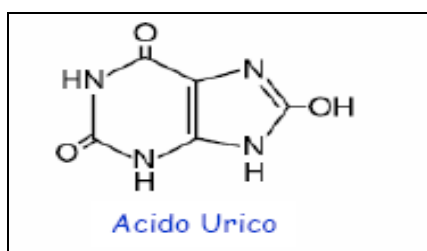


Figura 10. Estructura del ácido úrico.

Las melaninas son productos de la polimerización de la dihidroxifenilalanina, producida por las oxidasas de fenoles, como la tirosinasa, o del dihidroxinaftaleno generado por la sintasa de policétidos. Las melaninas son polímeros heterogéneos, insolubles de elevado peso molecular. Tienen una gran cantidad de electrones desapareados, lo que les permite absorber la luz UV y la visible en todas las longitudes de onda. Reaccionan con cualquier especie radical funcionando como oxidantes o reductores. Otro ejemplo de antioxidante exógenos es el ajo y todos sus compuestos sulfurados (se hablará de ellos mas adelante).

4. ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SÍNDROME DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo que se induce durante la reperfusión, es un evento que exagera el daño inducido por la isquemia cerebral. La reoxigenación provee de O_2 a las células para mantener la viabilidad neuronal; pero también, ese O_2 sirve como sustrato para numerosas reacciones de oxidación en donde se producen ERO [6,47]. La figura 11 muestra las principales fuentes de ERO y ERN durante el infarto cerebral [6].

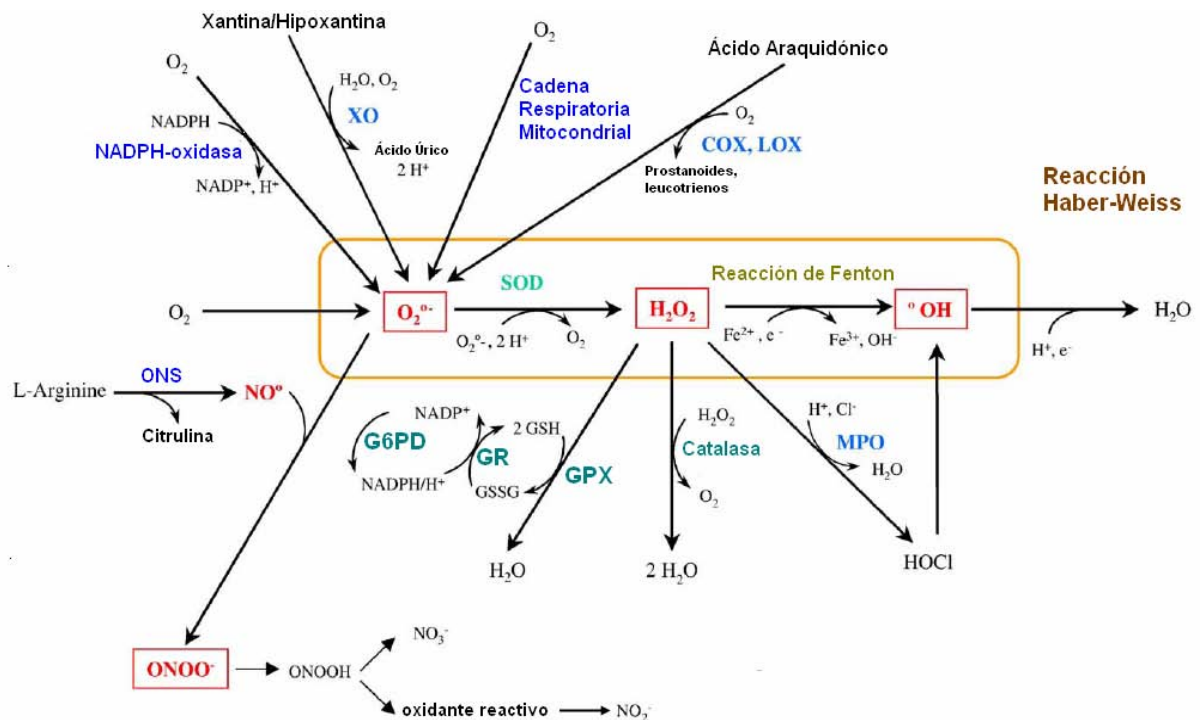


Figura 11. Esquema que muestra las principales fuentes de radicales libres durante la isquemia/reperfusión. Abreviaturas: XO, xantina oxidasa; COX, ciclooxigenasa; LOX, lipooxigenasa; ONS, sintasa de óxido nítrico; SOD, superóxido dismutasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; MPO, mieloperoxidasa; HOCl, ácido hipocloroso. Tomado de [6].

Se ha demostrado *in vivo*, que la mitocondria es una fuente importante de radicales libres durante la reperfusión postisquémica temprana en cerebro. Además, se ha observado un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ que exagera el infarto cerebral, en ratones deficientes de MnSOD y sometidos a isquemia permanente o transitoria. Por otro lado, la sobreexpresión de MnSOD confiere resistencia contra la peroxidación lipídica de la membrana en animales sometidos a isquemia transitoria.

Los leucocitos polimorfonucleares (LPN) tienen un papel importante el estrés oxidativo que se induce durante la reperfusión postisquémica. Los LPN contribuyen a la producción de radicales libres a través de 2 enzimas: la mieloperoxidasa (que produce HClO) y la NADPH oxidasa (que produce $O_2^{\bullet-}$).

La activación de la fosfolipasa A_2 produce la liberación del ácido araquidónico, el cual es metabolizado por la ciclooxigenasa 2 (COX2) produciendo $O_2^{\bullet-}$, hidroperóxidos y cicloperóxidos, que contribuyen al daño membranar. Se ha reportado la inducción del mRNA y de la proteína de la COX2, 6 h después de la isquemia transitoria. Esta regulación positiva está asociada con el incremento de la prostaglandina E2, uno de los productos de COX2 [6].

En condiciones de hipoxia o isquemia, al disminuir los niveles de ATP incrementan los niveles de ADP y AMP. Por ello el AMP es degradado a adenosina y ésta a inopina, la cual finalmente se degrada a hipoxantina. En estas condiciones la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa (XO) a través de la oxidación de su grupo tiol. La XO cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y también la oxidación de la xantina a ácido úrico, generando $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 .

La sintasa de óxido nítrico (SON) es otra fuente de radicales libres. Esta enzima utiliza la arginina y el O_2 como sustratos para producir óxido nítrico ($^{\bullet}NO$). El $^{\bullet}NO$ se combina rápidamente con el $O_2^{\bullet-}$ para generar el $ONOO^-$, que es sumamente reactivo. En modelos de isquemia cerebral transitoria, inhibidores selectivos de la SON disminuyen la producción de nitrotirosina.

4.1 Antioxidantes en la isquemia/reperfusión

Debido a que durante la isquemia/reperfusión se induce un estado de estrés oxidativo, se ha evaluado el efecto de compuestos con capacidad antioxidante. En los últimos años, las estrategias antioxidantes más usadas han consistido en el uso de compuestos que atrapan radicales libres (Tabla 1). Mostrando todos estos compuestos un efecto protector en varios modelos de isquemia cerebral [13].

Tabla 1. Antioxidantes utilizados en isquemia cerebral

Antioxidante	Efecto como antioxidante
Ácido lipóico	Atrapa $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot 1}$ y $\cdot\text{NO}$. Atrapa metales de transición, recicla otros antioxidantes (vitamina A y C) e incrementa los niveles de GSH.
N-acetilcisteína	Atrapa $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 y radicales peroxilo, incrementa la síntesis de GSH.
Tirilazad	Atrapa $\text{O}_2^{\cdot -}$ y radicales peroxilo, atrapa hierro.
Ácido úrico	Importante antioxidante en el plasma, atrapador de ONOO^- .
Melatonina	Atrapa $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, ONOO^- , $\text{O}_2^{\cdot -}$ y radicales peroxilo. Incrementa la actividad de SOD, GPx, GR, CAT, G6PD y la síntesis de ARN_m de SOD.
PBN	Nitrona, atrapador de radicales libres con base oxígeno-carbono.
NXY-059	Nitrona relacionada con el PBN. Es más efectivo que el PBN.
Vitamina E	Vitamina liposoluble, potente antioxidante. Inhibe la propagación de la lipoperoxidación.
DHA	Forma oxidada de la vitamina C. Penetra en la barrera hematoencefálica.
EPC-K1	Diéster de fosfato de la vitamina C y E. Atrapa selectivamente $\cdot\text{OH}$, penetra en la barrera hematoencefálica.
Resveratrol	Atrapador de radicales libres. Máximo componente en el vino tinto.
Oxiresveratrol	Atrapa $\cdot\text{NO}$, H_2O_2 .
Edaravona	Reduce los niveles de $\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2^{\cdot -}$.
L-carnitina	Restaura los niveles de MDA y la actividad de SOD. Junto con la vitamina E actúa de manera sinérgica aumentando los niveles de GSH.

$\cdot\text{OH}$: radical hidroxilo, $\text{O}_2^{\cdot 1}$: Oxígeno singulete, $\cdot\text{NO}$: óxido nítrico, H_2O_2 : peróxido de Hidrógeno, $\text{O}_2^{\cdot -}$: anión superóxido, ONOO^- : anión peroxinitrito, **MDA**: malondialdehído, **GSH**: glutatión reducido. Tomada de [13].

Por otro lado, se ha encontrado protección después de la inducción transitoria o permanente de la isquemia, usando compuestos que evitan la formación de algunos radicales libres [13]. Dentro de estos compuestos se encuentran inhibidores de la NADPH oxidasa, la COX o la XO (Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos que inhiben la producción de radicales libres.

Antioxidante	Modelo	Tratamiento	Efecto
Apocinina (Inhibe NADPH oxidasa)	Gerbos, OBAC, 5min.	5mg/kg/i.p., 30 min antes de la I.	Disminuye la muerte neuronal y la oxidación del ADN. Previene la activación de astrocitos y células de la glia.
Tenoxicam (inhibe COX)	Ratas, OBAC 45 min I/24h R.	2.5 o 10 mg/kg i.p. después de 45 min de la I.	Disminuye las lesiones en el hipocampo y la actividad de la MPO.

OBAC: Oclusión bilateral de arterias carótidas, **I**: isquemia, **R**: reperusión, **i.p.**: inyección intraperitoneal, **MPO**: mieloperoxidasa. Tomada de [13]

A pesar de la gran cantidad de compuestos antioxidantes que se han evaluado, solo 4 se han empleado en ensayos clínicos [13]:

- 1) Tirilazad. Atrapador de radicales libres (Fase III, estado: inefectivo).
- 2) Ebselen. Mimetiza la acción de la GPx (Fase III, estado: efectivo).
- 3) Edaravona. Se introdujo en el mercado japonés para su uso clínico en casos de isquemia en junio del 2001.

4) NXY-059. (Fase III, estado: en pruebas).

5. EL AJO

El ajo [*Allium sativum* (Familia: Alliaceae)], se ha consumido como especie y medicina desde hace muchos años en todo el mundo, debido a que posee propiedades como: antimicrobiano, antimicótico, antineoplásico, antihipertensivo, inmunosupresor, hipoglucémico, hipolipémico, antioxidante, entre otras [48]. Dichas propiedades, se atribuyen a los compuestos sulfurados que están presentes en el ajo, los cuales varían dependiendo de la presentación que se trate [49]. Se sabe que el ajo es rico en compuestos sulfurados y es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio [50].

El olor característico del ajo es debido a la alicina y a otros compuestos sulfurados solubles en aceite. Los dientes de ajo intactos contienen altas cantidades de γ -glutamiltisteínas, las cuales pueden ser oxidadas para dar alina. Cuando los dientes de ajo son cortados, la alinasa actúa sobre la alina generando la alicina, compuesto de olor característico extremadamente inestable que se descompone inmediatamente a dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS) y dialiltrisulfuro (DATS) incluyendo las vinilditiínas [51] y el ajoene [50] (Figura 12).

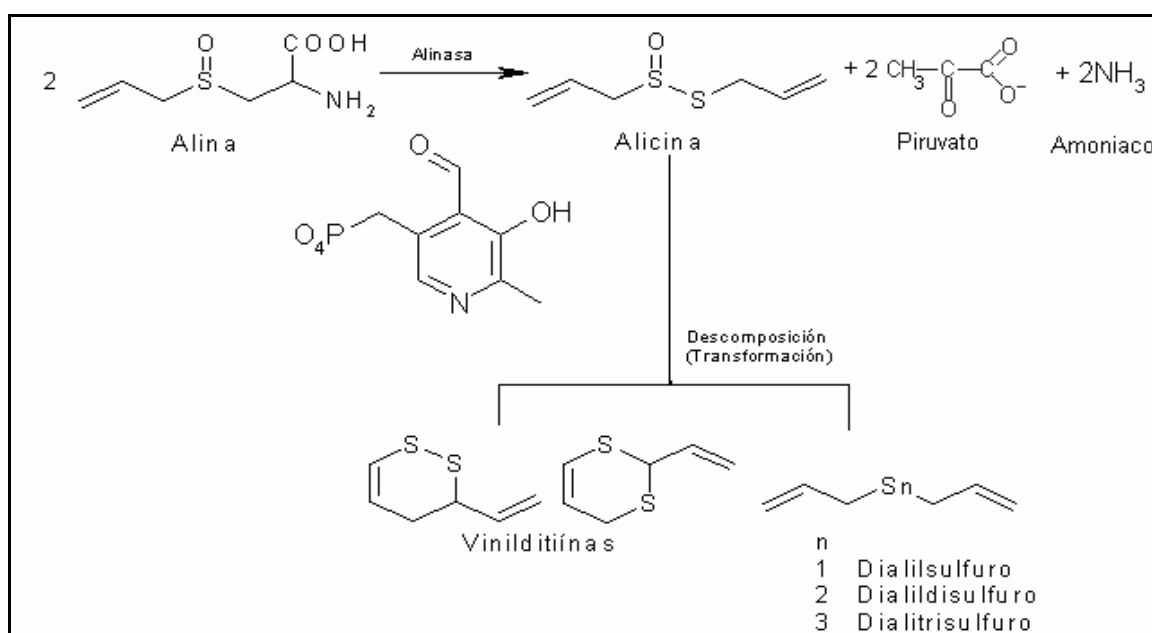


Figura 12. Cambios químicos que ocurren en el ajo cuando se corta. La enzima vacuolar alinasa, rápidamente transforma a la alina citosólica en alicina, la cual se descompone instantáneamente a otros compuestos como el dialilsulfuro (DAS), el dialildisulfuro (DADS), el dialiltrisulfuro (DATS), las vinilditiínas y el ajoene.

En la actualidad se han realizado estudios que apoyan las propiedades antioxidantes de diferentes preparaciones de ajo, como: extracto de ajo envejecido [9,52-56], el extracto acuoso [57], el polvo [58], o el aceite de ajo [59], entre otros. Dichas propiedades se han atribuido a algunos de sus compuestos sulfurados, los cuales varían dependiendo de la presentación de que se trate (Tabla 3).

Tabla 3. Principales compuestos sulfurados presentes en los dientes de ajo, el extracto de ajo envejecido, el polvo de ajo y el aceite de ajo^{a,b}

Diente de ajo	
	(mg/g producto)
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	6.0-14.0
γ -glutamylcisteínas ^c	5.0-15.0
Compuestos derivados de la alina ^d	3.5-8.0
Extracto de ajo envejecido	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	0.2-0.4
γ -glutamylcisteínas ^c	0.2-0.5
γ -glutamyl-S-alilcisteína	0.1-0.4
S-alilcisteína	0.5-0.7
S-alilmercaptocisteína	0.1-0.2
Compuestos derivados de la alina ^d	0.1-0.2
Polvo de ajo	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	10.0-17.0
γ -glutamylcisteínas ^c	12.0-35.0
Compuestos derivados de la alina ^d	4.0-11.0
Aceite de ajo	
<u>Destilación con vapor:</u>	
Dialildisulfuro	0.05-2.8
Dialiltrisulfuro	0.04-2.0
Alilmetiltrisulfuro	0.03-1.7
Compuestos derivados de la alina	0.2-11
<u>Macerado:</u>	
Vinilditiínas	0.1-4.7
Ajoene	0.02-1.1
Dialiltrisulfuro	0.02-0.45
Compuestos derivados de la alina ^d	0.4-6.0

^aTomada de [49].

^bLa *n* para cada producto fue de 7 a 15.

^cLos valores de las γ -glutamylcisteínas de todos los productos son la suma de los compuestos S-alil y S-*trans*-1-propenil.

^dLos compuestos derivados de alina incluyen: alicina y otros tiosulfonatos (después de la adición de agua), alilsulfuros, vinilditiínas, ajoene y S-alilmercaptocisteína.

5.1 Extracto de ajo envejecido (EAE)

A pesar de que existen diferentes presentaciones de ajo, el EAE posee ciertas ventajas de uso con respecto a las otras ya que: 1) no posee el olor característico de otras presentaciones [60]; 2) no muestra efectos tóxicos [61,62]; 3) tiene un alto

contenido de compuestos antioxidantes [63]; 4) se ha evaluado su uso en humanos [64-67]; y 5) es un producto que se vende comúnmente en Los Estados Unidos de América, Japón y algunas partes de Europa como un suplemento alimenticio.

El EAE es manufacturado por Wakanuga of America de la siguiente manera: los dientes de ajo se remojan en una mezcla de extracción que contiene etanol 15-20%. La mezcla anterior se envejece durante 18-20 meses (extracción natural) a temperatura ambiente. Después, el extracto se separa y se concentra para su uso [51,68].

El EAE Contiene principalmente constituyentes solubles en agua (Tabla 4) y pequeñas cantidades de compuestos solubles en aceite [69].

Tabla 4. Composición del extracto de ajo envejecido^{a,b}

Alina	0.32±0.13
Cicloalina	0.34±0.08
γ-glutamyl-S-alilcisteína	0.25±0.12
S-alilcisteína (SAC)	0.62±0.07
S-1-propenilcisteína (SPC)	0.37±0.04
S-alilmercaptocisteína (SAMC)	0.14±0.03
Ácido glutámico	1.2±0.2
Arginina	2.2±1.1

^aTomado de [42].

^bLos datos se expresan como media ± SD (mg/g producto) de 6 lotes.

El EAE se caracteriza por tener altos niveles de SAC, SPC y SAMC. El EAE carece del olor característico del ajo ya que durante el proceso de envejecimiento, los compuestos irritantes se transforman en compuestos más estables y menos tóxicos.

El EAE se ha estudiado en diferentes modelos y se ha encontrado que posee varias propiedades como las que se mencionan a continuación:

a) Efecto cardioprotector. Inhibe la agregación plaquetaria en la arteria coronaria [70] y disminuye los niveles de triglicéridos y colesterol en el suero [71], lo que promueve la circulación sanguínea [72]. Reduce los niveles de homocisteínas en el suero ocasionados por deficiencia de folato [73]. Además ha mostrado efecto antiaterogénico y antiarteriosclerótico [74].

- b) Efecto protector en hígado.** Protege contra el daño hepático inducido por el tetracloruro de carbono y el acetaminofen [75], previene los efectos mutagénicos ocasionados por la aflatoxina B1 en el hígado [76], previene al hígado de los efectos inducidos por el fenobarbital y bromobenceno [77], incrementa la detoxificación del acetaldehído [68] y disminuye el envenenamiento por la ingesta de metales pesados en ratas [78].
- c) Efecto antiinfeccioso y sobre el sistema inmune.** Incrementa la respuesta inmune contra agentes infecciosos en pacientes con SIDA [79], posee propiedades inmunoestimuladoras [80], inhibe la inmunosupresión producida por la luz UV [81] y aumenta la eficacia en vacunas contra el virus de la influenza, cuando se administra solo es tan eficiente como la vacuna [82].
- d) Efecto antioxidante y radio-protector.** Protege contra el daño oxidativo inducido por la radiación y la quimioterapia [83], previene la nefrotoxicidad inducida por la gentamicina [84], reduce daño antioxidante en fumadores [68], inhibe la lipoperoxidación [85], incrementa los sistemas antioxidantes en el cuerpo [86], atrapa radicales libres [87], inhibe formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico producidas por el t-butilhidroxiperoxido en fracciones microsomales de hígado [88] y disminuye la producción de H_2O_2 en células endoteliales, cuando estas son expuestas a un sistema generador de $O_2^{\bullet-}$ [89].
- e) Efecto anticancerígeno.** Inhibe el desarrollo de tumores [90], inhibe la formación y la bioactivación de nitrosaminas [91] y disminuye los niveles de prostaglandinas en el suero [92].

Además se le han encontrado propiedades antiestrés y antifatiga [93], mejora la memoria y ayuda en el déficit de aprendizaje [94], protege en modelos de Alzheimer debido a que bloquea la apoptosis inducida por el péptido β -amiloide (inhibe la actividad de la caspasa 3) [95], mejora el déficit cognitivo temprano en ratones transgénicos con Alzheimer [96] y disminuye el grado de glucosilación no enzimática de proteínas en pacientes diabéticos [97], entre otros efectos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

El EAE en su presentación comercial de Kyolic[®] liquid se adquirió de Wakunaga of America, Co., Ltd (Misión Viejo, CA).

La nicotidamida adenina dinucleótido fosfato, reducida (NADPH), el glutatión reducido (GSH), la glutatión reductasa (GR), el o-ftaldialdehído (OPA), la hematoxilina, el cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la diaminobencidina (DAB) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La azida de sodio se adquirió de Hycel de México, S.A de C.V.

El anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina se adquirió de Upstate (Lake Placid, VA). El anticuerpo secundario dirigido contra IgG de conejo se adquirió de Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England).

Todas las sales y solventes fueron adquiridos de casas comerciales conocidas.

2. ANIMALES

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 300-400 g de peso. Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento (Dieta comercial, Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc, Richmond, IN). Durante el estudio, las ratas se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a "Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research" [98], así como con "Los Lineamientos Locales sobre el Uso Ético de Animales para Experimentación". Todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales de realizaron. En cada experimento, el número de animales que se empleo fue de 6 para cada grupo.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales de los grupos control, sham (sometidos al procedimiento quirúrgico pero sin inducción de la isquemia) y sometidos a isquemia/reperfusión recibieron 1.2 mL/Kg peso/*i.p.* de solución salina estéril. Los animales de los grupos de EAE y sometidos a isquemia/reperfusión+EAE recibieron 1.2 mL/Kg peso/*i.p.* de EAE.

Los animales del grupo Sham no mostraron cambios con respecto a los del grupo control, por esta razón los resultados del grupo Sham no se muestran.

3.1 Efecto de la reperfusión

Los animales se sometieron a 2 h de isquemia y se sacrificaron a diferentes tiempos de reperfusión (Figura 13). El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del tiempo de la reperfusión sobre el área de infarto.

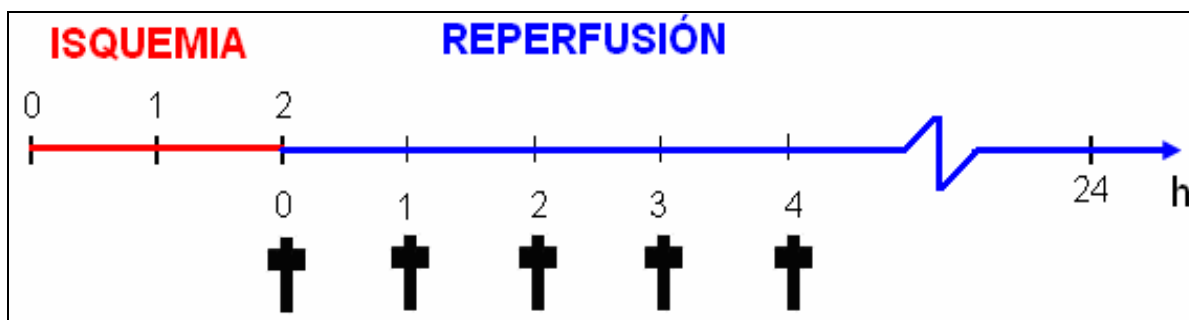


Figura 13. Efecto de la reperfusión en animales sometidos a 2 h de isquemia. La cruz indica el tiempo de sacrificio.

3.2 Ventana terapéutica

Del experimento anterior, se eligió 2 h de reperfusión para evaluar el tiempo óptimo de administración de EAE. El EAE se administró a diferentes tiempos (durante la isquemia, al inicio de la reperfusión y durante la reperfusión). Los animales se sacrificaron 2 h después del inicio de la reperfusión (Figura 14). Para los siguientes experimentos se eligió el tiempo en el que se observó el menor porcentaje de área de infarto.

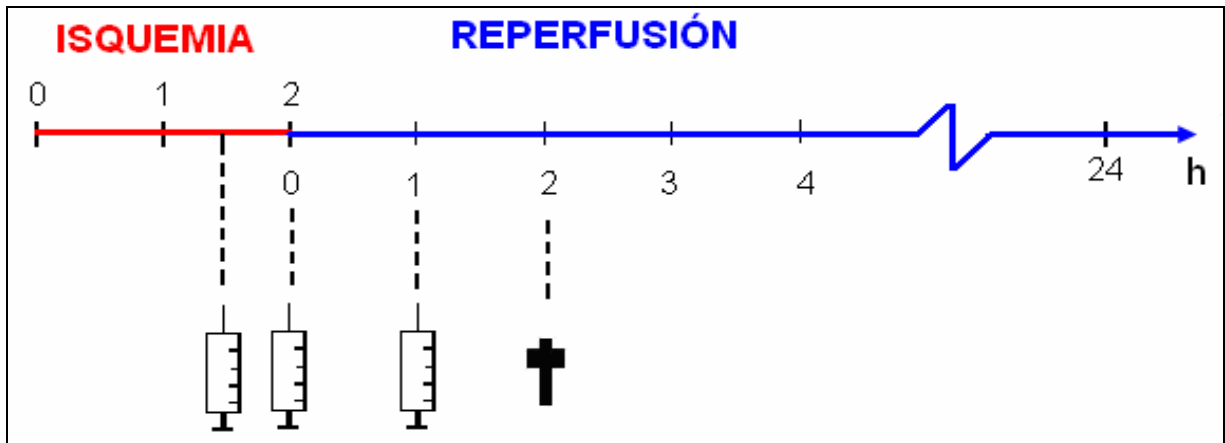


Figura 14. Tiempo óptimo de administración del EAE. La jeringa indica el tiempo de administración del EAE y la cruz el tiempo de sacrificio.

Después de determinar el tiempo de administración del EAE, se evaluó la ventana terapéutica (tiempo durante cual se mantiene el efecto protector inducido por el EAE). Los animales se sometieron a 2 h de isquemia y se les administró el EAE al inicio de la reperfusión. Posteriormente, los animales se sacrificaron a diferentes tiempos de reperfusión (Figura 15).

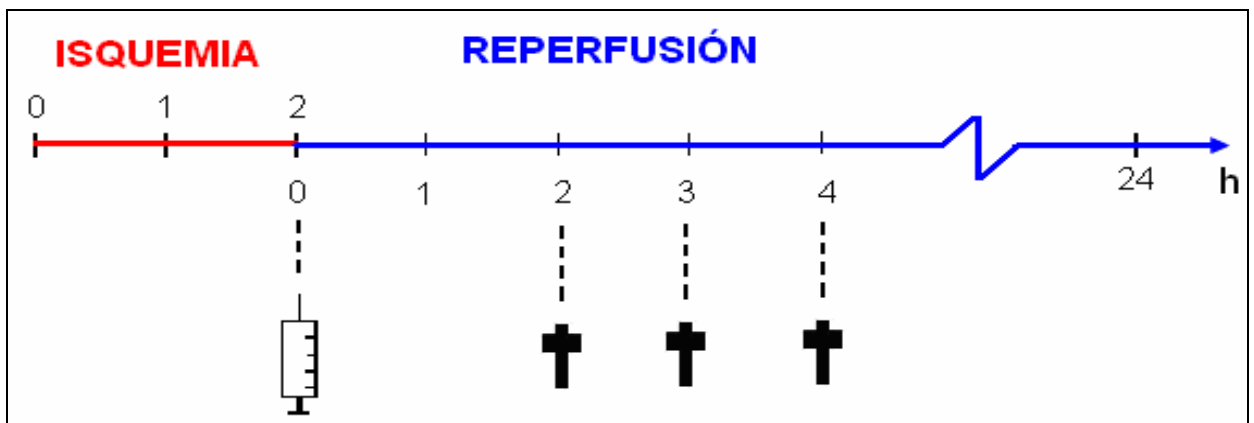


Figura 15. Ventana terapéutica La jeringa indica el tiempo de administración del EAE y la cruz el tiempo de sacrificio.

3.3 Optimización de la ventana terapéutica

Posterior a la determinación de la ventana temporal efectiva de protección del EAE, se evaluó la eficacia de más de una dosis. El esquema 1 muestra 2 tiempos de sacrificio (grupos independientes de animales), lo que permitió evaluar el curso temporal de protección inducida por el EAE (Figura 16).

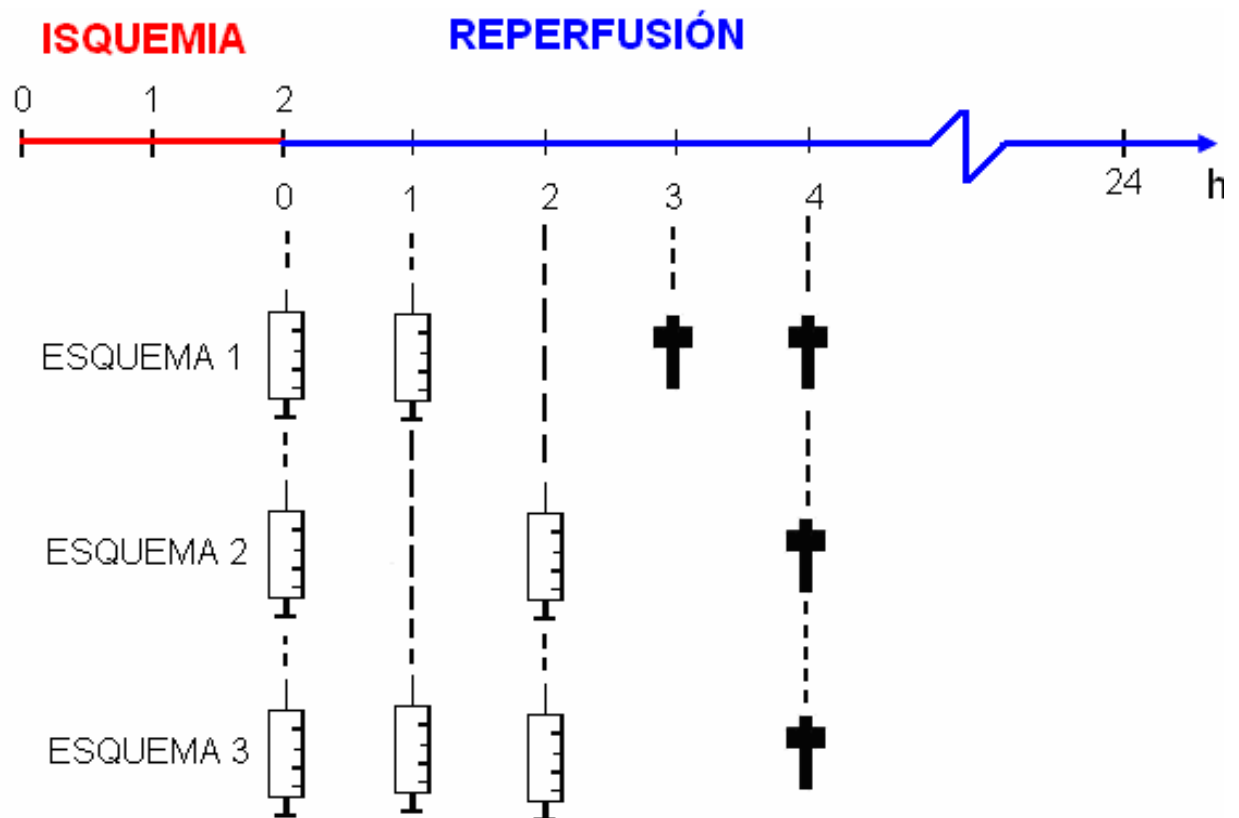


Figura 16. Optimización de la ventana terapéutica La jeringa indica el tiempo de administración del EAE y la cruz el tiempo de sacrificio. *Esquema 1:* Se administró el EAE al inicio y 1 h después del inicio de la reperfusión, un grupo se sacrificó 3 h después y el otro 4 h después del inicio de la reperfusión. *Esquema 2:* Se administró el EAE al inicio y 2 h después del inicio de la reperfusión, el sacrificio fue 4 h después del inicio de la reperfusión. *Esquema 3:* Se administró el EAE al inicio, 1 h y 2 h después del inicio de la reperfusión, el sacrificio fue 4 h después del inicio de la reperfusión.

3.4 Efecto del EAE sobre el estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes

Los animales se dividieron en 4 grupos: 1) Control (CT), tratados con solución salina; 2) Extracto de ajo envejecido (EAE), tratado con EAE; 3) Isquemia/reperfusión (2I/2R), sometidos a 2 h de isquemia/2 h de reperfusión y tratados con solución salina; y 4) Isquemia/Reperfusión+EAE (2I/2R+EAE), sometidos a 2 h de isquemia/2 h de reperfusión y tratados con EAE.

En este protocolo, para determinar el área de infarto, el nivel de 3-nitrotirosina, la actividad de las enzimas antioxidantes y el nivel de glutatión reducido, se obtuvieron muestras de 4 grupos independientes de animales.

4. MÉTODOS

4.1 Inducción de la isquemia cerebral

La isquemia focal cerebral se indujo por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) según el método propuesto por Longa *et al.* [99]. Los animales se anestesiaron con una cámara de halotano. Se realizó una incisión a la altura de la horquilla esternal y se localizó y aisló la arteria carótida externa (ACE) e interna (ACI) cuidadosamente. La oclusión de la ACM se logró con la inserción de un monofilamento de nylon (40 mm longitud y 0.24 mm de diámetro) en el lumen de la ACE y de la ACI (Figura 17). Dos horas después se le retiró el filamento, para iniciar la reperfusión. Este procedimiento fue realizado por la Dra. Alma Ortiz Plata, Departamento de Patología, INNN.

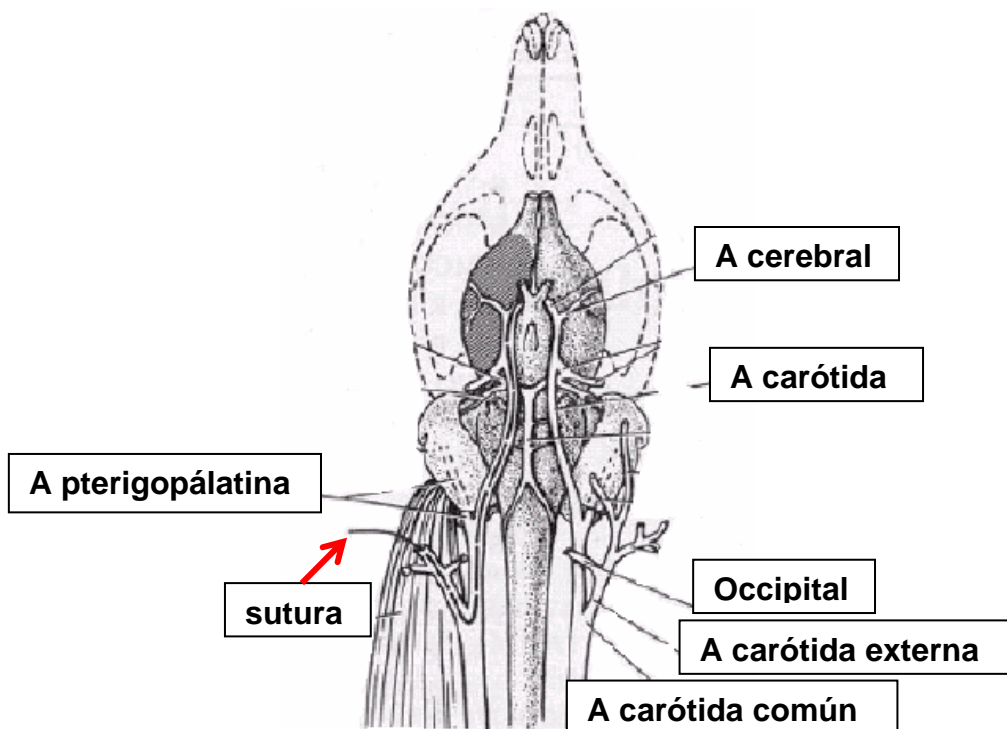


Figura 17. Esquema de la introducción de la sutura para ocluir la Arteria Cerebral Media.

4.2 Área de infarto

Se extrajo el cerebro y se congeló a -70°C durante 5 min. Se cortó en rebanadas de 2 mm, que se incubaron en TTC al 1% (disuelto en amortiguador de fosfatos 100

mM, pH 7.4) a 37°C durante 30 min. Posteriormente, las rebanadas se fijaron con formaldehído al 4% (pH=7.4) en PBS. Cuando la actividad mitocondrial es normal, el TTC se encuentra reducido (área viable: se observa en rojo). Sin embargo, cuando la actividad mitocondrial se encuentra disminuida el TTC se encuentra oxidado (área de infarto: se observa blanca). El área de infarto se determinó con un analizador de imágenes Quantity One de BioRad. Los datos se expresan como porcentaje de área de infarto. El área se midió en las 3 rebanadas frontales que muestran el estriado y la corteza. El porcentaje se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ área de infarto} = \frac{\text{área infartada}}{\text{área total}} \times 100$$

4.3 Inmunodetección de 3-nitrotirosina

Los animales se perfundieron con solución salina/heparina para eliminar la sangre del cerebro. Se obtuvieron cortes coronales de 4 µm de grosor y se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 4.5% en metanol por 1.5 h a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con albúmina al 3% en PBS (agente de bloqueo) en una cámara húmeda por 30 min. Después, se incubaron toda la noche con el anticuerpo anti-nitrotirosina, diluido 1:700 en albúmina 1% en PBS. Las muestras con el anticuerpo primario se lavaron y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo peroxidado anti-IgG de conejo, diluido 1:250 en PBS. Las muestras se lavaron y se incubaron 1 min con DAB-H₂O₂ y se lavaron de inmediato. Finalmente los cortes se tiñeron con hematoxilina para dar contraste a los componentes del tejido y se analizaron por microscopia de luz. El conteo de las células se realizó en 5 campos seleccionados al azar. Las células positivas (café) se determinaron por medio de un analizador de imágenes computarizado KS-300 3.0 (Hallbergmoos, Alemania). Los cortes de cada grupo se incubaron bajo las mismas condiciones para que la inmunotinción fuera comparable. Los datos se expresan como el % de células positivas.

$$\% \text{ células positivas} = \frac{\sum \text{células positivas}}{\sum \text{células totales}} \times 100$$

4.4 Homogenización de los tejidos para la actividad enzimática

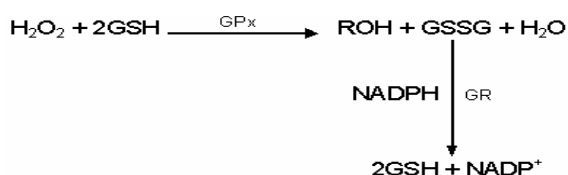
Se extrajo el estriado y la corteza izquierda y se homogenizaron en 550 μL de amortiguador de lisis (TRIS 10 mM (pH 7.9), NaCl 15 mM, Sacarosa 0.25 mM, tritón 0.1% y los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, aprotitina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El homogenado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm. Se separó el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta que se realizó la determinación de la actividad enzimática.

4.5 Actividad de la catalasa (CAT)



Para esta determinación se usó el método de Aebi [34] que mide la desaparición de H_2O_2 a 240 nm. En una celda de cuarzo se colocaron 25 μL del homogenizado y se le adicionaron 725 μL de H_2O_2 7.7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 2 min. De acuerdo a Aebi, se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = (1/t)(2.3 \times \log A_1/A_2)$ donde t = intervalo de tiempo medido, A_1 y A_2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresan como k/mg proteína.

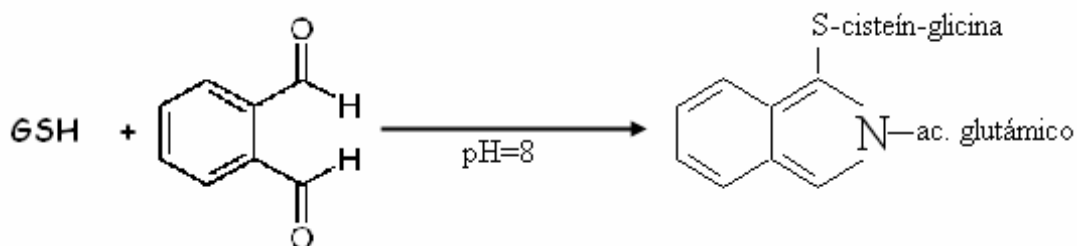
4.6 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)



Se empleó el método de Lawrence y Burk [100], en el cual la GPx cataliza la reducción del H_2O_2 acoplado a la oxidación del GSH a GSSG, el cual a su vez es reducido por la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH. La disminución de la concentración de NADPH se detectó a 340 nm. Se tomaron 100 μL del homogenado y se mezclaron con 800 μL de una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7.0), con la siguiente composición: EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y 1 U de GR/mL. De la misma manera, se preparó un tubo de actividad inespecífica con 100 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH

7.0). Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y su contenido se adicionó a una celda de cuarzo que contenía 100 μL de H_2O_2 7.7 mM e inmediatamente se leyó la absorbancia a 340 nm cada min durante 5 min. Los datos se expresan como U/mg proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NADPH por min.

4.7 Glutión reducido



Se homogenizaron los tejidos en 600 μL de amortiguador de fosfatos con EDTA (pH 8) (FEDTA) y 160 μL de H_3PO_4 25%. Se centrifugaron los homogenados a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se adicionaron 100 μL del homogenado diluido 1:10 a 1800 μL de FEDTA. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de OPA y se incubó cada tubo durante 15 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. El GSH se determinó midiendo la emisión de fluorescencia a 420 nm empleando una longitud de onda de excitación de 350 nm durante 3 min, cada 10 seg. La concentración de GSH se obtuvo interpolando la lectura obtenida en una curva estándar (37.5 ng/mL a 150 ng/mL) [101].

4.8 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. Los datos obtenidos del efecto de la reperusión, de la ventana terapéutica y de la optimización de la ventana terapéutica se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba de Dunette. Los datos obtenidos del efecto del EAE sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT y GPx) y los niveles de GSH se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de Tukey. En ambos casos se empleó el programa Prism 2.01, Graph Pad (San Diego, CA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EFECTO DE LA REPERFUSIÓN

El área de infarto (área blanca) aumentó conforme incrementó el tiempo de reperfusión (Figura 18). Al inicio de la reperfusión no se observó área de infarto neuronal, mientras que 1 h después del inicio de la reperfusión, el daño fue de $11.7 \pm 17.78\%$, a las 2 h el área de infarto fue de $30.69 \pm 7.28\%$, a las 3h aumentó hasta $45.65 \pm 22.09\%$ (Foto no mostrada) y a las 24h fue de $49.22 \pm 8.37\%$.

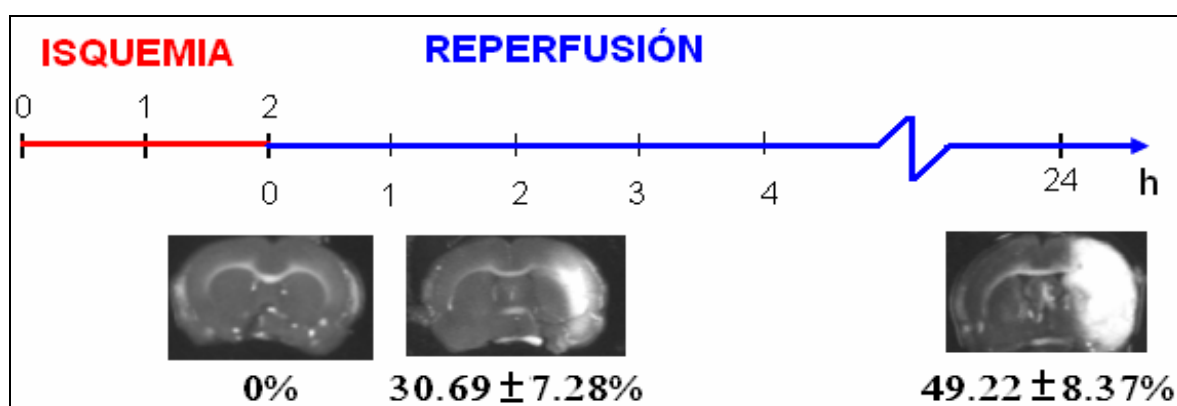


Figura18. Efecto de la reperfusión. Fotografía representativa del área de infarto en los diferentes tiempos de reperfusión evaluados. Los valores se expresan como la media \pm D.E. n=6/grupo.

A partir de las 2 h se observó un incremento significativo en el área de infarto. A las 3 h se observó el máximo daño, que se mantuvo hasta las 24 h (Figura 19).

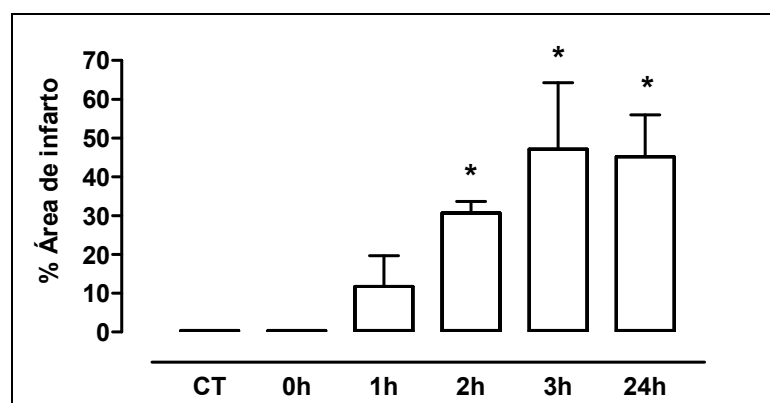


Figura 19. Efecto del tiempo de reperfusión sobre el área de infarto después de 2 h de isquemia. Los valores se expresan como la media \pm D.E. n=6/grupo. *P < 0.01 vs el grupo control.

El estrés oxidativo es un evento importante que participa en la muerte neuronal [10,102]. Nita *et al.* [47] demostraron que el área de infarto aumenta conforme incrementa el tiempo de la reperfusión. Dicho aumento se debe a que en las células, que han sido privadas de nutrientes y O₂ (isquemia), al entrar en contacto con el O₂ (reperfusión), se desata una serie de reacciones que inducen la formación de radicales libres. Los resultados obtenidos muestran que a partir de las 3 h el daño ya no aumenta considerablemente, indicando que a este tiempo el máximo daño se ha alcanzado.

2. TIEMPO ÓPTIMO DE ADMINISTRACIÓN DEL EAE

Se evaluó el efecto de diferentes tiempos de administración del EAE sobre el daño inducido por 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión, debido a que en este tiempo ya se observó un daño significativo.

La figura 20 muestra que solo la administración del EAE al inicio de la reperfusión pudo prevenir el aumento en el área de infarto inducida por 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión.

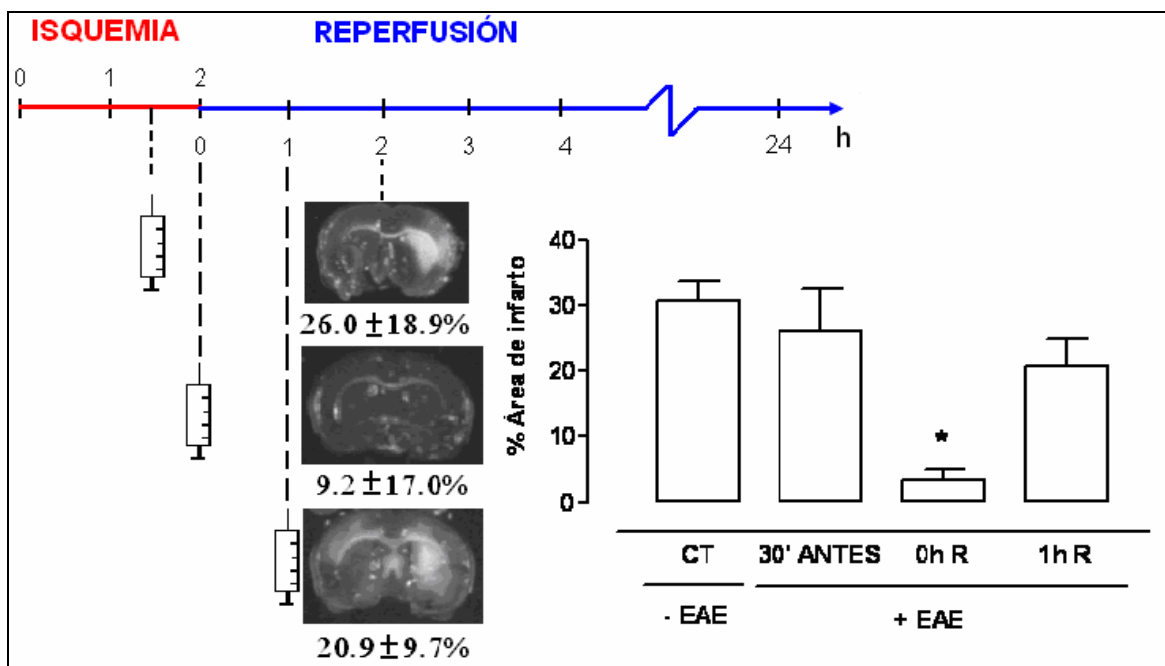


Figura 20. Tiempo óptimo de administración de EAE. Fotografías representativas del área de infarto 2 h después de la reperfusión. La jeringa indica el tiempo de administración. En la gráfica *P<0.01 vs grupo control. Los valores se expresan como la media ± D.E. n=6/grupo.

El cerebro de los animales que recibieron el EAE al inicio de la reperfusión mostró un área de infarto de $9.2 \pm 17\%$, mientras que administrado 30 min antes y 1 h después del inicio de la reperfusión no evitó el daño inducido por la isquemia-reperfusión ($26.0 \pm 18.9\%$ y $20.9 \pm 9.7\%$, respectivamente) (Figura 20).

La administración del EAE 30 min antes del inicio de la reperfusión no mostró ningún tipo de protección. Esto puede deberse a que los compuestos antioxidantes del EAE se consumen con los radicales libres que se generan durante la isquemia, quedando pocas moléculas para reaccionar durante la reperfusión. Dado que se ha demostrado que el pico máximo de producción de radicales libres ocurre 20 min después del inicio de la reperfusión [103], es posible que las pocas moléculas antioxidantes que quedaron para reaccionar con los radicales libres generados en este periodo hayan sido insuficientes.

Por otro lado, cuando el EAE se administró 1 h después del inicio de la reperfusión, se observó una ligera disminución en el daño que no es estadísticamente significativo. Como se mencionó, la producción máxima de radicales libres ocurre 20 min después del inicio de la reperfusión, lo que sugiere que la llegada de los componentes antioxidantes del EAE al tejido podría estar ocurriendo cuando el daño oxidativo ya ha ocurrido. Además, el EAE podría no ofrecer una protección significativa, dada la farmacocinética que se conoce del principal componente del EAE (ver mas adelante).

Finalmente, la administración del EAE al inicio de la reperfusión muestra una clara protección, lo que sugiere que los momentos iniciales de la reperfusión son críticos en el daño que sufrirá la célula por estrés oxidativo. Nita et al [48] demostraron que este evento se presenta sólo cuando se trata de isquemia transitoria y que el daño se enfoca en los primeros 20 min de reperfusión. El incremento súbito en la concentración de O_2 es lo que desata las reacciones en cadena que llevan a la producción masiva de radicales libres [48].

Por otro lado, el pico de producción de radicales libres durante la reperfusión (20 min), coincide con el tiempo en el que se encuentra la mayor concentración del principal componente (la S-alilcisteína, SAC) del EAE después de su administración

oral [104]. Se ha demostrado que la SAC tiene propiedades antioxidantes [88,102] y tarda aproximadamente 30 min en alcanzar su concentración máxima en el cerebro [104]. Lo anterior sugiere que el efecto protector del EAE administrado al inicio de la reperfusión, se debe a que los compuestos antioxidantes del extracto EAE atrapan los radicales libres que se generan durante la reperfusión, previniendo de esta forma el daño oxidativo.

Finalmente, un punto importante que se debe resaltar es la variabilidad que existe entre los individuos, la cual indica que reaccionan de manera diferente al tratamiento, es decir, algunos individuos reaccionan favorablemente, pero hay otros en los que el tratamiento no es eficaz para reducir lo niveles de oxidación y la muerte neuronal.

3. VENTANA TERAPÉUTICA

Como la administración del EAE al inicio de la reperfusión previene la aparición del área de infarto, se determinó cuanto tiempo se mantiene esta protección.

Se observó que 2 h después del inicio de la reperfusión el daño celular disminuye considerablemente ($3.4 \pm 4.6\%$), pero 3 y 4 h después ya se observó un aumento considerable en el daño ($30.2 \pm 5.2\%$ y $25.5 \pm 3.5\%$ respectivamente) que es similar al del grupo sin EAE. Esto indica que la administración del EAE (1.2 mg/mL) sólo protege del daño celular 2 h posteriores al inicio de la reperfusión (Figura 21).

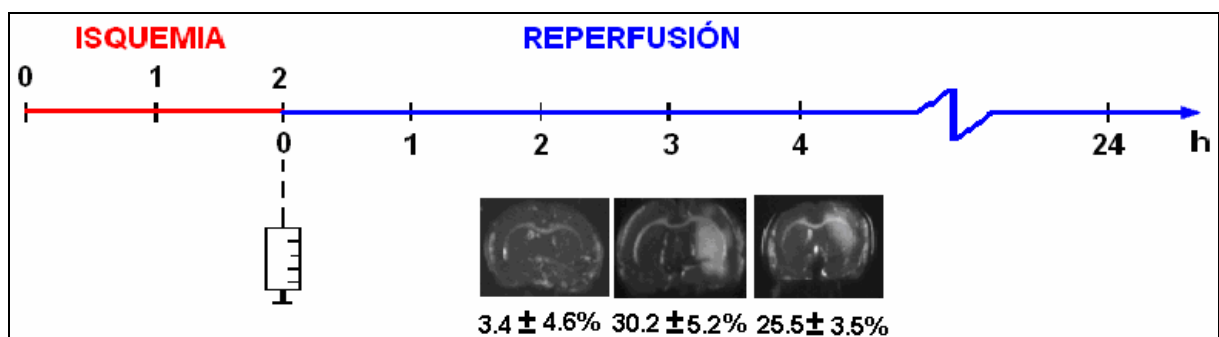


Figura 21. Ventana terapéutica de la administración del EAE al inicio de la reperfusión. Fotografías representativas del área de infarto a diferentes tiempos de reperfusión. La jeringa indica el tiempo de la administración del EAE. Los valores se expresan como la media \pm D.E. En todos los grupos se eliminó un dato muy disperso. n=6/grupo.

Como se mencionó antes, debe considerarse la variabilidad de cada individuo ya que no todos responden de la misma manera. En el grupo que se sacrificó a las 2 h de la reperfusión se obtuvo un promedio de $9.23 \pm 17\%$ de área de infarto. La desviación tan grande se debe a un individuo que mostró un área de infarto del 50%, ya que 3 individuos mostraron un área aproximadamente del 10% y 4 no mostraron área de infarto. Excluyendo el punto de 50% el promedio es 3.4%, encontrándose una diferencia significativa contra el grupo sin EAE. Resultados similares se observan 3 y 4 h después del inicio de la reperfusión ya que un individuo en cada tiempo muestra un daño excesivo (53 y 66% respectivamente) (Figura 22).

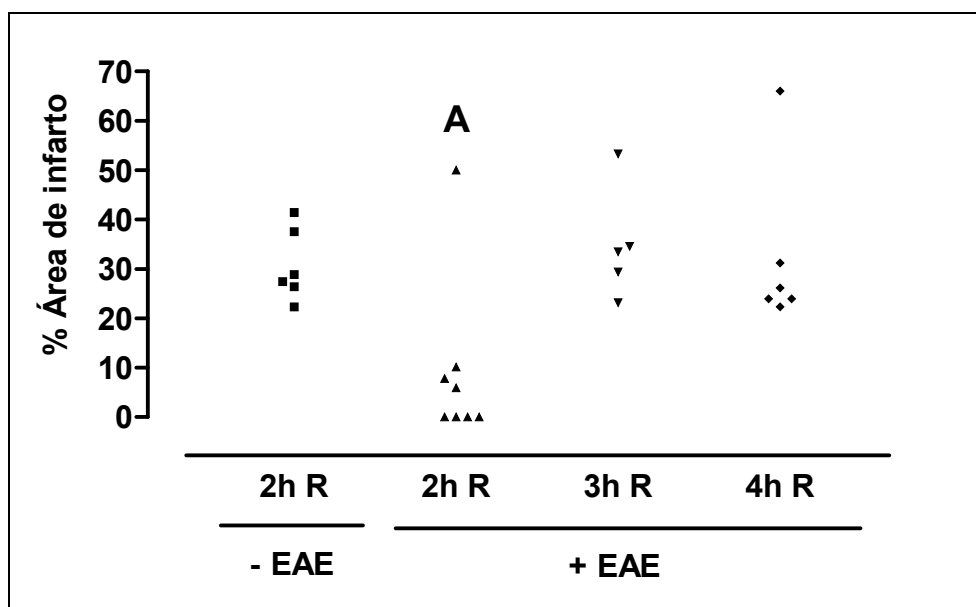


Figura 22. Respuesta individual en animales que recibieron el EAE al inicio de la reperfusión y sacrificados a diferentes tiempos. n=7-8. ^AP < 0.01 vs el grupo sin EAE, eliminando el punto de 50%.

El incremento en el área de infarto que se observó 3 h después del inicio de la reperfusión es grande y rápido ya que en 1 h aumenta de 3.4 (si quitamos el punto de 50% de daño) a 25%. Este aumento podría deberse a que los antioxidantes del EAE y los sistemas antioxidantes de las células se ven sobrepasados por los radicales libres que se continúan formando y acumulando dentro de la célula durante la reperfusión, lo que lleva finalmente al daño celular.

Finalmente, los resultados obtenidos de la ventana terapéutica claramente muestran que la administración del EAE al inicio de la reperfusión protege en la

mayoría de los casos, sugiriendo que el tratamiento de EAE retrasa y/o disminuye las señales de muerte neuronal (apoptosis o necrosis). Se ha propuesto que las células del área de infarto mueren por necrosis, debido a la gran cantidad de eventos que acontecen en la célula en un tiempo muy corto [105]. Sin embargo, también se sabe que una cantidad considerable de células mueren por apoptosis, sobretodo las que se encuentran en el área de penumbra y esto depende de la intensidad del estímulo en los receptores de NMDA [105]. En este contexto, se ha reportado el efecto anti-apoptótico de la SAC (el principal componente del EAE) [105], lo que sugiere que el EAE podría prevenir o bloquear las señales que inducen la muerte por apoptosis, reflejándose esto en la disminución del área de infarto.

4. OPTIMIZACIÓN DE LA VENTANA TERPÉUTICA

Con el objetivo de prolongar el tiempo de protección que induce el EAE al inicio de la reperfusion, se probaron diferentes esquemas de administración del EAE y los animales se sacrificaron a diferentes tiempos de reperfusion (Figura 23).

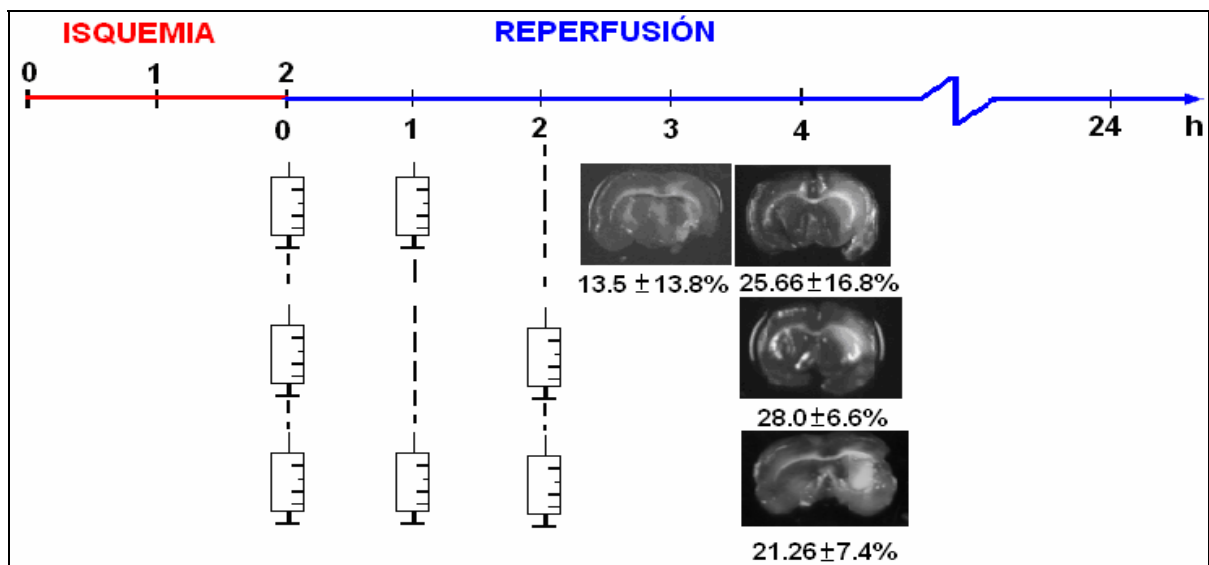


Figura 23. Optimización de ventana terapéutica. Fotografías representativas del área de infarto a los diferentes tiempos de administración de EAE y de sacrificio. La jeringa indica el tiempo de administración del EAE. Los valores están expresados como la media ± D.E. n=6/grupo.

Cuando el EAE se administra al inicio y 1 h después del inicio de la reperfusion, se observó que los animales sacrificados a las 3 h mostraron un área de infarto

menor (13.5%) que los tratados sólo con una dosis al inicio de EAE (25%). Sin embargo, 4 h después del inicio de la reperfusión, el área de infarto aumentó nuevamente a 25% (Figura 23), lo que confirma que el efecto protector del EAE es transitorio, y máximo alrededor de 2 h.

Cuando se administró el EAE al inicio y 2 h después del inicio de la reperfusión no se observó un efecto protector a las 4 h (28%). Estos resultados sugieren que 2 h después del inicio de la reperfusión (cuando aún no se observa área de infarto) los sistemas antioxidantes de la célula y los componentes antioxidantes del EAE se ven sobrepasados por los radicales libres que se están generando, lo que podría estar llevando a la muerte celular.

Finalmente, cuando el EAE se administra cada hora, no se observó un efecto protector a las 4 h de reperfusión. Estos resultados, indican que a pesar de que se administre una dosis mayor de EAE, el daño solo se retrasa pero no se bloquea totalmente. Esto sugiere que durante la isquemia/reperfusión, además del estrés oxidativo se están activando otros mecanismos de daño que pueden ser independientes del estrés oxidativo.

5. MECANISMO DE PROTECCIÓN DEL EAE

5.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se hizo evidente por la detección de la 3-nitrotirosina (3-NT). La administración del EAE evitó parcialmente el incremento en el nivel de 3-NT inducido por la isquemia/reperfusión (I/R: $31.5 \pm 6.69\%$ y I/R+EAE: $7.5 \pm 4.25\%$). El EAE solo no tuvo efecto (Figura 24).

Los resultados obtenidos sugieren que la disminución del área de infarto en los animales que recibieron el EAE podría deberse, al menos parcialmente, a las propiedades antioxidantes del extracto ya que los niveles de 3-NT disminuyeron considerablemente.

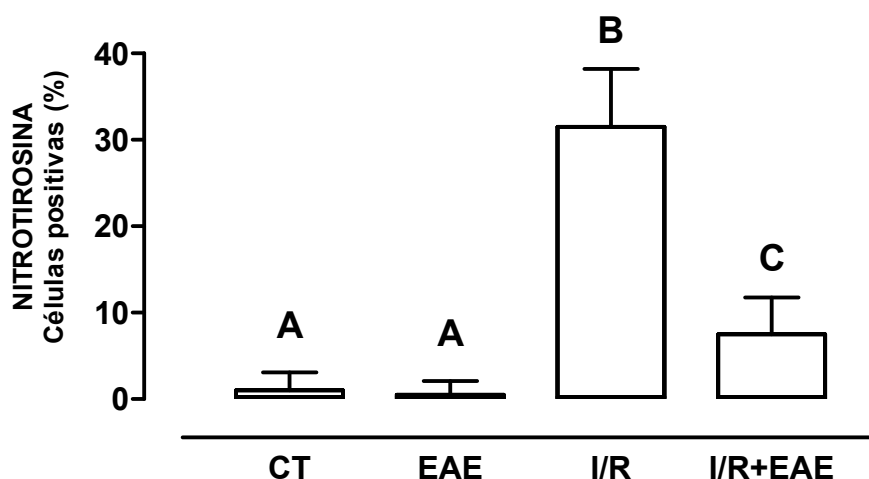
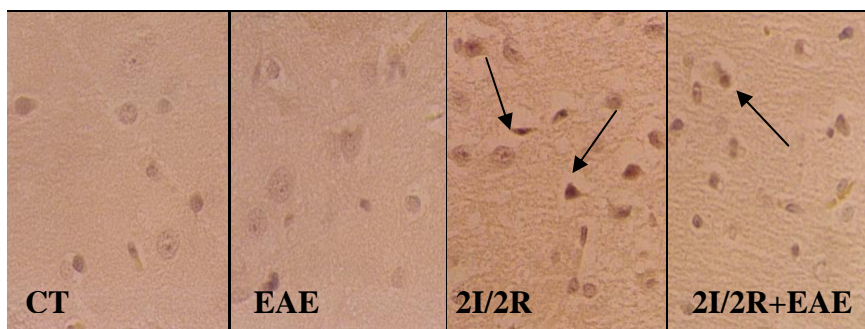


Figura 24. Efecto del EAE sobre el nivel de 3-nitrotirosina (3-NT) en animales sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperusión. Panel superior: fotografía representativa de cada grupo con algunas células positivas para la 3-NT (flecha). Gráfica: los valores se presentan como la media \pm D.E. n=6/grupo. Letras diferentes indican que son significativamente diferentes.

Se ha reportado que el principal componente del EAE, la SAC, atrapa $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2 y $ONOO^-$ entre otros radicales libres [106]. El $ONOO^-$ y el $\bullet OH$ son los radicales más reactivos [107], ya que reaccionan con las moléculas biológicas (proteínas, ADN, lípidos y en menor grado con los carbohidratos) lo que lleva a la muerte celular. Esto sugiere que el EAE podría tener una doble función: prevenir la formación del $ONOO^-$ y del $\bullet OH$, así como atrapar al $ONOO^-$ y al $\bullet OH$ ya formado.

Por otro lado, otro marcador de daño oxidativo que se ha empleado en el modelo de isquemia cerebral es la lipoperoxidación. Ésta puede determinarse midiendo la cantidad de malondialdehído (uno de los productos finales de la lipoperoxidación) [107] o la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico [10,102]. En este contexto, se sabe que el EAE inhibe la fase de propagación de la lipoperoxidación [10,102], lo que es importante ya que podría estar retrasando las señales de muerte celular y por esto el área de infarto disminuye.

5.2 Antioxidantes enzimáticos

A. Catalasa (CAT). La isquemia/reperfusión incrementó la actividad de CAT en la corteza (0.0062 ± 0.000485 k/mg proteína) con respecto al control (0.0041 ± 0.0007 k/mg proteína). El EAE previno este incremento (0.0051 ± 0.00042 k/mg proteína), aunque sigue siendo significativamente mayor que la del control (Figura 25).

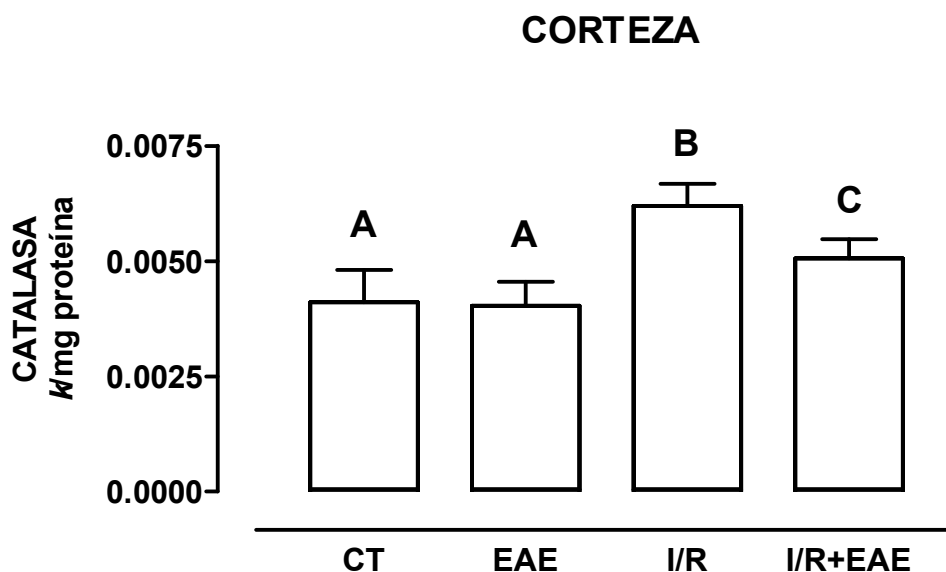


Figura 25. Efecto del EAE sobre la actividad de la catalasa en la corteza de animales sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión. Los valores se representan como la media \pm D.E. n=6/grupo. Letras diferentes indican que son significativamente diferentes.

El aumento en la actividad de la CAT durante la isquemia/reperfusión, contrasta con lo reportado por otros grupos [47] y en otros modelos [84], donde se ha observado que la actividad disminuye. Por otro lado, se ha reportado que bajo ciertas condiciones, el estrés oxidativo promueve la síntesis del ARN_m de la catalasa [108]. Además, cuando las células han sido expuestas a condiciones de estrés, se observa un incremento en la actividad y en la expresión de las enzimas antioxidantes, lo cual podría explicar el aumento en la actividad de la CAT en el grupo sometido a isquemia/reperfusión. Se sabe que la oclusión de la arteria cerebral media provoca daños primero en el estriado y después en la corteza. Por ello, es probable que el estrés oxidativo en la corteza sea menor que en el estriado, lo que permitiría la transcripción del gen de la CAT. Sin embargo, es necesario cuantificar la proteína y el ARN_m de la CAT.

En el estriado se observó que la actividad de la CAT disminuyó en los grupos IR (0.00319 ± 0.000566 k/mg proteína) y EAE (0.00226 ± 0.00059 k/mg proteína) con respecto al control (Figura 26).

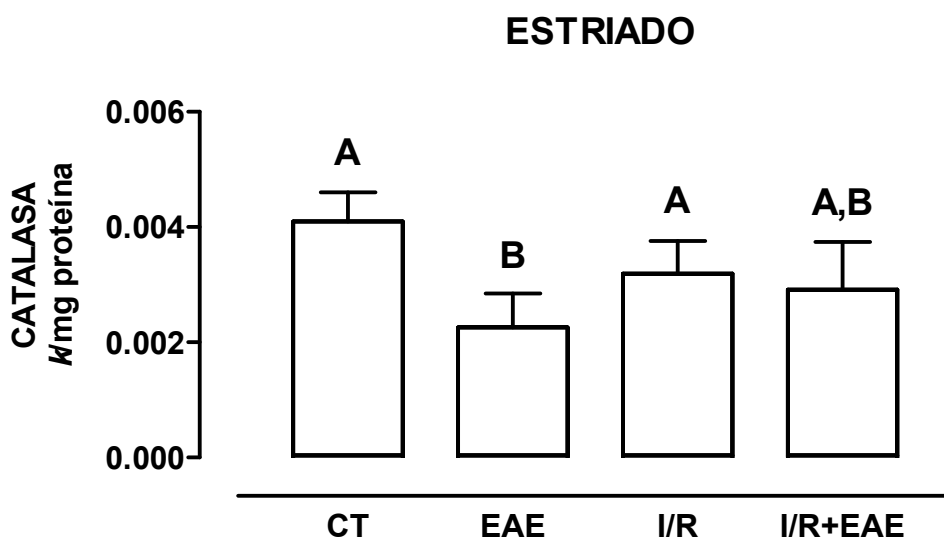


Figura 26. Efecto del EAE sobre la actividad de la catalasa en el estriado de animales sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión. Los valores se representan como la media \pm D.E. $n=6$ /grupo. Letras diferentes indican que son significativamente diferentes.

La disminución en la actividad de la CAT, concuerda con lo reportado por otros grupos [109], donde se ha reportado la disminución de la actividad de esta enzima durante la isquemia/reperfusión. Por otro lado, es posible que los radicales libres que se generan durante la reperfusión puedan oxidar a la CAT provocando su inactivación.

Por otro lado, la disminución que se observó en el grupo que solo recibió EAE concuerda con lo reportado por Pedraza *et al.* [109], quienes reportaron que la alimentación con polvo de ajo disminuye la actividad de la CAT en el hígado y en el riñón. En este trabajo se encontró que el nivel de ARN_m permanece constante, mientras que la actividad y la cantidad de la CAT disminuye. Además, la disminución en la cantidad de la CAT se asoció con una reducción en la síntesis de la enzima, ya que la degradación se mantuvo constante. Finalmente, la disminución en la actividad de la CAT también podría deberse a las propiedades antioxidantes del EAE, ya que tiene la capacidad de atrapar H₂O₂.

B. Glutación peroxidasa (GPx). La GPx es otra enzima que metaboliza al H_2O_2 cuando se encuentra en exceso. En la mayoría de los órganos, la CAT es la primera línea de defensa para combatir al H_2O_2 y cuando esta se ve sobrepasada, la GPx le ayuda [37]. Sin embargo, en el cerebro hay una mayor cantidad de GPx que de CAT.

En el estriado la actividad de la GPx no mostró cambios en ninguno de los grupos de estudio (Datos no mostrados).

En la corteza se observó una disminución en la actividad de la GPx en los animales sometidos a isquemia/reperfusión (4.145 ± 0.5887 mU/mg proteína), comparado con el grupo control (6.41 ± 0.8234 mU/mg proteína). El tratamiento con EAE impidió la disminución en la actividad de la GPx (6.235 ± 1.198 mU/mg proteína). El EAE no tuvo efecto sobre la actividad de esta enzima (Figura 27).

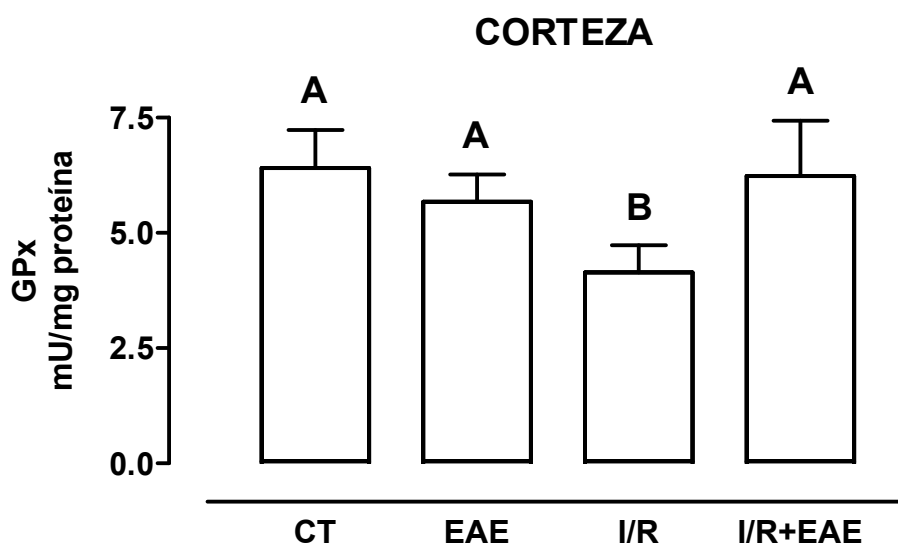


Figura 27. Efecto del EAE sobre la actividad de la glutación peroxidasa (GPx) en la corteza de animales sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión. Los valores se representan como la media \pm D.E. $n=6$ /grupo. Letras diferentes indican que son significativamente diferentes.

La disminución en la actividad de la GPx en los animales sometidos a isquemia/reperfusión podría deberse a la oxidación de esta enzima. La GPx es particularmente susceptible a la oxidación por el $ONOO^-$ y el anión O_2^- [110,111] y en este protocolo el aumento en los niveles de $ONOO^-$ fue evidente por el aumento en los niveles de 3-nitrotirosina. El $ONOO^-$ puede reaccionar con el residuo de selenocisteína que se encuentra en el sitio activo de la GPx disminuyendo así la actividad enzimática [110]. Además, la disminución en la actividad de la GPx podría

estar asociada con la disminución en el contenido de GSH, el cual es utilizado por la GPx como donador de protones para reducir al H₂O₂ como ya se ha reportado [112].

El efecto protector del EAE podría estar relacionado con sus propiedades antioxidantes como se ha asociado en otros modelos [59,87]. El EAE tiene la capacidad de inhibir la SON y atrapar O₂^{•-} y ONOO⁻ [54,106], lo que podría impedir la oxidación de la GPx.

5.3 Glutación

Se determinó el nivel de GSH, el antioxidante no enzimático más importante de la célula [15].

En el estriado no se observaron cambios estadísticamente significativos en el nivel de GSH en ninguno de los grupos estudiados, a pesar de que se observó una tendencia a disminuir en el grupo I/R (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de GSH en los diferentes tejidos y con los diferentes tratamientos.

		GSH (µg/mg proteína)			
Grupo	Tejido	CT	EAE	I/R	I/R +EAE
	Corteza	4.7 ± 2.6 ^A	7.9 ± 1.2 ^B	3.6 ± 0.4 ^A	8.6 ± 1.9 ^B
	Estriado	4.7 ± 2.5 ^A	4.9 ± 2.3 ^A	2.6 ± 1.2 ^A	3.7 ± 1.5 ^A

Los valores se representan como la media ± D.E. n= 6/grupo.
Letras diferentes indican que son significativamente diferentes.

En la corteza de los animales sometidos a isquemia/reperfusión se observó una ligera disminución en la cantidad de GSH, la cual no es significativamente diferente con respecto al control. Se ha reportado que el nivel de GSH disminuye 22 h después del inicio de la reperfusión [112], debida al estrés oxidativo que se induce durante la isquemia/reperfusión. Además, se ha reportado que la actividad de una de las enzimas que reciclan el GSH, la glutatión reductasa, se encuentra disminuida en el modelo de isquemia cerebral [112]

Por otro lado, los grupos que recibieron EAE (EAE e IR+EAE) muestran un incremento en los niveles de GSH en la corteza (Tabla 5). Esto podría deberse a la técnica que se empleo para cuantificar los niveles de GSH, ya que ésta se basa en la medición de la intensidad de la fluorescencia que se produce de la reacción de

derivatización entre los grupos sulfhidrilo (SH) libres de la muestra con el o-ftaldialdehído. El EAE es una presentación del ajo rica en compuestos azufrados (SH), lo que podría explicar el incremento en la señal de fluorescencia. Otra explicación podría ser un aumento en la síntesis de GSH; sin embargo, no se sabe si el EAE induce la expresión del ARN_m de la glutatión sintetasa. Por otro lado, la transcripción de la enzima limitante en la síntesis del GSH, la γ -glutamylcisteína ligasa, es regulada por el factor de transcripción NF-kB [113] y se sabe que este factor se activa durante la isquemia cerebral [114], mostrando un efecto protector cuando el estímulo no es muy intenso (como podría ocurrir en presencia del EAE).

Finalmente, un dato curioso es el hecho de que a diferencia de la corteza, en el estriado no aumenta la concentración aparente de GSH en los grupos que recibieron EAE. Esto sugiere que la distribución de los compuestos sulfurados presentes en el EAE, no es igual en todas las regiones del cerebro.

En resumen, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que el efecto protector que ejerce el EAE sobre el daño neuronal inducido por la isquemia y la reperfusión, podría estar asociado principalmente con sus propiedades antioxidantes. Debido a que previene parcialmente el incremento en los niveles de 3-nitrotirosina (marcador de daño oxidativo a proteínas) y evita que disminuya la actividad de la GPx. En este contexto, se ha reportado que el componente mayoritario del EAE, la S-alilcisteína, ejerce un efecto protector en un modelo transitorio de isquemia global, actuando como un atrapador de radicales libres ya que inhibe la lipoperoxidación [10,102]. Esto sugiere que los compuestos antioxidantes del EAE podrían estar secuestrando los radicales libres que se forman durante la reperfusión, evitando por un lado la oxidación de los sistemas antioxidantes celulares y por otro bloqueando la activación vías que responden al estado redox de la célula, como la apoptosis. Sin embargo, esto aún debe estudiarse. Por último, es posible que el EAE regule la expresión de genes que respondan al estrés oxidativo (defensas antioxidantes). En un modelo de insuficiencia renal asociado con estrés oxidativo, se ha encontrado que el EAE no afecta la expresión del ARNm o de la proteína de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx [109], sugiriendo una baja probabilidad para que esto suceda el modelo de isquemia cerebral empleado.

V. CONCLUSIONES

1. El EAE protege contra el daño ocasionado por 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión.
2. El EAE muestra una ventana temporal terapéutica de 2 h aproximadamente, solo si se administra al inicio de la reperfusión.
3. El efecto protector del EAE puede ampliarse con dosis repetidas.
4. El efecto protector del EAE podría estar asociado con su propiedad antioxidante y con la preservación de la actividad de la GPx.

VI. REFERENCIAS

- [1]. Ruiz-Sandoval JL, González-García CK, García Navarro V, Gutiérrez-Manjarrez FA, González-Cornejo S. 2003. Enfermedad vascular cerebral isquémica en dos hospitales mexicanos. *Rev Mex Neuroci* **4**:319-323
- [2]. Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social. Cuaderno No.16 INEGI 2000.
- [3]. Román-Campos G. 1997. Epidemiología y factores de riesgo de la enfermedad vascular cerebral. En: Enfermedad Vascular Cerebral. Barinagarrementería-Aldatz F, Cantú C. (Eds), Mc-Graw-Hill Interamericana. México:71-79
- [4]. Pulsinelli W. 1992. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet* **339**:533-536
- [5]. Diez-Tejedor E, Alonso de Lecinana M, Carceller F, Frank A, Roda JM. 1996. Physiopathology of cerebral ischemia: ischemia-reperfusion injury. *Rev Clin Esp Suppl***3**:14-19
- [6]. Margail I, Plotkine M, Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* **39**:429-443
- [7]. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. 1978. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* **9**:445-447
- [8]. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**:391-397
- [9]. Borek C. 2001. Antioxidants health effects of aged garlic extract. *J Nutr* **131**:1010S-1015S
- [10]. Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* **29**:135-143
- [11]. American Heart Association. Heart and stroke statistical. Supplement. American Heart Association: USA, 2000.
- [12]. Massieu L. 1999. Muerte por isquemia y anoxia. In: Enfermedades neurodegenerativas mecanismos moleculares. Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R (Eds). Fondo de cultura económica. México D.F:64-92
- [13]. Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Maldonado PD. 2007. Recent advances in the use of antioxidant treatments in cerebral ischemia. In: New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective. Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME (eds). Research Signpost. Kerala, India:61-74
- [14]. Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**:139-162

- [15]. Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* Vol XXVI:19-54
- [16]. Lledias F, Hansberg W. 2000. Catalase modification as a marker for a singlet oxygen. *Methods enzymol* **319**:110-119
- [17]. Augusto O, Bonini M, Amanso AM, Linares E, Santos C, De Menezes S. 2002. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in byology. *Free Radic Biol Med* **32**:841-859
- [18]. Nordberg J, Arner E. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**:1287-1312
- [19]. Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* **200**:248-254
- [20]. Meier B, Scherk C, Schmidt M, Parak F. 1998. pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* **331**:403-407
- [21]. Oury TD, Crapo JD, Valnickova Z, Enghild JJ. 1996. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimmers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* **317**:51-57
- [22]. Sandstróm J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 1994. 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* **269**:19163-19166
- [23]. Sun E, Xu H, Liu Q, Zhou J, Zuo P, Wang J. 1995. The mechanisms for the effect selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res* **48**:231-238
- [24]. Ho SE, Ide N, Lau BH. 2001. S-allylcysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* **8**:39-46
- [25]. Mac Millan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**:1613-1622
- [26]. Stralin P, Marklund SL. 1994. Effects of oxidative stress on expression on extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem J* **298**:347-352
- [27]. [Battistoni A](#), [Folcarelli S](#), [Cervoni L](#), [Polizio F](#), [Desideri A](#), [Giartosio A](#), [Rotilio G](#). 1998. Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase, pH-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *E. coli*. *J Biol Chem* **273**:5655-5661
- [28]. Leah RB, Casareno DW, Gitlin JD. 1998. The cooper chaperone CCS directly interacts with cooper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**:23625-23628

- [29]. Stroppolo ME, Sette M, O'Neill P, Polizio F, Cambria MT. 1998. Cu, Zn superoxide dismutase from *Photobacterium leignathi* is an efficient enzyme. *Biochemistry* **37**:12287-12292
- [30]. Buschfort C, Müller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J. 1997. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res* **57**:651-658
- [31]. Aebi HE. 1980. Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. In: Methods of enzymatic analysis vol. III Bergmeyer H (Ed). Verlag Chemie. Deerfield Beach, FL: 273-282
- [32]. Price VE, Sterling WR, Tarantola VA, Hartley RW, Rechcigl M. 1962. The kinetics of cabalase síntesis and destruction *in vivo*. *J Biol Chem* **237**:3468-3475
- [33]. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. 1989. Isolation and characterization of the rat catalasa-encoding gene. *Gene* **79**:279-288
- [34]. Aebi H. Catalase *in vitro*. 1984. *Methods Enzymol* **105**:121-126
- [35]. Tappel AL. 1978. Glutathione peroxidasa and hydrperoxides. *Methods Enzymol* **52**:506-513
- [36]. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jügens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* **13**:341-390
- [37]. Rikans LE, Hornbrook KR. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* **1362**:116-127
- [38]. [Grazioli V](#), [Schiavo R](#), [Casari E](#), [Marzatico F](#), [Rodriguez y Baena R](#), [Gaetani P](#). 1998. Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. *FEBS Lett* **431**:149-153
- [39]. Sigalov AB, Stern LJ. 1998. Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* **433**:196-200
- [40]. Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. 1998. Supression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidasa. *J Biol Chem* **273**:1990-1997
- [41]. [De Haan JB](#), [Bladier C](#), [Griffiths P](#), [Kelner M](#), [O'Shea RD](#), [Cheung NS](#), [Bronson RT](#), [Silvestro MJ](#), [Wild S](#), [Zheng SS](#), [Beart PM](#), [Hertzog PJ](#), [Kola I](#). 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx 1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **273**:22528-22536

- [42]. www.oxfordbiomed.com/glu19fr.html
- [43]. Mullineaux PM, Creissen GP. 1997. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants. Scandalios JG (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA:667-713
- [44]. Neal GE, Moss EJ, Manson MM. 1988. Glutathione conjugation in oncogenesis. In: Glutathione Conjugation. Sies H, Ketterer B (eds.). Academic Press, New York:281–314
- [45]. Toledo I, Noronha-Dutra AA, Hansberg W. 1991. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **173**:3243-3249
- [46]. Brigelius-Flohé R, Traber MG. 1999. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J* **13**:1145-1155
- [47]. Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Magrean AM, Magrean L. 2001. Oxidative damage following ischemia depends on reperfusion- a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med* **5**:163-170
- [48]. Sato T, Miyata G. 2000. The nutraceutical benefit, part IV: garlic. *Nutrition* **16**:787-788
- [49]. Lawson LD. 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity. ACS Symposium Series 691. Lawson LD, Bauer R, (eds). American Chemical Society. Washington, DC, USA:176-209
- [50]. Block E, Cai XJ, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ. 1996. Allium chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem* **68**:937-944
- [51]. Amagase H, Petesch BL, Matsura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* **131**:955S-962S
- [52]. Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, Billington D Rahman K. 2003. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sci* **72**:1583-1594
- [53]. Ide N, Lau BH. 1999. Aged garlic extracts attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine* **6**:125-131
- [54]. Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Biliar TR, Kim YM. 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allylcysteine. *Free Radic Biol Med* **30**:747-756

- [55]. Kojima R, Toyama Y, Ohnishi ST. 1994. Protective effects of aged garlic extracts on dextrorubicin-induced cardiotoxicity in the Mouse. *Nutr Cancer* **22**:163-173
- [56]. Yamasaki T, Li L, Lau BH. 1994. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* **8**:408-412
- [57]. Lewin G, Popov I. 1994. Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: inhibition of the Cu²⁺-initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneimittelforschung*. **44**: 604-607
- [58]. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* **29**:602-611
- [59]. Iqbal M, Athar M. 1998. Attenuation of iron-nitilotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem Toxicol* **36**:485-495
- [60]. Nakagawa S, Masamoto K, Sumiyoshi H, Harada H. 1984. Acute toxicity of garlic extract. *J Toxicol Sci* **9**:57-60
- [61]. Yoshida S, Hirao Y, Nakagawa S. 1984. Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic. *J Toxicol Sci* **9**:77-86
- [62]. Lawson LD. 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Garlic. The science and therapeutic application of *Allium sativum* and related species. Koch HP, Lawson LD (eds). Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA:37-107
- [63]. Munday JS, James KA, Fray LM, Kirkwood SW, Thompson KG. 1999. Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis* **143**:399-404
- [64]. Takasu J, Uykimpang R, Sunga MA, Amagase H, Niihara Y. 2002. Aged garlic extract therapy for sickle cell anemia patients. *BMC Blood Disord* **2**:1-4
- [65]. Dillon SA, Lowe GM, Billington D, Rahman K. 2002. Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *J Nutr* **132**:168-171
- [66]. Budoff MJ, Takasu J, Flores FR, Niihara Y, Lu B, Lau BH, Rosen RT, Amagase H. 2004. Inhibiting progression of coronary calcification using aged garlic extract in patients receiving statin therapy: a preliminar study. *Prev Med* **39**:985-991
- [67]. Durak I, Aytac B, Atmaca Y, Devrim E, Avci A, Erol C, Oral D. 2004. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life Sci* **75**:1959-1966

- [68]. Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. 2001. Pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J Nutr* **131**:1080S-1084S
- [69]. Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD, Haibach FG. 1993. Identification and quantification of organosulfur compliance markers in garlic extract. *J Agric Food Chem* **41**:37-41
- [70]. Gillian L. Allison, Gordon M. Lowe and Khalid Rahman. 2006. Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. *J Nutr* **136**:782S-788S
- [71]. Singh DK, Porter TD. 2006. Inhibition of sterol 4 α -methyl oxidase is the principle mechanism by which garlic decreases cholesterol synthesis. *J Nutr* **136**:S759-S764
- [72]. Amagase H, Moriguchi T, Kasuga S. 2000. Comparison of oxidative damage of garlic preparations including enteric-coated garlic powder preparation and allicin-derived compounds on erythrocyte duodenum. *Phytomedicine* **7**:118
- [73]. Yeh YY, Yeh SM. 2006. Homocysteine-lowering action potential cardiovascular protective factor of aged garlic extract. *J Nutr* **136**:S745-S749
- [74]. Efendy JL, Simmons DL, Campbell GR, Campbell JH. 1997. The effect of the aged garlic extract, Kyolic, on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* **132**:37-42
- [75]. Sumioka I, Matsuura T, Yamada K. 2001. Therapeutic effect of S-allylmercaptocysteine on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Eur J Pharmacol* **433**:177-185
- [76]. Lau BH, Tadi PP, Tosk JM. 1990. *Allium sativum* (garlic) and cancer prevention. *Nutr Res* **10**:937-948
- [77]. Wang B, Billington D, Zuzel KA, Rahman K. 1999. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* **132**:215-225
- [78]. Cha CW. 1987. A study on the effect of garlic to the heavy metal poisoning in rat. *J Kor Med Sci* **2**:213-224
- [79]. Kandil O, Abdullab R, Tabuni AM, Elkadi A. 1988 Potential role of *Allium sativum* in natural cytotoxicity. *Arch AIDS Res* **1**:230-231
- [80]. Kyo E, Uda N, Kasuga S, Sumioka I. 1999. Garlic as an immunostimulant. In: Immunomodulatory agents from plants. Wagner H. (ed). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland:273-288

- [81]. Reeve VE, Bosnic M, Rozinova E, Bohem-Wilcox CA. 1997. Dietary aged garlic extract inhibits suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet B (uv B280-320 nm) radiation or cis urocanic acid. In: *Nutraceuticals-Designer Foods III garlic, soy and licorice*. Lanchance PP, Paul P. (eds). Food & Nutrition press. Trumbell, CT, USA:163-175
- [82]. Nagai K, Yamawaki M. 1974 Yakuri to chiryo. *Jpn J Pharmacol Ther* **2**:1622-1635
- [83]. Horie T, Awazu S, Itakura Y, Fuwa T. 1992. Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med* **58**:468-469
- [84]. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2003. Antioxidant S-allyl cysteine prevents gentamicine-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* **35**:317-324
- [85]. Griffin B, Selassie M, Ephiraim T. GWEBU ET. 2000. Aged garlic extract suppresses lipid peroxidation induced by β -amyloid in PC12 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**:279-280
- [86]. Wei Z, Lau BH. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* **18**:61-70
- [87]. Ide N, Matura H, Itakura Y. 1997 Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* **63**:263-264
- [88]. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* **60**:417-420
- [89]. Lau BH, Woolley JL, Marsh CL, Barker GR, Koobs DH, Torrey RR. 1986. Superiority of intralesional immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and *Allium sativum* in control of murine transitional cell carcinoma. *J Urol* **136**:701-705
- [90]. Dimitrov N, Bennink M. 1997. Modulation of arachidonic acid metabolism by garlic extract In: *Nutraceuticals-Designer Foods III garlic, soy and licorice*. Lanchance PP, Paul P. (eds). Food & Nutrition press. Trumbell, CT, USA:199-202
- [91]. [Balasenthil S](#), [Arivazhagan S](#), [Nagini S](#). 2000. Garlic enhances circulatory antioxidants during 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J Ethnopharmacol* **72**:429-433
- [92]. [Uda N](#), [Kashimoto N](#), [Sumioka I](#), [Kyo E](#), [Sumi S](#), [Fukushima S](#). 2006. Aged garlic extract inhibits development of putative preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *J Nutr* **136(3 Suppl)**:855S-860S

- [93]. Ushijima M, Sumioka I, Kakimoto M, Yokoyama K, Uda N, Matsuura H, Kyo E, Suzuki A, Kasug S, Itajura Y, Petsch BL, Amagase H. 1997. Effect of garlic and garlic preparations on physiological and psychological stress in mice. *Phytother Res* **22**:226-230
- [94]. Perez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, Cuevas-Martinez EY, Guevara J, Limón D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santamaria A. 2004. S-allylcysteine prevents amyloid- β peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol* **489**:197-202
- [95]. Peng Q, Buz'Zard A, Lau BH. 2002. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid- β peptide-induced apoptosis in vitro. *Med Sci Monit* **8**:BR328-BR337
- [96]. Chauhan N, Sandoval J. 2007. Amelioration of early cognitive deficits by aged garlic extract in Alzheimer's transgenic mice. [Phytother Res](#) **21**:629-640
- [97]. Ahmad MS, Pischetsrieder M, Ahmed N. 2007. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur J Pharmacol* **561**:32-38
- [98]. www.national-academies.org/ilar
- [99]. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**:84-91
- [100]. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **71**:952-958
- [101]. Hissin PJ, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* **74**:214-226
- [102]. Numagami Y, Ohnishi S. 2001. S-Allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* **131**:1100S-1105S
- [103]. Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**:196-205
- [104]. Yan CK, Zeng FD. 2004. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-Allylcysteine in Rats. *Asian J Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **5**:61-69
- [105]. Melagelada C, Xifró X, Miñano A, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J. 2005. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* **20**:27-37

- [106]. Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J. 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK₁ cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* **45**: 2030-2039
- [107]. Kondo Y, Asanuma M, Nishibayashi S, Iwata E, Ogawa N. 1997. Late-onset lipid peroxidation and neuronal cell death following transient forebrain ischemia in rat brain. *Brain Res* **772**:37-44
- [108]. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: significant role for melatonin. *J Pineal Res* **36**:1-9
- [109]. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre M, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi I, Ibarra-Rubio ME. 2001. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem* **216**:9-19
- [110]. Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **349**:1-6
- [111]. Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **240**:500-508
- [112]. Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Islam F. 2006. Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia. *J Med Food* **9**: 537-544
- [113]. [Yang H, Wang J, Huang ZZ, Ou X, Lu SC](#). 2001. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Biochem J* **357**:447-55
- [114]. Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S, Clemens J. 2000. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**:592-603