



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del extracto de ajo envejecido y el jugo de  
mangostán en un modelo de isquemia–reperfusión  
cerebral

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Daniel León Aparicio



MÉXICO, D.F

AÑO 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: PROFESOR: ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES**

**VOCAL: PROFESOR: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**

**SECRETARIO: PROFESOR: PERLA D. MALDONADO JIMÉNEZ**

**1ER. SUPLENTE: PROFESOR: VANESSA MAYA AMPUDIA**

**2DO. SUPLENTE: PROFESOR: LAURA CARMONA SALAZAR**

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA, “MANUEL VELAZCO SUAREZ”**

**ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL PROYECTO DE CONACYT 52222-M**

**ASESORA DEL TEMA:**

**DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

**SUSTENTANTE:**

**DANIEL LEÓN APARICIO**

# DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, el orden de los factores no altera el producto, esto significa que el orden en que aparezcan no es por importancia, todos contribuyeron e hicieron algo para hacer esto realidad. Gracias a mis tres puntos.

Gracias a mis padres Arturo y Paz, a mi jefito por levantarte todos los días cuando todavía no salía el sol y regresar cuando el sol ya se había ido. Gracias por sacarnos adelante y sobre todo por todo lo que hiciste para que pudiéramos tener algo mejor. Tú si eres un ejemplo a seguir.

A mi jefecita que es la base principal de toda la familia, que sin ella estaríamos perdidos, siempre atenta y sabes cuando algo anda mal, gracias por tus consejos, por la comida que siempre la haces con amor y que sabe bien chida, por desvelarte conmigo cuando estudiaba, por esperarme todos los días, por preocuparte por mí, mis carnales, toda la familia y la demás raza.

Todo esto es para ustedes dos, ya que sin ustedes, yo no estaría aquí, no tengo con que agradecerles todo lo que me dieron, ni con todo el dinero les podría pagar, me dieron todo lo que pudieron y lo más importante que me pudieron dar me lo brindaron; confianza, tranquilidad, amor, seguridad, apoyo, amistad, regaños, y muchas cosas más que les tengo que agradecer, muchos momentos, muchas carencias, pero sobre todo muchos excesos y la suma de todo esto es por lo que estoy aquí en estos momentos. Gracias, espero nunca defraudarlos.

Una persona importante para que esto se consolidara es sin duda alguna, mi abuelita Adalberto “la milagrosa”, porque en verdad hace milagros y porque con lo que ha tenido ha sabido salir adelante a pesar de todas las barreras que se han puesto. Gracias por su apoyo, por las pláticas, por preocuparse, los consejos, por ser como es.

Jamás dejaré de agradecer el tiempo que compartes conmigo, fuiste, eres y serás una de las personas más importantes de mi vida. Oscuro y frío tenía mi corazón y con tu llegada y esa sonrisa lo has cambiado. Y también quiero agradecerte por todo lo que me has enseñado y por aceptarme en tu vida. Contigo he pasado los mejores momentos de mi vida loca. Eres mi más alegre pensamiento, eres una tonada, una dulce melodía que día con día siempre quiero cantar. Gracias Joyce, Te amo.

A mis hermanos Alberto y Arturo que siempre están conmigo, a pesar de que siempre nos peleamos, pero a final de cuentas estamos unidos.

Gracias a la UNAM por abrirme las puertas en la ENP 7 y luego abrir las de la Facultad de Química.

Gracias a la Dra. Perla por asesorarme en este trabajo, por el apoyo que me brindaste durante la realización de esta tesis, por los consejos, atenciones, regaños, por escucharme y por ser amiga.

A mis profesoras, que más que profesoras son amigas Dra. Patricia Severiano, M. en C. Lucia Cornejo, Dra. Perla Maldonado, Dra. Penélope Aguilera, Dra. María Elena Chánez y Dra. Alma Ortiz, gracias por su apoyo.

A los amigos de la Facultad, que siempre me brindaron su mano y su apoyo, gracias, Alberto, José, Daniel, Erik, Nora, Edda Tacho, Leti, Tere, Marilin, Jessica, Erika, Noel, Yosafat, Miriam, Luz, Manuel, Angélica Noemí, Karla y los que faltan.

A los amigos del laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral; Pablo, Ana Laura, Ranferi, Selene, Adriana, Víctor, Araceli, Daniel, Silvia, gracias por hacer que la estancia en el laboratorio haya sido amena, alegre, por la platicas, los consejos y por ayudarme en este trabajo.

Esta tesis es dedicada a la 14, que recuerdos aquellos, siempre listos para defendernos, siempre haciendo fiesta sin importar el lugar, que siga la fiesta, las cervezas, el tequila, que el barrio nunca muera. Por dónde empezar para nombrarlos, si alguno(a) no está mencionado les pido una disculpa. Pato, vibora, Pepito, mastin, pony, chivo, oso, pocholo, loco, Arturo, agruras, Erick, Juan, donas, Susana, Norma, Claudia, Carmen, Nando, Cele, pluky, chango, pelón, Elizabeth, bombón, toro, torito, tigana, Fabián, mayin. Algunos ya no están por el barrio, pero dejaron su recuerdo, en donde estén no se olviden de la 14.

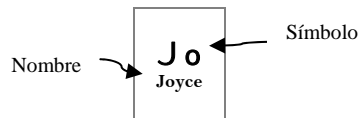
A mis tíos Nacho, Lupe, Alejandra, Manuel, César, Gabi, Chelo, Ale, Mati, Cata, Rafa†, Erick, Lola, les agradezco porque siempre están al pendiente de lo que hago y de lo que hacemos, gracias porque me han apoyado en este camino y porque siempre me desean lo mejor.

A mis primos, espero que con esto que consigo, les dé un pequeño impulso para seguir adelante, échale los kilos Ale, Chela, Erika, Claudia, Mariana, Michel, Pocho, Fernando, Andrés, Gabi, Alda, Chabe, Yami, Juan, Jessica y su hijo Axel, Lucero y a sus hijos Kevin y Jobita o para que nunca dejen de apoyar a sus hijos, esto es para ustedes Caro, Iván, José, Rafa, Mica, Cati, Queta, Estela.

Gracias a todos.

# Tabla periodica de la banda. Gracias a todos

I A																	0				
H Hdz. Daniel																	He Enrique				
Li Luis Pocho	Be Alberto Julio															B Beto loco	C Catorce	N Nacho	O Obake	F Fernando	Ne Noel
Na Nora	Mg Miguel Cuyo															Al Ana Laura	Si Jessica	P PVC	S Severina	Cl Chelo	Ar Arturo
		IIIB	IVB	V B	VI B	IIB		VIII B		I B	II B										
K Erika Sánchez	Ca Química alimentos	Sc Oscar Poni	Ti Agustín tilín	V Viviana	Cr Caro	Mn Marilyn	Fe Adelfa	Co Choche Ale	Ni Poni P7	Cu Cruz Juárez	Zn Susana	Ga Gabi	Ge Guadalupe	As Adys	Se Selene	Br Adalberto	Kr Karla				
Rb Rebeca	Sr Salvador Chambas	Y Yosafat	Zr Zucaritas Toño	Nb Beni	Mo Ramón	Tc Tacho	Ru Trucha Carnal	Rh Ernestho	Pd Pavin	Ag Agruras Cesar	Cd Carlos Daniel	In INNN	Sn San Juan	Sb Jobis	Te Estelar	I Iván Pecas	Xe Alex				
Cs Carlitos	Ba Miriam Bari	★	Hf	Ta Teresa	W Amanda	Re Rafael	Os Sonia	Ir Priscilla	Pt Pato	Au UNAM	Hg Hugo Zamorano	Tl Matilde	Pb Pablo	Bi Benjamín	Po pepito	At Antonio Orozco	Rn Ranferi				
Fr Paco	Ra Rosa P7	★	Rf Fer Toro	Db David	Sg	Bh Brodher Misael	Hs Enrique Huevas	Mt Mastin	Mv Manuel	Pi Penélope	Da Dafne Joyce	Tf	Bo Leticia Donis	Me María Elena	Nc Nezahual- coyotl	Ol Celin	On Norma				



★	La Alejandra	Ce Cele	Pr Pati Severiano	Nd Alondra	Pm Perla Maldonado	Sm Sánchez Javo	Eu Eusebio	Gd Edgar Vibora	Tb	Dy Edda Ayri	Ho Chivo	Er Erik	Tm	Yb Daysi	Lu Luci Cornejo
★	Ac Araceli	Th Toro	Pa Paz	U Claudia	Np Pechan	Pu Pluki	Am Armando	Cm Carimono	Bk Cuatro Iván	Cf	Es Denis	Fm Mafian	Md Margarita	No Noé Pelón	Lr Lucero

## Índice

	Pág
I. Resumen	1
II. Antecedentes	3
1. Isquemia–reperfusión cerebral	3
2. Estrés oxidativo	6
a) Especies reactivas de oxígeno	7
b) Especies reactivas de nitrógeno	8
3. Inflamación	11
4. Estrés oxidativo e inflamación en el modelo de isquemia–reperfusión cerebral	13
5. Ajo y extracto de ajo envejecido (EAE)	16
a) Extracto de ajo envejecido (EAE)	18
6. Mangostán	20
a) Propiedades antioxidantes del mangostán (MANG)	21
b) Propiedades anti–inflamatorias del mangostán (MANG)	23
III. Hipótesis	26
IV. Objetivos	27
a) Objetivo general	
b) Objetivos particulares	27
V. Metodología	28
1. Reactivos	28
2. Animales	28
3. Diseño experimental	29
3.1. Diagrama de flujo y dosis	29
3.2. Protocolo 1: Tiempo óptimo de administración del EAE	30
3.3. Protocolo 2: Tiempo óptimo de administración del MANG	30
3.4. Protocolo 3: Administración combinada del EAE y del MANG	31
4. Inducción de la isquemia cerebral	31
5. Evaluación de la conducta	32
6. Determinación del área de infarto	33
7. Análisis estadístico	34
VI. Resultados y discusión	
1. Protocolo 1. Tiempo óptimo de administración de EAE	35
2. Protocolo 2. Tiempo óptimo de administración del MANG	38
3. Protocolo 3. Efecto de la administración combinada del EAE y MANG	40
VII. Conclusiones	46
VIII. Bibliografía	47

## I. Resumen

Cuando se interrumpe el flujo sanguíneo (isquemia) hacia el cerebro se desencadena una serie de procesos que pueden causar daño con diferente grado de severidad. Además, se ha reportado que si el flujo sanguíneo no se reestablece (reperfusión) rápidamente el daño se exagera, por lo que es importante encontrar alguna forma de disminuir y/o prevenir este daño. Debido a que la muerte neuronal es secundaria a la activación de una serie de eventos, el tratamiento con un solo agente no es suficiente para disminuir de manera eficiente el área cerebral infartada ni revertir las alteraciones conductuales. En este contexto, el estrés oxidativo y la inflamación participan activamente en el mecanismo fisiopatológico que lleva a la muerte neuronal en el modelo de isquemia–reperfusión cerebral. Por ello, en este trabajo nos propusimos evaluar el efecto de la administración combinada del extracto de ajo envejecido (EAE: antioxidante) y del jugo de mangostán (MANG: anti–inflamatorio), como una alternativa para obtener una terapia eficaz.

Se emplearon ratas macho Wistar (300–350 g) que se sometieron a 2 h de isquemia (ocluyendo la arteria cerebral media) y a diferentes tiempos de perfusión. En el protocolo 1 se evaluó el efecto sobre el área de infarto de la administración del EAE. En el protocolo 2 se evaluó el efecto de la administración del MANG sobre el área de infarto. En ambos protocolos, el EAE y el MANG se administraron 30 min antes (–30R), al inicio (0R) y 1 h después (1R) de la perfusión. En el protocolo 3 se evaluó el efecto de la administración combinada del EAE y del MANG. En los tres protocolos, la dosis de EAE fue 1.2 mL/kg peso/*i.p.* y la de MANG fue 3 mL/kg peso/*i.p.* Se evaluó la conducta y se determinó el área de infarto.



En el protocolo 1, sólo la administración del EAE al inicio o 30 min antes de la reperusión previno el daño neuronal en un 86% comparado con los animales que fueron sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperusión. En el protocolo 2, la mayor protección (57%) se observó cuando el MANG se administró 30 min antes, ya que cuando se administró al inicio o 1 h después de la reperusión, la protección fue del 41% y del 13.5%, respectivamente. En el protocolo 3, la administración combinada del EAE y el MANG generó una protección del 36.9% a las 22 h, comparado con los animales sometidos a 2 h de isquemia y a 22 h de reperusión. Finalmente, sólo se observó mejoría en la evaluación de la conducta a las 22 h de reperusión con el tratamiento combinado.

Los resultados obtenidos indican que la administración combinada del EAE y del MANG protege parcialmente contra el daño cerebral y las alteraciones conductuales inducidos por la isquemia-reperusión a las 22 h, mientras que los extractos por si solos no protegen a este tiempo (2I/22R+EAE:  $42.9 \pm 5.3\%$  y 2I/22R+MANG:  $42.5 \pm 3.2\%$ ).

## II. Antecedentes

### 1. Isquemia–reperfusión cerebral

La enfermedad vascular cerebral representa la tercera causa de muerte en países industrializados después de las enfermedades cardiovasculares y del cáncer. A un más significativo, el infarto cerebral o isquemia cerebral es la primera causa de incapacidad permanente [1].

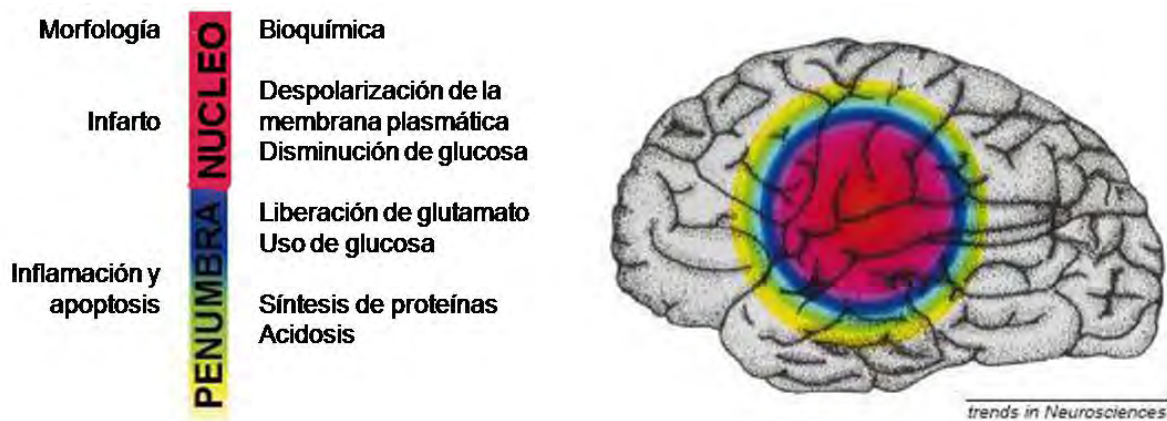
Se entiende como isquemia cerebral, la disminución o el cese de la circulación sanguínea (por lo tanto de oxígeno y de glucosa), lo que desencadena una serie de eventos que traen consecuencias graves e incluso pueden llegar hasta la muerte.

La isquemia cerebral se clasifica en dos tipos:

- Isquemia global, se presenta por una falla completa del bombeo cardiovascular o por una hipoxia cerebral difusa, lo que reduce el flujo sanguíneo a través de todo el cerebro. Este tipo de isquemia no debe durar más de 5–10 min, de lo contrario el paciente podría mantenerse con vida pero en estado vegetativo [2].

- Isquemia focal, que se presenta frecuentemente a partir de una oclusión de los vasos sanguíneos extra e intracraneales [2]. En este tipo de isquemia se generan dos áreas: 1) de infarto, donde el flujo sanguíneo es mínimo, por lo que se agotan las reservas energéticas y ocurre la muerte celular (Figura 1) y 2) de penumbra, zona que se localiza entre el tejido perfundido normalmente y el área de infarto (Figura 1); esta área muestra

un flujo sanguíneo moderadamente reducido por lo que depende de la circulación colateral, la cual preserva la viabilidad celular aunque no su función [3]. Debido a esto, las medidas terapéuticas están enfocadas al rescate de las células del área de penumbra [3, 4]. La isquemia focal que dura más de 1 h invariablemente ocasiona un infarto cerebral [5].



**Figura 1.** Área de infarto (zona roja) y área de penumbra isquémica (zona azul y amarilla). A la izquierda se muestran algunas alteraciones morfológicas y bioquímicas que ocurren en cada área. Tomado de [6].

El cerebro posee una tasa de respiración notablemente alta, ya que constituye aproximadamente el 2% de la masa corporal en el adulto y consume el 20% de  $O_2$  basal. Este consumo es independiente del estado de la actividad mental; varía poco entre el sueño o la intensa concentración. La mayor parte de la producción energética del cerebro sirve para impulsar la ATPasa de  $Na^+/K^+$  de la membrana plasmática, la cual mantiene el potencial de membrana requerido para la transmisión del impulso nervioso [7].

La severidad de la lesión cerebral en la isquemia está determinada por el grado y la duración de la pérdida del flujo sanguíneo; de esto dependerá que el cerebro sufra sólo una disfunción temporal o un infarto

cerebral. En muchos casos, la restitución del flujo sanguíneo añade efectos deletéreos a los inducidos por la isquemia, ya que incrementa el área de infarto y no previene la muerte celular [7]. Por ello, es esencial el empleo de agentes que bloqueen el daño metabólico y bioquímico, así como agentes que favorezcan la recuperación del tejido isquémico.

La isquemia cerebral produce una secuencia compleja de eventos, ya que la disminución del flujo sanguíneo induce hipoxia e hipoglucemia. Al no haber aceptor final de electrones ( $O_2$ ), se disminuye la fosforilación oxidativa y consecuentemente la producción de ATP [7]. La disminución en el nivel de ATP ocasiona 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 membrana plasmática y la liberación de neurotransmisores como el glutamato, el aspartato, la glicina, el GABA y la dopamina [8–10].

La acumulación de glutamato en el espacio extracelular produce 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 [8, 11].

La despolarización de la membrana plasmática hace que el ion  $Mg^{2+}$  que bloquea el canal iónico de los receptores de glutamato tipo N–metil–D–aspartato (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 a través

de un mecanismo que es mediado por el inositol trifosfato. El aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca la activación de varias enzimas como endonucleasas, fosfolipasas, calpaina, óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés), proteína cinasa C y xantina oxidasa [11].

La activación de la fosfolipasa ya sea por un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  o por la estimulación excesiva de los receptores NMDA por el glutamato [11–13] da como resultado la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana y la liberación de ácidos grasos incluyendo el ácido araquidónico, un precursor metabólico importante para la señalización celular de eicosanoides [14, 15]. Además, el metabolismo oxidativo del ácido araquidónico genera radicales libres y prostaglandinas [13–15].

Se ha reportado que la activación de la calpaina por acción del  $\text{Ca}^{2+}$  en la isquemia cerebral tiene efectos negativos debido a la proteólisis de las proteínas del citoesqueleto, receptores de membrana, proteínas dependientes de calmodulina, proteínas G, enzimas implicadas en señalización (como la proteína cinasa C) y muchos factores de transcripción [16–22].

Otros eventos que ocurren son: la inhibición de la síntesis de proteínas, la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente), la reacción inflamatoria y la apoptosis [6].

## **2. Estrés oxidativo**

Si bien es cierto que el  $\text{O}_2$  es indispensable para los organismos aerobios (pues es el aceptor final de los electrones en la cadena

respiratoria), también es cierto que a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones puede llegar a ser tóxico. Ahora se sabe que la toxicidad del  $O_2$  se debe a la producción de moléculas en las que el oxígeno esté parcialmente reducido, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO).

#### **a) Especies reactivas de oxígeno (ERO)**

**Anión superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ .** Se genera en muchas reacciones de auto-oxidación y por la cadena transportadora de electrones. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y del complejo I (NADH-coenzima Q reductasa) [23]. Otras enzimas capaces de producir  $O_2^{\bullet-}$  son la ciclooxigenasa (COX), la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, el citocromo P450, entre otras. Adicionalmente, en el proceso inflamatorio se activa la fosfolipasa-A2, que libera ácido araquidónico, el cual es metabolizado por la COX, produciendo prostaglandinas,  $O_2^{\bullet-}$ , hidroperóxidos y cicloperóxidos, los que contribuyen al daño membranar [7].

**Radical hidroxilo,  $\bullet OH$ .** Se forma en la reacción de Fenton a partir de  $H_2O_2$  en presencia de hierro. Otra reacción a través de la cual se puede producir es la de Haber-Weiss, en la que el  $O_2^{\bullet-}$  reacciona con el  $H_2O_2$  en presencia de un metal (regularmente  $Fe^{2+}$ ), produciendo  $H_2O$ ,  $O_2$  y el  $\bullet OH$ . El  $\bullet OH$  es extremadamente reactivo, ya que ataca a la mayoría de los componentes celulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos [24].

**Oxígeno singulete,  $^1O_2$ .** El  $^1O_2$  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 del  $\text{O}_2$  absorbe energía e invierte su rotación. Existen dos formas del  $^1\text{O}_2$ : la sigma (S), que es un radical libre debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos  $2p^*$  y la delta (D), que no es un radical libre ya que posee dos electrones apareados en un solo orbital  $2p^*$ . La forma S es muy inestable y puede oxidar proteínas, ADN y algunos lípidos [25], incluso es relevante en el desarrollo de diversas patologías tales como cáncer y cataratas [26]. Se puede generar cuando pigmentos como la clorofila, el retinal, las flavinas y las porfirinas se iluminan en presencia de  $\text{O}_2$  [27]. 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 [28].

**Peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Formado por la dismutación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  o por la reducción directa de  $\text{O}_2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas las monooxigenasas y las oxidasas (xantina oxidasa, oxidasas de aminoácidos, hexosas y fenoles). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 o inactivar enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa [23].

## **b) Especies reactivas de nitrógeno (ERN)**

Además de las ERO, también tienen importancia biológica las especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico

( $\bullet$ NO), el dióxido de nitrógeno ( $\bullet$ NO<sub>2</sub>), el ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), el catión nitronio (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>), el catión nitroxilo (NO<sup>+</sup>), el anión nitroxilo (NO<sup>•-</sup>), el tetraóxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), el trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), los alquilperoxinitritos (RONOO), el ácido peroxinitroso (ONOOH) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) [29–31]. Las ERN más estudiadas han sido el  $\bullet$ NO y el ONOO<sup>-</sup>.

**Óxido nítrico,  $\bullet$ NO.** Es un gas incoloro que se sintetiza en las células por la familia de las NOS, a partir del grupo guanidino de la arginina. Se han descrito tres isoformas de esta enzima: la NOS neuronal (nNOS, tipo I), la NOS inducible (iNOS, tipo II) y la NOS endotelial (eNOS, tipo III) [32]. La isoforma predominante de la NOS en la respuesta inflamatoria es la iNOS [33]. El  $\bullet$ NO es reconocido como un mediador y un regulador de la respuesta inflamatoria [34]. Es poco reactivo con moléculas biológicas; sin embargo, reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub> para generar el  $\bullet$ NO<sub>2</sub> o con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para generar el ONOO<sup>-</sup>, siendo ambos compuestos más oxidantes que él [23].

**Peroxinitrito, ONOO<sup>-</sup>.** Se forma rápidamente a partir de la reacción entre el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y el  $\bullet$ NO. Es sumamente citotóxico ya que es capaz de interactuar con diversas moléculas para generar especies aun más reactivas. Puede reaccionar con el CO<sub>2</sub> para formar el anión nitrosoperoxicarboxilato (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), el cual es altamente reactivo o puede descomponerse a CO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (65–70%) o a  $\bullet$ NO<sub>2</sub> y CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> (30–35%), todas moléculas tóxicas [29–31]. Por otro lado, puede protonarse para formar el ácido peroxonitroso (ONOOH) que se homolisa en  $\bullet$ OH y  $\bullet$ NO<sub>2</sub>, dos especies oxidantes. También, es capaz de oxidar a las lipoproteínas de baja densidad, liberar iones cobre por la destrucción de la ceruloplasmina o



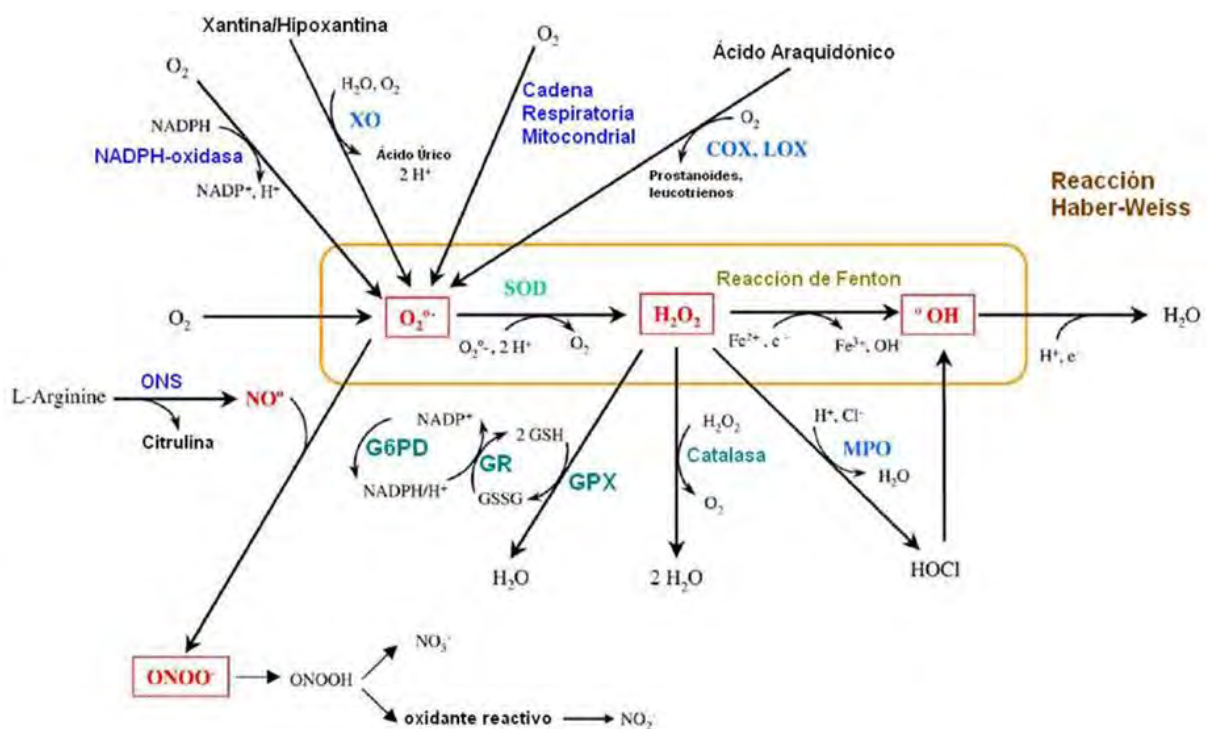
atacar a los residuos de tirosina de diferentes proteínas como se ha observado en algunas enfermedades [35].

Algunas ERO y ERN cumplen funciones fisiológicas importantes como ser neurotransmisores o segundos mensajeros (señalización redox) y participan en los mecanismos de defensa para eliminar organismos extraños como bacterias y virus, entre otros. Sin embargo, un incremento en la producción de estos radicales conduce a un deterioro celular como ocurre en el envejecimiento y en diferentes padecimientos asociados al daño oxidativo como el infarto cerebral y las enfermedades neurodegenerativas [36, 37]. En la inflamación, múltiples células (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, macrófagos y células endoteliales) son capaces de generar ERO, que pueden contribuir al desarrollo de diversas enfermedades [38].

Debido al potencial efecto tóxico de las ERO/ERN, el organismo debe mantener en equilibrio su producción y eliminación. Para ello cuenta con sistemas biológicos (enzimáticos y no enzimáticos) que detoxifican rápidamente estas especies o que reparan el daño resultante. Sin embargo, cuando aumenta la producción de ERO/ERN y/o disminuye la capacidad de los sistemas biológicos para detoxificarlos, sobreviene un proceso conocido como *estrés oxidativo*.

El sistema nervioso central es particularmente susceptible al daño por radicales libres debido a su alto requerimiento energético [7], su gran consumo de O<sub>2</sub> [7], su elevada concentración de Fe<sup>2+</sup> [39], su alta composición de lípidos poliinsaturados [14] y sus niveles relativamente bajos de algunos sistemas de antioxidantes durante la reperfusión [40–42].

Como se mencionó, durante la reperfusión, el estrés oxidativo exagera el daño iniciado por la isquemia cerebral, ya que la reoxigenación provee de  $O_2$  a las células para mantener la viabilidad neuronal. Pero el  $O_2$  también sirve como sustrato para numerosas reacciones de oxidación en donde se producen diferentes ERO [7, 43]. La figura 2 muestra las principales fuentes de ERO y ERN en el modelo de isquemia-reperfusión [7].



**Figura 2.** Principales fuentes de radicales libres durante la isquemia-reperfusión. Abreviaturas: XO, xantina oxidasa; COX, ciclooxigenasa; LOX, lipooxigenasa; ONS, óxido nítrico sintasa; SOD, superóxido dismutasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; MPO, mieloperoxidasa; HClO, ácido hipocloroso. Tomado de [7].

### 3. Inflamación

La inflamación es la forma de manifestarse de muchas enfermedades; es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares cuyo objetivo es defender a las células del organismo

de agresiones físicas, químicas o biológicas [44]. Tres aspectos se destacan en el proceso inflamatorio: 1) la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribirse a la zona de lucha contra el agente agresor; 2) la respuesta inmediata; y 3) la atracción de células del sistema inmune de los tejidos cercanos [45].

La inflamación participa en la recuperación después del accidente cerebrovascular, pero al mismo tiempo es un factor de riesgo en las lesiones cerebrovasculares [46, 47].

La activación de la fosfolipasa-A2 en el proceso inflamatorio libera ácido araquidónico, el cual puede seguir dos vías metabólicas: 1) la de la COX, que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y 2) la de la 5-lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos [48]. Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de novo por el mastocito, son mediadores importantes de la inflamación.

La inflamación en la lesión cerebrovascular es mediada por diversos componentes moleculares, en particular por citocinas, factores de crecimiento y diversos tipos celulares, tales como leucocitos y microglía, muchos de los cuales tienen propiedades anti o pro-inflamatorias con efectos benéficos o nocivos [33, 49].

Debido a que la inflamación es un mecanismo de defensa, la inflamación puede ser dañina si no se encuentra regulada adecuadamente. Por esta razón, fisiológicamente está sujeta a múltiples niveles de control bioquímico que involucran diversas poblaciones celulares y numerosos mediadores solubles, entre los cuales se encuentran las citocinas, que junto

con otras moléculas pro-inflamatorias (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, etc.) actúan temporalmente y especialmente entre las células que coordinan la respuesta inflamatoria. Se pueden encontrar citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Entre las citocinas pro-inflamatorias más importantes se encuentran la interleucina-1 (IL-1), la IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Mientras que las citocinas anti-inflamatorias más importantes son la IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento transformador beta TGF- $\beta$  [50].

Tanto el estudio del estrés oxidativo como el proceso inflamatorio ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que genera en la salud, ya que se han asociado con el proceso de envejecimiento y con una gran diversidad de estados patológicos como la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson, la artritis reumatoide, la hipertensión, la carcinogénesis y el daño ocasionado por la isquemia-reperfusión, entre otros [31, 49]. También se ha observado que diversos factores ambientales como los contaminantes en el aire y la radiación ionizante pueden favorecer el desequilibrio oxidante-antioxidante, llevando a un estado de estrés oxidativo [31].

#### **4. Estrés oxidativo e inflamación en el modelo de isquemia-reperfusión cerebral**

Desde los años 70 [51] se ha propuesto que el estrés oxidativo y la inflamación (esencialmente durante la etapa de perfusión post-isquémica) exacerban el daño inducido durante la isquemia, y desde entonces su papel en el daño post-isquémico se ha estudiado ampliamente. En este contexto, se han evaluado varios antioxidantes y anti-inflamatorios

en modelos experimentales, teniendo éxito en la mayoría de los casos. Sin embargo, cuando éstos compuestos se han evaluado en humanos se han obtenido resultados negativos.

Varias razones intentan explicar la aparente discrepancia entre el efecto protector observado en los modelos experimentales y la ineficacia de los tratamientos en humanos. Entre ellos se encuentra el hecho de que es complicado establecer el tiempo de isquemia y de reperfusión en los pacientes, razón por la cual el tratamiento podría estar administrándose fuera de la ventana temporal de eficacia del compuesto evaluado [6].

En los últimos años se han probado diferentes estrategias antioxidantes en el modelo de isquemia–reperfusión, basadas en el uso de compuestos que inhiben la producción de radicales libres, que atrapan radicales libres, o que aumentan su degradación [7, 52].

La Tabla 1 muestra algunos compuestos que inhiben enzimas que producen radicales libres (NADPH oxidasa, COX o xantina oxidasa) y que se han evaluado en el modelo de isquemia cerebral.

**Tabla 1.** Compuestos que inhiben la producción de radicales libres.

<b>Antioxidante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Efecto</b>
Apocinina (Inhibe NADPH oxidasa)	Gerbos, OBAC, 5min.	5mg/kg/ <i>i.p.</i> , 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>ip</i> después de 45 min de la I.	Disminuye las lesiones en el hipocampo y la actividad de la mieloperoxidasa.

**OBAC:** Oclusión bilateral de arterias carotidas, **I:** isquemia, **R:** reperfusión, ***ip*:** inyección intraperitoneal. Tomada de [52].

En la Tabla 2 se muestran algunos de los compuestos que atrapan radicales libres y que han mostrado un efecto protector en varios modelos experimentales de isquemia cerebral [52].

**Tabla 2.** Antioxidantes utilizados en isquemia cerebral.

<b>Antioxidante</b>	<b>Efecto como antioxidante</b>
Ácido lipóico	Atrapa $\cdot\text{OH}$ , $^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{NO}$ . Atrapa metales de transición, recicla otros antioxidantes (vitamina A y C) e incrementa los niveles de GSH.
N-acetilcisteína	Atrapa $\cdot\text{OH}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ y radicales peroxilo, incrementa la síntesis de GSH.
<b>Tirilazad</b>	Atrapa $\text{O}_2^{\cdot-}$ y radicales peroxilo, atrapa hierro.
Ácido úrico	Importante antioxidante en el plasma, atrapador de $\text{ONOO}^-$ .
Melatonina	Atrapa $\cdot\text{OH}$ , $^1\text{O}_2$ , $\text{ONOO}^-$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$ y radicales peroxilo. Incrementa la actividad de SOD, GPx, GR, CAT, G6PD y la síntesis de $\text{ARN}_m$ de SOD.
PBN	Nitrona, atrapador de radicales libres con base oxígeno-carbono.
<b>NXY-059</b>	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	Diester 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 $\cdot\text{NO}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ .
<b>Edaravona</b>	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,  $^1\text{O}_2$ : Oxígeno singulete,  $\cdot\text{NO}$ : óxido nítrico,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ : anión superóxido,  $\text{ONOO}^-$ : anión peroxinitrito, **PBN**:  $\alpha$ -fenil-*tert*-butil nitrona, **NXY-059**: 2,4-disulfofenil-N-*tert*-butilnitrona, **ADH**: ácido dehidroascórbico, **MDA**: malondialdehído, **GSH**: glutatión reducido. Tomada de [52].

A pesar de la gran cantidad de compuestos que se han evaluado, actualmente sólo se están empleando cuatro de ellos en ensayos clínicos [52]:

- 1) Tirilazad. Atrapador de radicales libres (Fase III, estado: inefectivo).

- 2) Ebselen. Mimetiza la acción de la Glutación peroxidasa (GPx) (Fase III, estado: efectivo).
- 3) Edaravona. Se introdujo en el mercado japonés para uso clínico en casos de isquemia en junio del 2001.
- 4) NXY-059. (Fase III, estado: en pruebas).

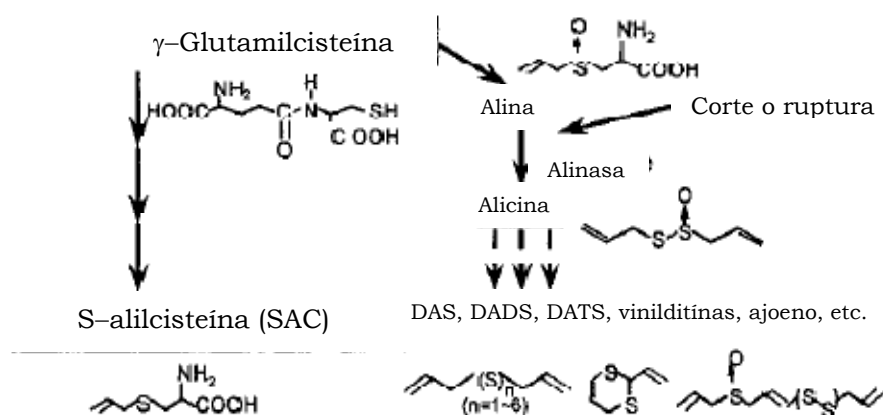
A diferencia del gran número de antioxidantes que se han evaluado en el modelo de isquemia cerebral, pocos estudios existen con anti-inflamatorios. Dentro de los compuestos que se han evaluado principalmente se encuentran inhibidores de la COX-2 o de la iNOS. Además, existe un mayor número de estudios en los que se emplean anticuerpos que neutralizan moléculas de adhesión o sus receptores como molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), IL-1 o TNF- $\alpha$  [Revisado en 6].

## **5. Ajo y extracto de ajo envejecido (EAE)**

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie que pertenece a la familia *Liliaceae* (comprende alrededor de 600 especies) y es originario de Asia central [53]. Se ha utilizado desde la antigüedad tanto por sus aplicaciones culinarias como por sus múltiples propiedades medicinales. En los últimos 30 años se han realizado numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre la química y las propiedades farmacológicas del ajo. De esta manera, actualmente están documentadas muchas de sus propiedades, entre las que destacan: el ser antimicrobiano, antimicótico, anticancerígeno, antihipertensivo, inmunosupresor, hipoglicémico y antioxidante, entre

otras [54]. Todas estas propiedades farmacológicas se han atribuido principalmente a sus componentes sulfurados [55].

El olor característico del ajo se debe a la alicina y a otros compuestos sulfurados solubles en aceite. Los dientes de ajo intactos contienen altas cantidades de  $\gamma$ -glutamilcisteínas, las cuales son hidrolizadas y oxidadas para formar alina. Después de un proceso de cortado, machacado o deshidratado, la enzima, alinasa, rápidamente convierte a la alina en alicina. La alicina y otros compuestos tiosulfonatos espontáneamente y de forma inmediata se descomponen a dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS) y dialiltrisulfuro (DATS), vinilditiínias y ajoeno (Figura 3) [56].



**Figura 3.** Cambios químicos en el ajo. Tomado de [56]

Numerosas investigaciones realizadas *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el ajo fresco y muchos de sus preparados poseen un efecto antioxidante [27, 56]. La composición química de los diferentes preparados depende del proceso al que se somete el ajo. La Tabla 3 muestra los preparados de ajo que más se han estudiado, así como su composición química.



**Tabla 3.** Composición química de diferentes preparaciones de ajo<sup>a,b</sup>

<b>Diente de ajo</b>	
	<b>(mg/g producto)</b>
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	6.0–14.0
$\gamma$ -glutamilcisteínas <sup>c</sup>	5.0–15.0
Compuestos derivados de la alina <sup>d</sup>	3.5–8.0
<b>Extracto de ajo envejecido</b>	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	0.2–0.4
$\gamma$ -glutamilcisteínas <sup>c</sup>	0.2–0.5
$\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína	0.1–0.4
S-alilcisteína	0.5–0.7
S-alilmercaptopcisteína	0.1–0.2
Compuestos derivados de la alina <sup>d</sup>	0.1–0.2
<b>Polvo de ajo</b>	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	10.0–17.0
$\gamma$ -glutamilcisteínas <sup>c</sup>	12.0–35.0
Compuestos derivados de la alina <sup>d</sup>	4.0–11.0
<b>Aceite de ajo</b>	
<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 <sup>d</sup>	0.4–6.0

<sup>a</sup>Tomada de [55].

<sup>b</sup>La *n* para cada producto son de 7 a 15.

<sup>c</sup>Los valores de las  $\gamma$ -glutamilcisteínas de todos los productos son la suma de los compuestos S-alil y S-*trans*-1-propenil.

<sup>d</sup>Los compuestos derivados de alina incluyen: alicina y otros tiosulfatos (después de la adición de agua), alilsulfuros, vinilditiínas y ajoene.

### **a) Extracto de ajo envejecido (EAE)**

A pesar de que existen diferentes preparaciones de ajo, el EAE posee ciertas ventajas de uso con respecto a otras debido a que: 1) no posee el olor característico de otras presentaciones [57]; 2) no muestra efectos tóxicos [55, 57]; 3) tiene un alto contenido de antioxidantes [58]; 4) diferentes

publicaciones científicas han demostrado su posible uso terapéutico en humanos [59, 60]; y 5) es un producto que se vende comúnmente en Estados Unidos, Japón y algunas partes de Europa como un suplemento alimenticio.

El EAE es manufacturado por Wakunaga of America, Co., Ltd.; es una preparación que resulta de la extracción etanólica del ajo fresco a temperatura ambiente durante 20 meses en tanques de acero inoxidable. Después, el extracto se separa y se concentra para su uso [56, 61, 62].

Se ha establecido la composición química del EAE (Tabla 4) y recientemente se ha ido encontrando que el EAE contiene pequeñas cantidades de compuestos antioxidantes como N-fructosilglutamato, N-fructosilarginina y flavonoides, así como un alto contenido de selenio [27, 63, 64].

**Tabla 4.** Composición del extracto de ajo envejecido<sup>a</sup>

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

<sup>a</sup>Los datos se expresan como media ± DS (mg/g producto) de 6 lotes. Tomado de [65].

El EAE ha mostrado un efecto protector en diferentes modelos experimentales:

**Hígado.** Wang *et al.* [66] encontraron que el EAE (2 a 10 mL/kg) previene el daño hepático inducido por el bromobenceno, debido a que incrementa los niveles de glutatión. Nakagawa *et al.* [67] reportaron que la

administración previa de EAE (100 mg/kg) protege el hígado de ratones contra el daño inducido por el acetaminofen y el tetracloruro de carbono. El efecto protector lo asociaron con el incremento en los niveles de glutatión y con la disminución en los niveles de lípidos oxidados.

**Corazón.** La administración previa de EAE (0.05 mL, *i.p.* 6 veces/semana/40 días) disminuyó el daño estructural y mejoró la función cardiaca en ratones tratados con doxorubicina (un cardiotóxico). Además, disminuyó el daño oxidativo, medido como niveles de lipoperoxidación [68].

**Riñón.** El EAE atenuó el daño renal (medido por los niveles de creatinina y de nitrógeno de urea en sangre), así como las alteraciones histológicas en las células de túbulo proximal inducidas por la gentamicina en ratas. El efecto protector se asoció con la disminución del estrés oxidativo, medido como niveles de proteínas oxidadas y grupos carbonilo, y con la preservación de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa dependiente de manganeso y glutatión peroxidasa [69].

**Cerebro.** El EAE (0.08–0.5 mL/kg/*i.p.*) disminuyó el daño cerebral isquémico en ratas cuando se administra 30 min antes de la isquemia [70].

## 6. Mangostán (MANG)

El MANG (*Garcinia mangostana* Linn, Clusiaceae) es un árbol tropical de crecimiento lento y hojas coriáceas, que crece principalmente en el sur de Asia (Indonesia, Malasia, Sri Lanka, Filipinas y Tailandia). La porción comestible de la fruta es blanca, suave y jugosa con un sabor ligeramente ácido y dulce y un agradable aroma [71], por ello se le conoce

como “la reina de las frutas” (Figura 4). El pericarpio de la fruta del MANG ha sido utilizado como parte de la medicina tradicional en el sureste de Asia desde hace muchos años para el tratamiento de infecciones de la piel y heridas [72], y disentería amebiana [73, 74], entre otros.

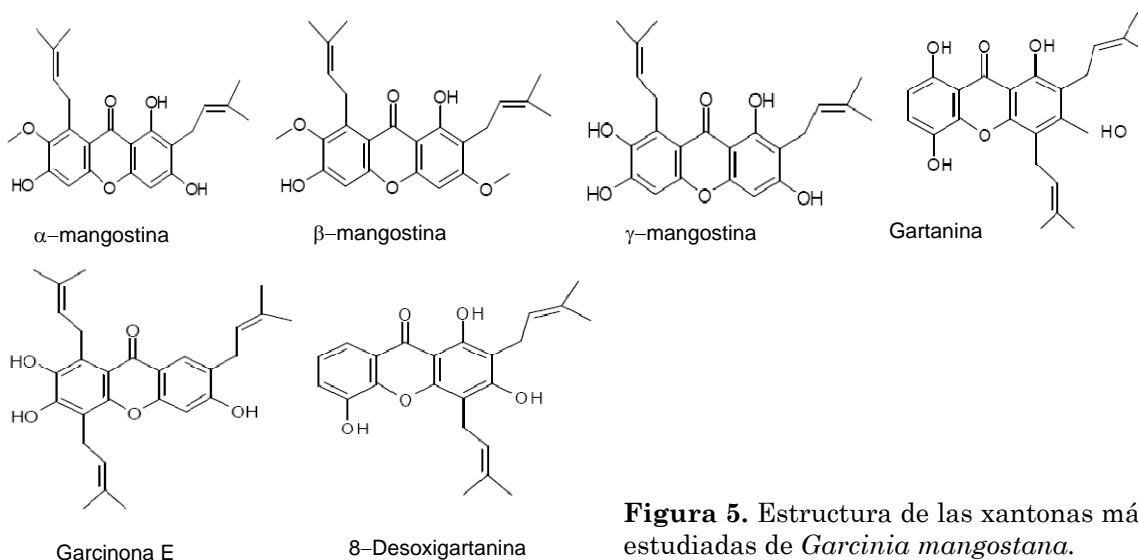


Figura 4. Mangostán

El MANG contiene un gran número de compuestos activos: vitaminas, catequinas (poderosos antioxidantes), polisacáridos y estilbenos. Sin embargo, lo que lo hace único y diferente son las XANTONAS, las cuales han sido aisladas del pericarpio, de la fruta completa, del tronco del árbol y de las hojas [75–77]. Existen alrededor de 200 xantonas en la naturaleza y más de 40 se encuentran en él. Diversos estudios han mostrado que las xantonas obtenidas del MANG tienen actividades biológicas importantes como antioxidante, anti-inflamatorio, antitumoral, etc. [78]. Las xantonas más estudiadas son la  $\alpha$ -, la  $\beta$ - y la  $\gamma$ -mangostina, la garcinona E, la 8-desoxigartanina y la gartanina (Figura 5).

**a) Propiedades antioxidantes del mangostán (MANG).** Se han atribuido las propiedades antioxidantes del extracto de MANG [79–81] a

algunas de las xantonas aisladas de esta fruta [71, 72, 79, 82]. Por ejemplo, Yoshikawa *et al.* [79] midieron la actividad antioxidante total del extracto metanólico de MANG y de  $\gamma$ -mangostina por el método de tiocianato férrico. Los autores encontraron que el extracto metanólico tiene un potente efecto antioxidante y que la  $\gamma$ -mangostina es un antioxidante más eficaz que el hidroxitolueno butilado y que el  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 5.** Estructura de las xantonas más estudiadas de *Garcinia mangostana*.

En otro trabajo se encontró que la  $\alpha$ -mangostina disminuye la oxidación de las LDL inducida por el cobre o por el radical peroxilo. En este trabajo se midió la oxidación de las LDL a través de la producción de dienos conjugados midiendo su absorbancia a 234 nm, por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), una medida de la oxidación de los lípidos, y por el consumo de  $\alpha$ -tocoferol. Por cada uno de estos métodos se encontró que la  $\alpha$ -mangostina disminuyó la oxidación de las LDL debido a que: (a) prolongó la fase de latencia (fase lag), (b) disminuyó la producción de TBARS y (c) disminuyó el consumo de  $\alpha$ -tocoferol inducido por la oxidación de las LDL [82]. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Mahabusarakam *et al.* [83].

Leong y Shui [80] midieron la capacidad antioxidante total de 27 frutas de los mercados de Singapur, incluido el MANG, utilizando el método del ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS). Se encontró que el extracto de MANG tiene actividad antioxidante y ocupó el octavo lugar de eficacia entre las 27 frutas estudiadas. Por otro lado, demostraron que el extracto crudo metanólico del MANG disminuye en forma significativa la producción de ERO intracelulares medidas con diacetato de 2, 7-diclorodihidrofluoresceína en células SKBR3 [84].

García *et al.* [81] estudiaron la capacidad antioxidante de diversas frutas y vegetales de Filipinas por medio de un ensayo de lipoperoxidación (sistema de ácido linoleico) y con un ensayo que evalúa la capacidad para atrapar radicales hidroxilo (método de la desoxirribosa). El extracto del pericarpio de MANG mostró una de las capacidades más altas para inhibir la oxidación del ácido linoleico; mientras que todas las plantas y frutas estudiadas mostraron intensa actividad para atrapar al radical hidroxilo.

**b) Propiedades anti-inflamatorias del mangostán (MANG).** Existen evidencias de las propiedades anti-inflamatorias en diferentes modelos *in vitro* [85–88] e *in vivo* [85, 87–90].

Se han realizado estudios farmacológicos con  $\alpha$ -mangostina y con derivados de xantonas como la 3-O-metilmangostina, el triacetato de mangostina y la mangostina-3,6-di-O-glucósido, entre otras, y se ha demostrado que su administración oral e intraperitoneal muestra una actividad anti-inflamatoria en ratas a las que se les indujo la formación de edema [89]. Este método de edema provoca una reacción inflamatoria

mediada por la liberación de diversos compuestos (histamina, serotonina, bradicina y prostaglandinas).

Por otro lado, se ha reportado que la  $\alpha$ -mangostina y la  $\gamma$ -mangostina bloquean los receptores de histamina y de serotonina, respectivamente [90] y que la  $\alpha$ -mangostina es un antagonista competitivo del receptor H<sub>1</sub> en células del músculo liso [90].

También se ha reportado que extractos etanólicos de MANG al 40% (100 y 300  $\mu\text{g/mL}$ ) poseen una potente actividad anti-inflamatoria ya que inhiben la síntesis de prostaglandinas E<sub>2</sub> y la liberación de histamina [85]. Por otro lado, las reacciones anafilácticas cutáneas pasivas en ratas fueron inhibidas en forma significativa por la administración intraperitoneal de este extracto [85].

La  $\gamma$ -mangostina inhibe fuertemente la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> inducida por el ionóforo de calcio A23187. Además, en preparaciones microsomales, la  $\gamma$ -mangostina inhibió la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina E<sub>2</sub> y en un ensayo *in vitro*, la  $\gamma$ -mangostina inhibió competitivamente la actividad de la COX-1 (constitutiva) y de la COX-2 (inducible) de una manera dosis-dependiente con valores de IC<sub>50</sub> 0.8 y 2  $\mu\text{M}$ , respectivamente [86].

En otro ensayo la  $\gamma$ -mangostina inhibió la liberación espontánea de prostaglandinas E<sub>2</sub> de una manera dosis-dependiente con una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ . Además la  $\gamma$ -mangostina inhibió de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm y la cantidad de proteína de la COX-2 inducidas por lipopolisacárido [87]. Ensayos con un gen reportero

(luciferasa) demostraron que la  $\gamma$ -mangostina reduce la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, así como la activación del gen COX-2 inducido por lipopolisacáridos [87].

Recientemente se encontró que, en células C6 de glioma de rata, la garcinona B disminuyó (aproximadamente 30%) la estimulación del factor NF- $\kappa$ B, así como el incremento de la liberación de prostaglandinas E2, inducidas por lipopolisacáridos, sugiriendo que esta xantona está relacionada con la vía inflamatoria [88].



### **III. Hipótesis**

Debido a que el estrés oxidativo y el proceso inflamatorio son dos eventos importantes que participan en el mecanismo fisiopatológico que lleva a la muerte neuronal en la isquemia–reperfusión es posible que:

La administración combinada de agentes que controlen o prevengan el estrés oxidativo (EAE) y el proceso inflamatorio (MANG) que ocurren post–isquemia sea una buena alternativa para obtener un rescate eficiente de las células de la zona de penumbra y disminuir el área de infarto.

## **IV. Objetivos**

### **a) Objetivo general**

- ✓ Determinar el efecto de la administración combinada del extracto de ajo envejecido (EAE) y del mangostán (MANG) sobre el daño cerebral que se induce en un modelo de isquemia-reperfusión.

### **b) Objetivos particulares**

- ✓ Evaluar el efecto del EAE y el MANG por si solos sobre el área de infarto y la evaluación de la conducta en un modelo de isquemia-reperfusión cerebral.
- ✓ Evaluar el efecto de la administración combinada del EAE y MANG sobre el área de infarto y la evaluación de la conducta en un modelo de isquemia-reperfusión cerebral.

## **V. Metodología**

### **1. Reactivos**

— El EAE, Kyolic® liquid, se adquirió de Wakunaga of America, Co., Ltd (Misión Viejo, CA).

— El MANG fue adquirido de XanGo™.

— El cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC) se adquirió de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

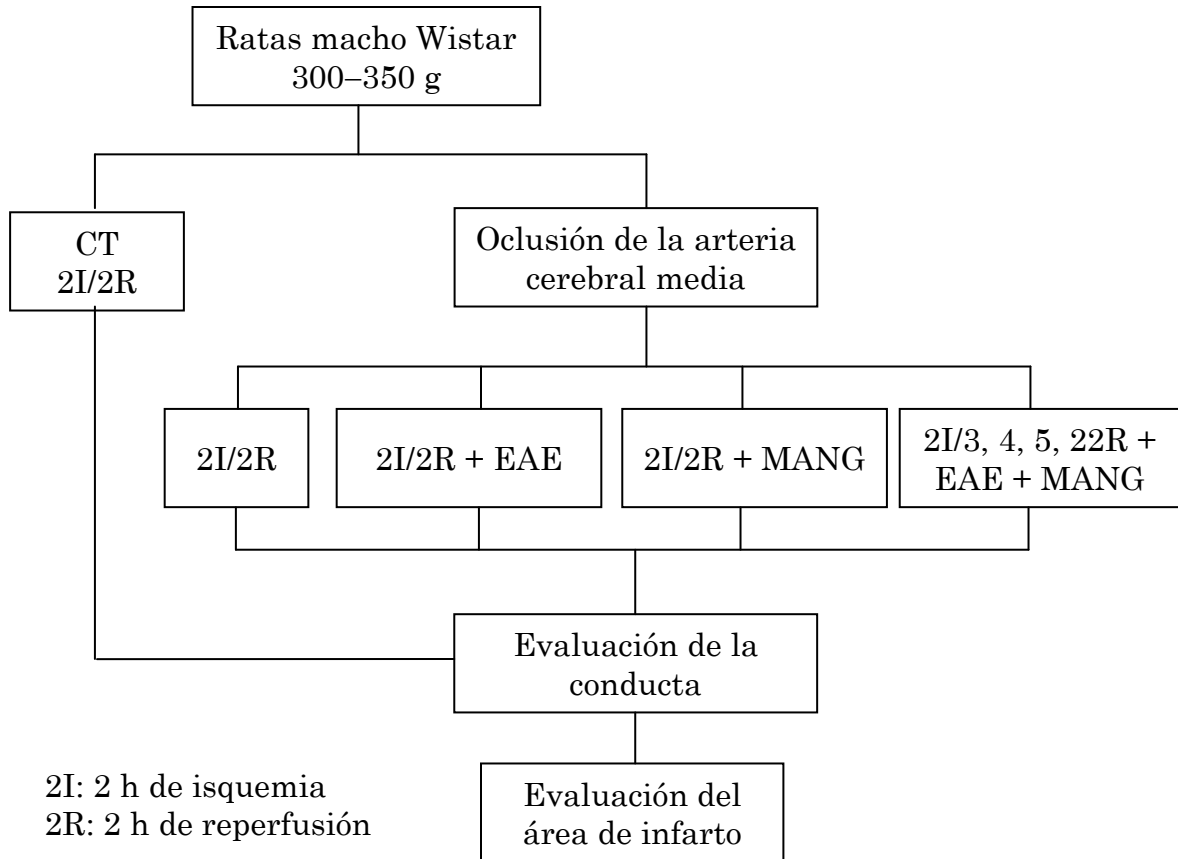
— Todas las sales empleadas fueron grado reactivo analítico.

### **2. Animales**

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (300–350g), obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suarez”. Los animales se colocaron en jaulas de acrílico, en condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 30^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $50 \pm 10\%$ ) y luz (ciclos de 12 h luz/oscuridad) con libre acceso al agua y al alimento. Para cada grupo se empleó una  $n = 7$ . Los procedimientos experimentales, estuvieron apegados a los lineamientos del Comité de Ética del Instituto. Además, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

### 3. Diseño experimental

#### 3.1. Diagrama de flujo y dosis



**Tratamiento con EAE.** Se administro en una dosis de 1,2 mL/kg peso/*i.p.* Las ratas control recibieron solución salina isotónica (SSI) en la misma dosis.

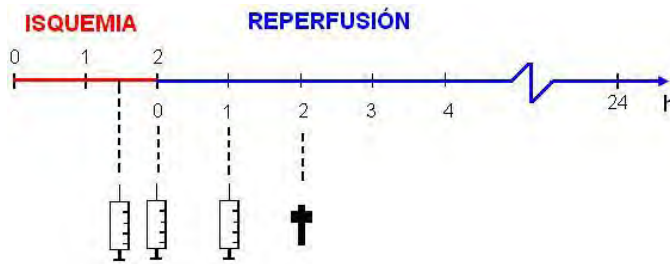


**Tratamiento con MANG.** Se administró en una dosis de 3 mL/kg/*i.p.* Las ratas control recibieron SSI en la misma dosis.



### 3.2 Protocolo 1: Tiempo óptimo de administración del EAE

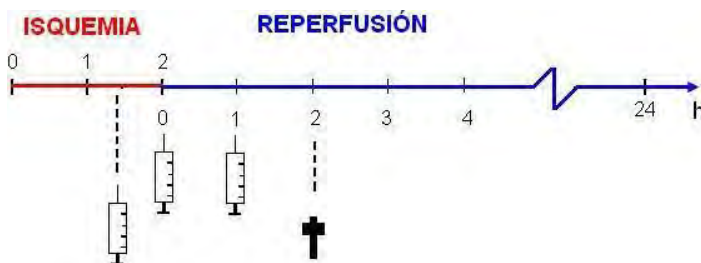
En grupos independientes de animales, el EAE se administró a diferentes tiempos (30 min antes, al inicio y 1 h después de la reperfusión) y se determinó su efecto sobre el área de infarto después de 2 h de reperfusión (Figura 6).



**Figura 6.** Tiempo óptimo de administración del EAE. La jeringa indica el tiempo de administración del EAE y la cruz el tiempo de sacrificio.

### 3.3 Protocolo 2: Tiempo óptimo de administración del MANG

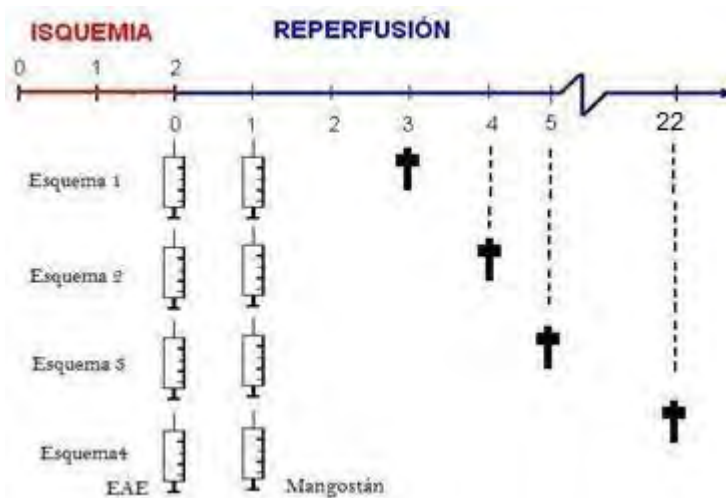
En grupos independientes de animales el MANG se administró a diferentes tiempos (30 min antes, al inicio y 1 h después de la reperfusión) y se determinó su efecto sobre el área de infarto después de 2 h de reperfusión (Figura 7). En el protocolo 3 se empleó el tiempo en el que se observó menor porcentaje de área de infarto.



**Figura 7.** Tiempo óptimo de administración del MANG. La jeringa indica el tiempo de administración del MANG y la cruz el tiempo de sacrificio.

### 3.4 Protocolo 3: Administración combinada del EAE y del MANG

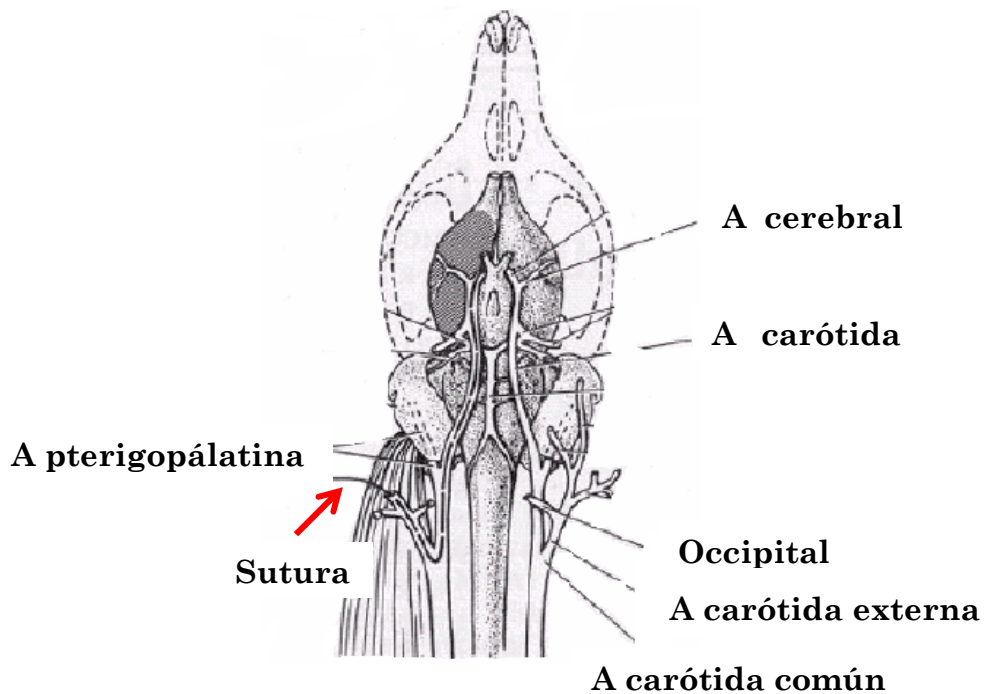
En grupos independientes de animales se administró el EAE al inicio de la reperfusion y 1 h después se administró el MANG. Los animales se sacrificaron 3, 4, 5 y 22 h después del inicio de la reperfusion (Figura 8).



**Figura 8.** Administración combinada del EAE y del MANG. En los cuatro esquemas: Se administró el EAE al inicio y 1 h después el MANG, un grupo se sacrificó a las 3 h, otro a las 4 h, otro a las 5 h y el último grupo a las 22 h después del inicio de la reperfusion. La jeringa indica el tiempo de administración del EAE y del MANG y la cruz el tiempo de sacrificio.

### 4. Inducción de la isquemia cerebral

La isquemia cerebral se indujo a través de la oclusión de la arteria cerebral media [91]. Los animales se mantuvieron anestesiados en 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). La oclusión de la arteria cerebral media se logró con la inserción de un monofilamento de nylon (40 mm de longitud y 0.24 mm de diámetro) en el lumen de la ACE y de la ACI (Figura 9). Dos horas después se le retiró el filamento para iniciar la reperfusion. Los animales se sacrificaron por decapitación después de 3, 4, 5 y 22 h de reperfusion.



**Figura 9.** Esquema de la introducción de la sutura para ocluir la arteria cerebral media.

## 5. Evaluación de la conducta

El estado neurológico de cada rata se determinó con 5 pruebas:

1) *Flexión de la pata contra lateral a la lesión.* Las ratas se suspendieron de la cola y se observó la postura de los miembros delanteros. Las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, los animales con daño doblan la pata contra lateral a la lesión;

2) *Movilidad espontánea.* Los animales se colocaron en una superficie plana (0.5 metros de diámetro). Los animales normales inician el movimiento antes de los 10 seg.

**3) Reflejo de agarrar.** Las ratas se suspendieron de la cola y se colocó un cable delante de los miembros delanteros. Los animales normales se agarran simultáneamente con ambas patas del cable, los animales con daño no pueden agarrarse.

**4) Prueba de la barra horizontal.** A las ratas que son capaces de agarrarse del cable en la prueba anterior se les determinó el tiempo que pueden mantenerse colgadas; los animales normales deben soportar por lo menos 3 seg.

**5) Conducta de giro.** Las ratas se sostuvieron por la cola y se les permitió moverse libremente apoyando las patas delanteras, mientras se observó la dirección del movimiento durante 30 seg. Los animales dañados realizan al menos 5 giros en sentido contra lateral a la lesión.

A cada prueba se le asignó un valor de 0 cuando la conducta fue normal y de 1 cuando se observó daño. La suma del valor obtenido en cada prueba individual se utilizó para establecer el déficit neurológico. La evaluación se realizó 30 min antes de la reperfusión y antes del sacrificio. Los animales con déficit de 1 o 5 se excluyeron del estudio, ya que un déficit menor a 2 está asociado a una cirugía inadecuada; mientras que el déficit de 5 es indicador de un daño muy severo [modificado de 91–93].

## **6. Determinación del área de infarto**

Para determinar viabilidad celular se utilizó el método de Preston & Webster [94]. Se extrajo el cerebro, se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 4 min y se realizaron cortes coronales de 2 mm. Los cortes se tiñeron con cloruro de 2,



3, 5-trifeniltetrazolio 2% (TTC), en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 a 37°C durante 30 min y en oscuridad. Posteriormente, los cortes se fijaron en formaldehído al 5% en PBS. El TTC es un compuesto incoloro, que es reducido por la succinato deshidrogenasa de las mitocondrias del tejido viable a 1, 3, 5-trifenilformazán un compuesto de color rojo. Si la actividad mitocondrial es normal, la sal de tetrazolio se reduce (color rojo); sin embargo, cuando la actividad mitocondrial se encuentra disminuida el TTC se mantiene oxidado (área de infarto: color blanco). El área de infarto se determinó con un analizador de imágenes Quantity One de BioRad. Los datos se expresaron como % 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:

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

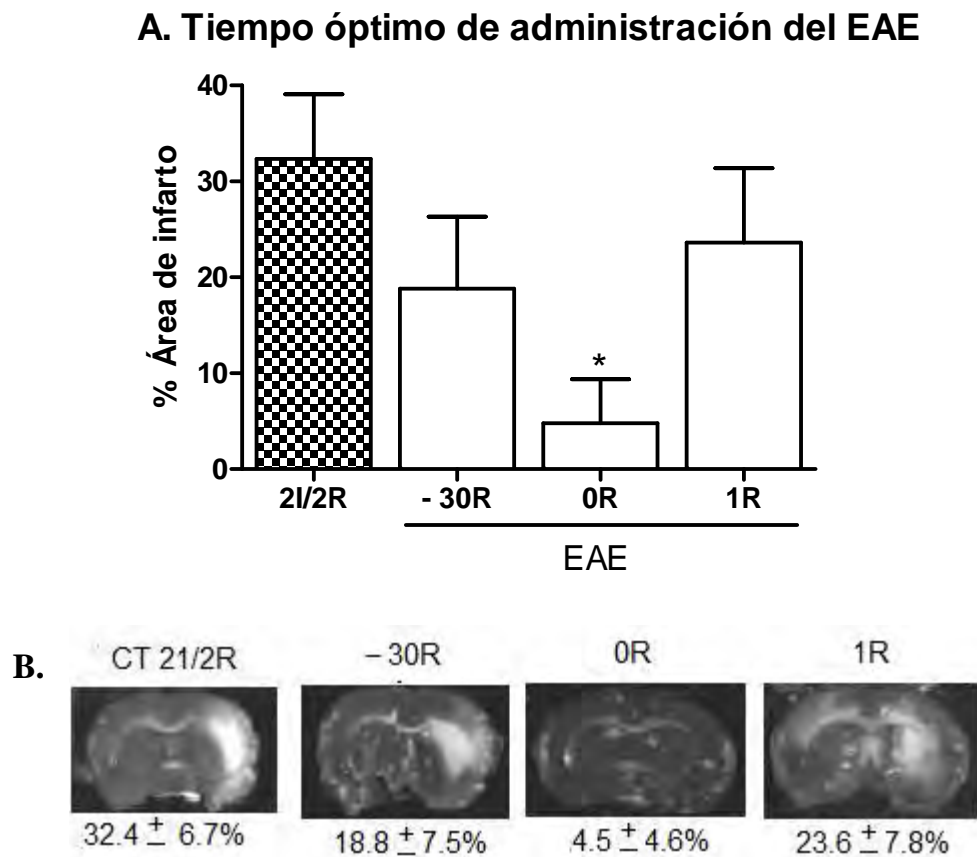
## **7. Análisis estadístico**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DS). Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba Dunette. Se utilizó el programa Prism 5.01, Graph Pad (San Diego, CA). Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## VI. Resultados y discusión

### 1. Protocolo 1: Tiempo óptimo de administración del EAE

Se evaluó el efecto de la administración del EAE a diferentes tiempos: 30 min antes (-30R), al inicio (0R) y 1 h después (1R) de la reperfusión, sobre el daño neuronal inducido por 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión (2I/2R).

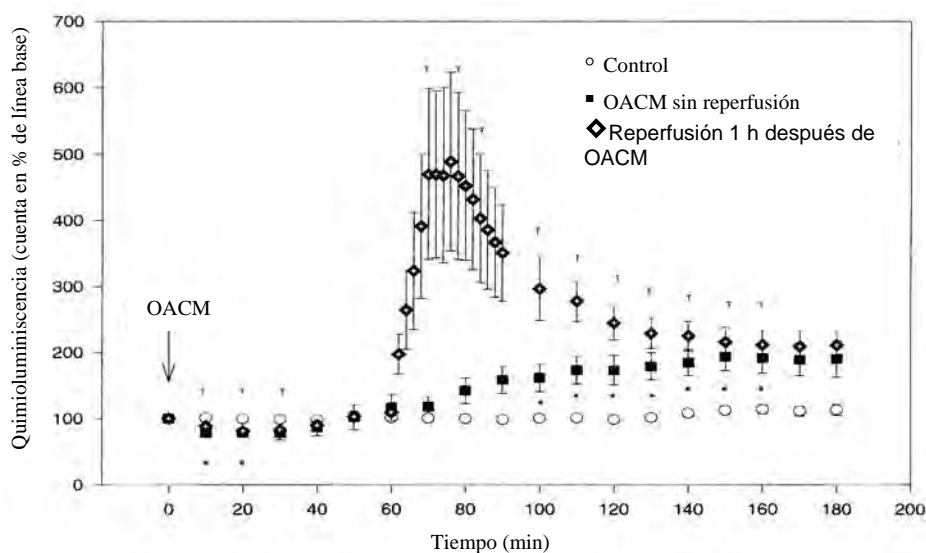


**Figura 10. A:** Efecto de la administración del EAE (-30R, 0R y 1R) sobre el área de infarto. **B:** Imágenes representativas del área de infarto (área blanca) en los diferentes tiempos de administración del EAE. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DE. \* $P < 0.05$  vs 2I/2R.

Las Figuras 10A y 10B muestran que sólo la administración del EAE al inicio de la reperfusión (0R) pudo retrasar significativamente (0R:  $4.5 \pm$

4.6%) la aparición del área de infarto inducida por 2 h de isquemia y 2 de perfusión (2I/2R:  $32.4 \pm 6.7\%$ ); ya que cuando se administra el EAE 30 min antes (-30R:  $18.8 \pm 7.5\%$ ) o 1 h después del inicio de la perfusión (1R:  $23.6 \pm 7.8\%$ ), no evitó la muerte neuronal inducida por la isquemia–perfusión.

El efecto (no protector) que se observa cuando el EAE se administra antes (-30R) de la perfusión podría deberse a que los compuestos antioxidantes del EAE reaccionan y se consumen con los radicales libres que se generan durante la isquemia, quedando pocas moléculas antioxidantes del extracto que puedan reaccionar con los radicales libres que se forman durante la perfusión. Esto se sugiere porque se sabe que la producción máxima de radicales libres ocurre alrededor de los 20 minutos después del inicio de la perfusión (Figura 11) [95]. Es posible que los pocos antioxidantes que quedaron no sean suficientes para atrapar a los radicales que se generan durante la perfusión.



**Figura 11.** Producción de ERO en animales sometidos a isquemia–perfusión. OACM: Oclusión de la Arteria Cerebral Media. Tomado de [95].

Por otro lado, el efecto (no protector) que se observa cuando se administra el EAE 1 h después (1R) del inicio de la reperfusión puede deberse a que los componentes antioxidantes del EAE llegan al tejido cerebral cuando los radicales libres ya han generado un estado de estrés oxidativo y el daño celular ya se ha iniciado. Como se mencionó antes, la producción máxima de radicales libres ocurre 20 min después del inicio de la reperfusión (Figura 11), por lo que es posible que la llegada de los compuestos antioxidantes del EAE al tejido cerebral podría ocurrir cuando el daño oxidativo ya ha ocurrido. Esto es apoyado por los estudios de farmacocinética que se conocen del principal componente del EAE, la S-alilcisteína (Ver más adelante).

Finalmente, la administración del EAE al inicio de la reperfusión (0R) mostró una clara protección, sugiriendo que el control o el manejo de los radicales libres que se generan al inicio de la reperfusión son críticos para prevenir el daño neuronal que sufrirá la célula por el estrés oxidativo. Durante la reperfusión, el incremento súbito en la concentración de  $O_2$  que ocurre cuando se restablece el flujo sanguíneo, desata una serie de reacciones en cadena que llevan a la producción masiva de radicales libres, los cuales, si no son inactivados, dañan cualquier biomolécula llevando a la muerte celular [43].

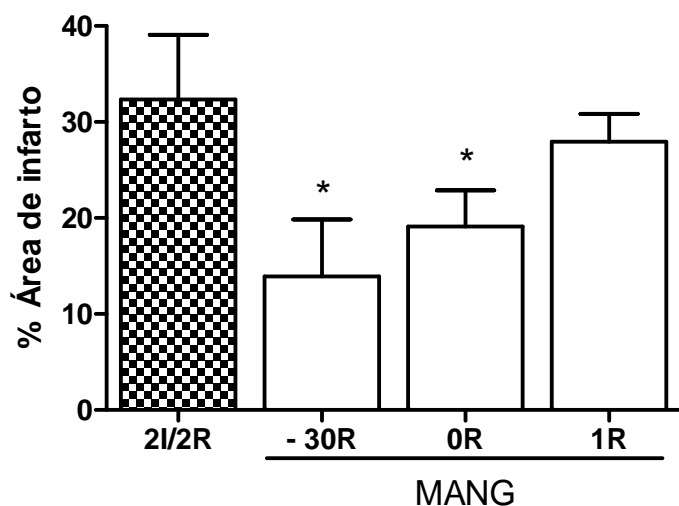
Por otro lado, el pico de producción de radicales libres que se observa (a los 20 min) durante la reperfusión, coincide con el tiempo en el que se alcanza la mayor concentración del principal componente del EAE, la S-alilcisteína (Tabla 2), después de su administración oral [96]. Se ha demostrado que la S-alilcisteína es un potente antioxidante, ya que atrapa diferentes especies radicales y no radicales [26, 97, 98], y que tarda

aproximadamente 30 min. en alcanzar su concentración máxima en el cerebro [96]. Lo anterior sugiere que el efecto protector del EAE cuando se administra al inicio de la reperfusión (0R) se debe a que los compuestos antioxidantes del EAE atrapan los radicales libres que se generan durante la reperfusión, previniendo de esta forma el daño oxidativo.

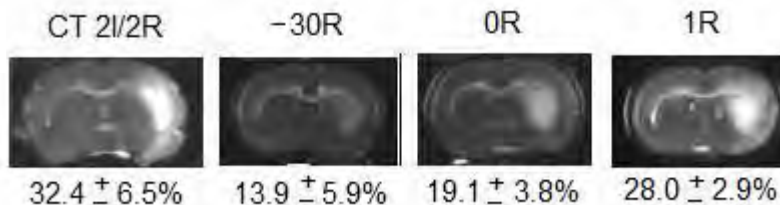
## 2. Protocolo 2: Tiempo óptimo de la administración del MANG

Se evaluó el efecto del MANG sobre el daño cerebral inducido por 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión. Para ello, el MANG se administró 30 min antes (-30R), al inicio (0R) y 1 h después (1R) de la reperfusión (Figura 12).

### A. Tiempo óptimo de administración del MANG



### B.



**Figura 12. A:** Efecto de la administración del MANG (-30R, 0R y 1R) sobre el área de infarto. **B:** Imágenes representativas del área de infarto (área blanca) en los diferentes tiempos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DE. \* $P < 0.05$  vs 2I/2R.

Se observó un efecto protector cuando el MANG se administró 30 min antes (-30R:  $13.9 \pm 5.9\%$ ) o al inicio de la reperfusión (0R:  $19.1 \pm 3.8\%$ ), ya que no tuvo ningún efecto cuando se administró 1 h después (1R:  $28.0 \pm 2.9\%$ ).

La protección que se observa cuando el MANG se administra 30 min antes o al inicio de la reperfusión sugiere que la farmacocinética de los compuestos antioxidantes (xantonas) presentes en el MANG es diferente a la de los antioxidantes del EAE, siendo la primera más lenta. Hasta ahora, en la literatura no se tienen datos de la farmacocinética de las xantonas que se encuentran en el MANG. Sin embargo, se sabe que la mangiferina, una xantona C-glucosilada de la planta *Swertia chirata* (familia *Gentianaceae*), comúnmente conocida como “Chirata”, alcanza su concentración máxima en plasma en 1 h [99], mientras que el compuesto mayoritario del EAE, la SAC, tarda aproximadamente 30 min en alcanzar su máxima concentración en plasma y en tejidos [96]. Por ello, es probable que los antioxidantes presentes en el MANG tarden más tiempo en llegar al cerebro para poder reaccionar con los radicales libres que se generan sobre todo en los primeros 20 min de la reperfusión [95], llegando en un momento en el que daño por estrés oxidativo ya se ha iniciado.

Por otro lado, cuando se administra el MANG al inicio de la reperfusión se observa un daño cerebral mayor ( $19.1 \pm 3.8\%$ ) al que se observa cuando el EAE se administra al mismo tiempo ( $4.5 \pm 4.6\%$ ), lo que sugiere que los antioxidantes del EAE son más potentes que los del MANG, ya que cuando el EAE se administró al inicio de la reperfusión la protección que se observó fue del 86.1%, mientras que con el MANG la protección fue del 41%.

Finalmente, cuando se administró el MANG 1 h después de la reperusión, el daño que se observó fue de  $28.0 \pm 2.9\%$ , muy similar al que se observa en los animales sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperusión. La falta de efecto protector podría deberse a que los antioxidantes del MANG llegan al tejido cerebral cuando los radicales libres ya han generado un estado de estrés oxidativo y el daño molecular ya se ha iniciado (ver la explicación anterior que se dio para el EAE solo).

### **3. Protocolo 3: Efecto de la administración combinada del EAE y MANG**

Hasta la fecha, no existe un tratamiento eficaz que disminuya el daño y las alteraciones conductuales que se presentan en los pacientes que sufren un infarto cerebral. La efectividad terapéutica de los fármacos empleados para disminuir o detener el daño neuronal, dependerá del empleo de compuestos que bloqueen los diferentes mecanismos que se activan durante la isquemia y la reperusión. Por ello, se evaluó el efecto de una terapia combinada, empleando compuestos con diferente mecanismo de acción para ver si se alcanzaba un mejor estado de protección (sinergismo).

Debido a que el EAE y el MANG mostraron un efecto protector sobre el área de infarto que se induce después de 2 h de isquemia y 2 h de reperusión, en este protocolo se evaluó si la administración combinada de ambos extractos mostraba un mejor efecto protector (sinergismo) y sobre todo si ese efecto se mantenía a tiempos más largos de reperusión. Por ello, para este protocolo los animales se sometieron a 2 h de isquemia y a 22 h de reperusión.

Se evaluaron 3 esquemas y en todos el EAE se administró al inicio de la reperusión debido a que en ese tiempo mostró la mayor protección ( $4.5 \pm 4.6\%$ ) comparado con el grupo 2I/2R. El primer esquema que se evaluó fue administrando cada extracto en el tiempo que mostró el mayor efecto protector (MANG: 30 min antes, Figura 12 y EAE: al inicio de la reperusión, Figura 11). Con este tratamiento el área de infarto que se obtuvo fue de  $48.8 \pm 4.9\%$ , indicando que este esquema no evitó la muerte neuronal inducida por 2 h isquemia y 22 h de reperusión ( $54.1 \pm 2.7\%$ ).

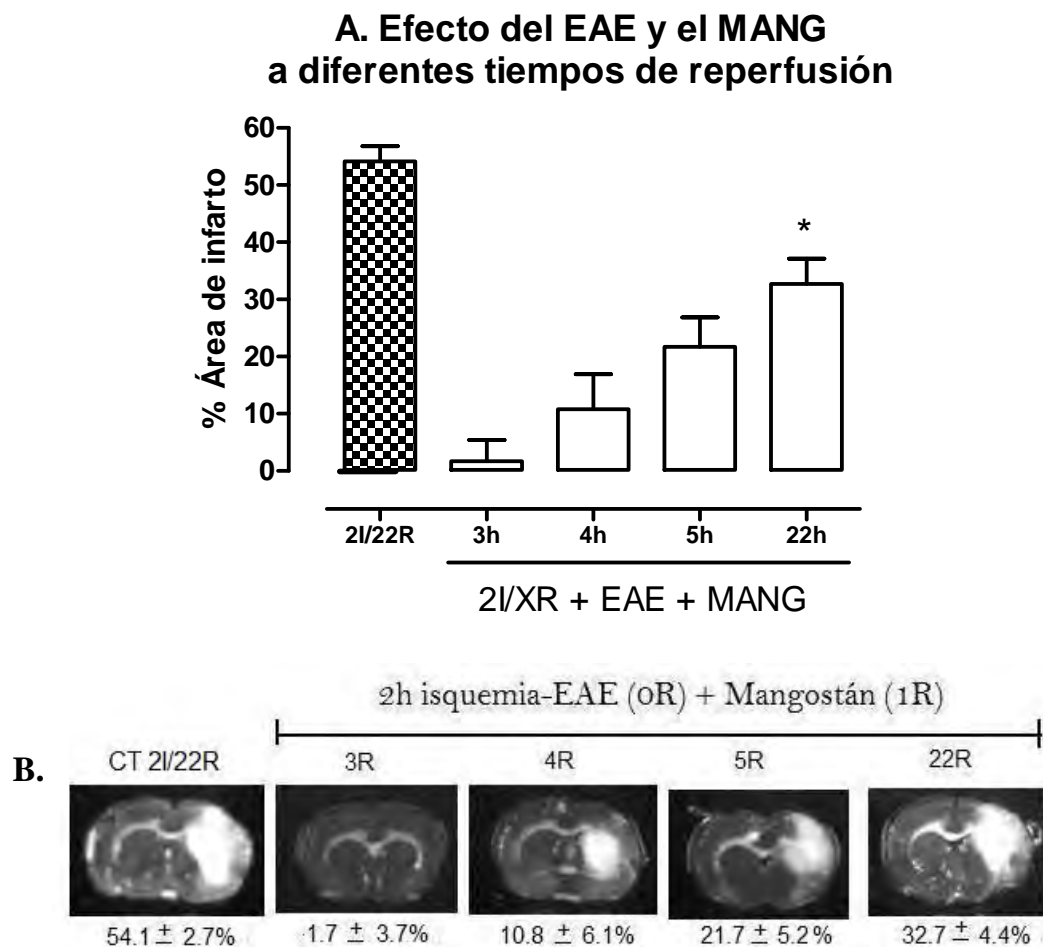
El siguiente esquema que se evaluó fue administrando el EAE y el MANG al inicio de la reperusión, ya que se obtuvo un área de infarto de  $47.6 \pm 5.1\%$ , lo que de igual forma no mostró protección contra el daño inducido por la isquemia-reperusión. Finalmente, decidimos evaluar el efecto de la administración del EAE al inicio y del MANG 1 h después de la reperusión, encontrando sorprendentemente que este tratamiento redujo el área de infarto a  $32.7 \pm 4.4\%$ , generando una protección del 39.6% con respecto al tratamiento de 2 h de isquemia y 22 h de reperusión.

Para evaluar si este esquema de administración disminuía o solo retrasaba la aparición del área de infarto a las 22 h de reperusión, se sacrificaron grupos de animales a diferentes tiempos de reperusión: 3, 4, 5 y 22 h y se determinó el área de infarto.

Los resultados indican que este esquema de administración retrasa la aparición del área de infarto, ya que al aumentar el tiempo de reperusión el área de infarto también aumenta significativamente a partir de las 4 h (Figura 13), acorde a lo que ya se ha reportado previamente [43]. La aparición de área de infarto desde tiempos tan tempranos (4 h) sugiere que



las primeras horas son críticas para la activación y/o la inactivación de los mecanismos que llevarán a la muerte neuronal. Se sabe que las células que han sido privadas de nutrientes y O<sub>2</sub> (isquemia), al entrar en contacto nuevamente con el O<sub>2</sub> y la glucosa (reperfusión), activan una serie de reacciones que inducen la formación de radicales libres [11, 95, 98, 100].



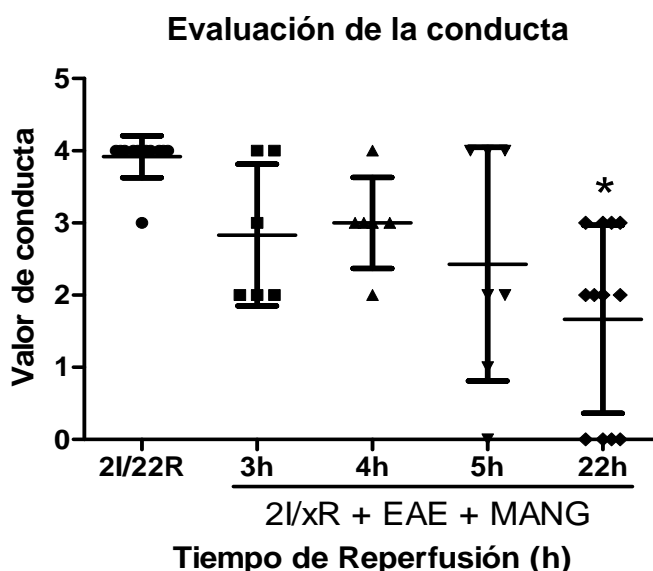
**Figura 13. A:** Efecto del EAE y el MANG sobre el área de infarto. **B:** Imágenes representativas del área de infarto (área blanca) a los diferentes tiempos de reperfusión. Los valores se expresan como la media ± DE. \*P<0.05 vs 2I/22R.

Además, también podemos concluir que este esquema de administración reduce el área de infarto ya que a las 22 h se observa una disminución significativa (39.6%) con respecto al grupo 2I/22R (Figura 13). La administración por separado del EAE y del MANG no disminuyen el

área de infarto después de 2 h de isquemia y 22 h de reperfusión (2I/22R+EAE:  $42.9 \pm 5.3\%$  y 2I/22R+MANG:  $42.5 \pm 3.2\%$ ).

Además del efecto protector que se observa sobre el área de infarto cuando el EAE se administra al inicio y el MANG 1 h después de la reperfusión, también encontramos una mejoría en la evaluación de la conducta de esos animales a las 22 h de reperfusión (Figura 14). Esta mejoría seguramente está asociada con la menor área de infarto que se observa en los animales tratados con ambos extractos.

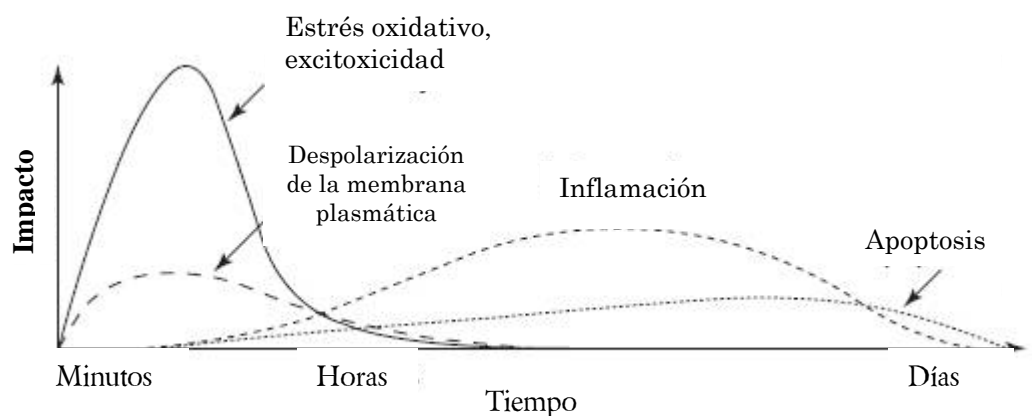
Como era de esperarse en este tipo de pruebas, existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos (Figura 14), indicando que cada animal reacciona de manera diferente al tratamiento empleado. Algo similar ocurre con los pacientes, algunos individuos reaccionan favorablemente mientras que en otros el tratamiento puede no ser eficaz.



**Figura 14.** Resultados obtenidos en la evaluación de la conducta. \*P<0.05 vs 2I/2R.

El sorprendente efecto protector que se observa cuando el EAE se administra al inicio y el MANG 1 h después sugiere que los antioxidantes del EAE podrían estar atrapando los radicales libres que se generan durante la isquemia y la reperfusión, evitando de esta manera la inactivación de los sistemas antioxidantes enzimático (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) y no enzimático (glutatión, vitamina C y E) [101].

Por otro lado, las xantonas del MANG podrían estar actuando en otro de los procesos que se activan tardíamente durante la isquemia cerebral, como el proceso inflamatorio o la apoptosis (Figura 15).



**Figura 15.** Cascada de eventos que se activan en la isquemia cerebral focal. Tomada de [6].

Lo anterior se sugiere ya que se ha reportado el efecto anti-inflamatorio de la  $\alpha$ -mangostina [85, 89],  $\gamma$ -mangostina [75, 85–87, 101, 102], garcinona B [88] y el anti-apoptótico de la  $\alpha$ -mangostina [103] de algunas xantonas del MANG.

Aunque las propiedades anti-inflamatorias de las xantonas del MANG aún no están muy claras, se ha encontrado que la  $\gamma$ -mangostina inhibe la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible, así como la

producción de óxido nítrico [101, 102]. Se sabe que el óxido nítrico juega un papel importante en la fisiopatología de la isquemia cerebral [104–107]. También, se ha reportado que la  $\gamma$ -mangostina inhibe la expresión de la COX-2 [85–87, 102] y la síntesis de prostaglandina-E2 (PGE-2) [85, 86, 101, 102], eventos asociados con el proceso inflamatorio. Por otro lado, se ha reportado que la  $\alpha$ -mangostina inhibe la actividad de las caspasas-3, un marcador de apoptosis [103].

Sin embargo, las propiedades anti-inflamatorias del MANG aún deben estudiarse en este modelo. Actualmente, se está evaluando el efecto de la terapia combinada sobre los siguientes índices de estrés oxidativo: 1) niveles de 3-nitrotirosina y de 4-hidroxinonenal y 2) actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Adicionalmente, se está evaluando el efecto de la terapia combinada sobre los siguientes índices de inflamación: 1) niveles de prostaglandinas en plasma, 2) niveles de TNF- $\alpha$ , y 3) cantidad de proteína de la sintasa de óxido nítrico inducible y de la COX-2.

## **VII. Conclusión**

- ✓ La administración de un solo agente (EAE o MANG) no previene la aparición del área de infarto. Sin embargo, la administración combinada del EAE y del MANG es una alternativa eficaz para disminuir el daño cerebral y las alteraciones conductuales, inducidas por la isquemia-reperfusión

## VIII. Bibliografía

- [1] Bémour C, Ste-Marie L, Montgomery J. 2007. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. *Neurochem Int* 50:890-904
- [2] Alcaraz-Zubeldia M, Rios CC. Isquemia cerebral. 2004. Temas selectos de neurociencias III. UAM:1-11
- [3] Pulsinelli W. 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533-536
- [4] Back T. 1998. Pathophysiology of the ischemic penumbra-revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 18:621-638
- [5] Massieu L. 1999. Muerte por isquemia y anoxia. En: Enfermedades neurodegenerativas mecanismos moleculares. Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R (eds). Fondo de Cultura Económica. México D.F:64-92
- [6] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397
- [7] Margail I, Plotkine M, Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39:429-443
- [8] Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 453:1369-1374
- [9] Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. 1988a. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 51:1455-1464
- [10] Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. 1988b. Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. *Neurosci Lett* 91:36-40
- [11] Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568
- [12] Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. 1999. Lipid metabolism in ischemic neuronal death. *Recent Res Dev Neurochem* 2:533-549

- [13] Phillis JW, O'Regan MH. 2003. The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit Rev Neurobiol* 15:61-90
- [14] Adibhatla RM, Hatcher JF. 2006. Phospholipase A<sub>2</sub>, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 40:376-387
- [15] Rao AM, Hatcher JF, Kindy MS, Dempsey RJ. 1999. Arachidonic acid and leukotriene C<sub>4</sub>: role in transient cerebral ischemia of gerbils. *Neurochem Res* 24:1225-1232
- [16] Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carriero DL, Lynch G. 1995. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:969-979
- [17] Buki A, Koizumi H, Povlishock JT. 1999a. Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Exp Neurol* 159:319-328
- [18] Buki A, Siman R, Trojanowski JQ, Povlishock JT. 1999b. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:365-375
- [19] Hong SC, Lanzino G, Goto Y, Kang K, Schottler F, Kassell NF, Lee KS. 1994. Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brian Res* 661:43-50
- [20] Kampfl A, Posmantur RM, Zhao X, Schmutzhard E, Clifton GL, Hayes RL. 1997. Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: Implications for pathology and therapy: A review and update. *J Neurotrauma* 14:121-134
- [21] Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, Hayes RL. 1997. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 77:875-888
- [22] Saatman KE, Bozyczko-Coyne D, Marcy V, Siman R, McIntosh TK. 1996. Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:850-860
- [23] Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico Vol XXVI*:19-54

- [24] Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162
- [25] Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322
- [26] 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
- [27] Borek C. 2001. Antioxidants health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131:1010S-1015S
- [28] Lledias F, Hansberg W. 2000. Catalase modification as a marker for a singlet oxygen. *Methods enzymol* 319:110-119
- [29] Mates JM, Perez-Gomez C, Nuñez De Castro I. 2002. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem* 32:595-603
- [30] Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043-1046
- [31] Sas K, Robotka H, Toldo J, Vécsei L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurological Sci* 275:221-239
- [32] Ginnan R, Guikema BJ, Halligan KE, Singer HA, Jourdeuil D. 2008. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. *Free Radic Biol Med* 44:1232-1245
- [33] Del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10:95-112
- [34] Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:471-479
- [35] Nordberg J, Arner E. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31:1287-1312
- [36] Acker T, Acker H. 2004. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological Implications. *J Exp Biol* 207:3171-3188



- [37] Russell JW, Golovoy D. 2002. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons *FASEB J* 16:1738-1748
- [38] Nagata M. 2005. Inflammatory cell and oxygen radicals. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:503-504
- [39] Alexandrova ML, Bochev PG. 2005. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic Biol Med* 39:297-316
- [40] Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Jeon SE, Choe MA, Park KC. 2004. Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res Dev Brain Res* 152:11-18
- [41] Lerouet D, Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. 2002. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 958:166-175
- [42] Toyoda T, Lee KS. 1997. Differential induction of superoxide dismutase in core and penumbra regions after transient focal ischemia in the rat neocortex. *Neurosci Lett* 235:29-32
- [43] 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
- [44] Bochsler PN, Slauson DO. 2002. Inflammation and repair of tissue. In: *Mechanisms of disease. A textbook of comparative general pathology*. Slauson DO, Cooper BJ (eds). Mosby. St. Louis, MO, USA:141-245
- [45] Vajdovich P. 2008. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *Vet Clin Small Anim* 38:31-123
- [46] Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W. 2004. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 35:1147-1152
- [47] Lindsberg PJ, Grau AJ. 2003. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 34:2518–2532
- [48] Strauss K. 2008. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX-2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behav Immun* 22:285-298

- [49] Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, Del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ. 2003. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol* 139:93-101
- [50] Schultzberg M, Lindberg C. 2007. Inflammation in the nervous system—physiological and pathophysiological aspects. *Physiol Behav* 92:121-128
- [51] Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. 1978. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 9:445-447
- [52] 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
- [53] López LM. 2007. El ajo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM* 26:78-81
- [54] Sato T, Miyata G. 2000. The nutraceutical benefit, part IV: Garlic. *Nutrition* 16:787-788
- [55] 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
- [56] Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr* 131:955S-962S
- [57] Yoshida S, Hirao Y, Nakagawa S. 1984. Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic. *J Toxicol Sci* 9:77-86
- [58] 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
- [59] Takasu J, Uykim pang R, Sunga MA, Amagase H, Niihara Y. 2002. Aged garlic extract therapy for sickle cell anemia patients. *BMC Blood Disord* 2:1-4
- [60] 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

- [61] Aged garlic extract. 2006. Research excerpts from peer reviewed scientific journals & scientific meetings. Wakunaga of America Co., LTD. Mission Viejo, CA, USA:1,45
- [62] 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
- [63] Lawson LD. 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: *Garlic. The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and related species*. Koch HP, Lawson LD (eds). Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA:37-107
- [64] Allison GL, Lowe GM, Rahman K. 2006. Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. *J Nutr* 136:782S-788S
- [65] Weinberg DS, Mainer ML, Richardson MD, Haibach FG. 1993. Identification and quantification of organosulfur compliance markers in garlic extract. *J Agric Food Chem* 41:37-41
- [66] 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
- [67] Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H. 1988. Prevention of liver damage by aged garlic extract and its components in mice. *Phytotherapy Research* 1:1-4
- [68] Kojima R, Toyama Y, Ohnishi ST. 1994. Protective effects of an aged garlic extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutr Cancer* 22:163-173
- [69] Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 73:2543-2556
- [70] 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
- [71] Jung HÁ, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn D. 2006. Antioxidant xanthenes from pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 54:2077-2082

- [72] Mahabusarakam W, Wiriyachitra P, Phongpaichit S. 1986. Antimicrobial activities of chemical constituents from *G mangostana* Linn. Journal of the Science Society of Thailand 12:239-242
- [73] Garnett M, Sturton SD. 1932. *Garcinia Mangoustana* in the treatment of amoebic dysentery. Chinese Medical Journal XLVI:969-973
- [74] Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. 1956. Glossary of Indian medicinal plants. The National Institute of Science Communication and Information resources. Nueva Dehli, India:123
- [75] Govindachari TR, Kalyanaram PS, Muthukumaraswamy N, Pai BR. 1971. Xanthones of *Garcinia mangostana* Linn. Tetrahedron 27:3919-3926
- [76] Peres V, Tagem TJ, de Oliveira FF. 2000. Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. Phytochemistry 55:683-710
- [77] Sultanbawa MU. 1980. Xanthonoids of tropical plants. Tetrahedron 36:1465-1506
- [78] Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N, Suksamrarn A. 2006. Cytotoxic prenylated xanthones from the young fruit of *Garcinia mangostana*. Chem Pharm Bull 54:301-305
- [79] Yoshikawa M, Harada E, Miki A, Tsukamoto K, Liang SQ, Yamahara J, Murakami N. 1994. Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L) originating in Vietnam. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 114:129-133
- [80] Leong L, Shui G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry 76:69-75
- [81] Garcia VV, Magpantay TO, Escobin LD. 2005. Antioxidant potential of selected Philippine vegetables and fruits. The Philippine Agricultural Scientist 88:78-83
- [82] Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L. 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. Free Radic Res 23:175-184
- [83] Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Croft K. 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthones derived from mangostin. Free Radic Res 33:643-659

- [84] Moongkarndi P, Kosem N, Kaslunga S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. 2004. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 90:161-166
- [85] Nakatani K, Atsumi M, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Nakahata N, Ohizumi Y. 2002a. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. *Biol Pharm Bull* 25:1137-1141
- [86] Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y. 2002b. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by  $\gamma$ -mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem Pharmacol* 63:73-79
- [87] Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Inoue H, Ohizumi Y. 2004.  $\gamma$ -Mangostin inhibits inhibitor-kappaB kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *Mol Pharmacol* 3:667-674
- [88] Yamakuni T, Aoki K, Nakatani K, Kondo N, Oku H, Ishiguro K, Ohizumi Y. 2006. Garcinone B reduces prostaglandin E<sub>2</sub> release and NF- $\kappa$ B-mediated transcription in C6 rat glioma cells. *Neurosci Lett* 394:206-210
- [89] Shankaranarayan D, Gopalakrishnan C, Kameswaran L. 1979. Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 239:257-269
- [90] Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S, Ohizumi Y. 1996. Histaminergic and serotonergic receptor blocking substances from the medicinal plant *Garcinia mangostana*. *Planta Med* 62:471-472
- [91] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91
- [92] Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. 1999. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31:100-106
- [93] Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. 2000. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 104:99-109
- [94] Preston E, Webster J. 2000. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. *J Neurosci Methods* 94:187-192

- [95] 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
- [96] Yan CK, Zeng FD. 2004. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in Rats. *Asian J Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 5: 61-69
- [97] 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
- [98] 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
- [99] Suryawanshi S, Asthana RK, Gupta RC. 2007. Simultaneous estimation of mangiferin and four secoiridoid glycosides in rat plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study of herbal preparation. *Journal of Chromatography B*, 858:211–219.
- [100] White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences* 179:1–33
- [101] Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Ortiz-Plata A, León-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, Villeda-Hernández J, Sánchez-García A, Maldonado PD. 2009. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model: likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine*.
- [102] Chen LG, Yang LL, Wang CC. 2008. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem Toxicol* 46:688-693
- [103] Tewtrakul S, Wattanapiromsakul C, Mahabusarakam W. 2008. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol* 121:379-382
- [104] Nakagawa Y, Linuma M, Naoe T, Nozawa Y, Akao Y. 2007. Characterized mechanism of alpha-mangostin-induced cell death: caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 15:5620-5628

- [105] Ashwal S, Tone B, Tian HR, Cole DJ, Pearse WJ. 1998. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 29:1037-1046
- [106] Dalkara T, Moskowitz MA. 1994. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain-Pathol* 4:49-57
- [107] Iadecola C. 1997. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20:132-139
- [108] Stagliano NE, Dietrich WD, Prado R, Green EJ, Busto R. 1997. The role of nitric oxide in the pathophysiology of thromboembolic stroke in the rat. *Brain Res* 759:32-40