



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL DIALIL DISULFURO SOBRE EL DAÑO CEREBRAL
ISQUÉMICO. PAPEL DEL FACTOR Nrf2**

TESIS EXPERIMENTAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RODOLFO LUIS CHÁVEZ DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D.F.

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profesor: Dr. Blas Lotina Hensen
VOCAL	Profesor: Dra. Raquel Ortega Muñoz
SECRETARIO	Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
SUPLENTE 1	Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri
SUPLENTE 2	Profesor: Dr José Ignacio Paramo Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Patología Vasculiar Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT 103527

Se agradece a la Fundación Amstrong por la beca otorgada al alumno durante el periodo de ENE a JUL del 2012

Se agradece a la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por la beca Probei (Programa de Becas de Inicio a la Investigación) otorgada al alumno durante el periodo de AGO 2012 a JUL 2013

ASESOR DEL TEMA

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SUSTENTANTE

Rodolfo Luis Chávez Domínguez

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	
1. Definición	3
2. Etiología	3
3. Epidemiología	5
3.1 Mortalidad	5
3.2 Distribución mundial	6
3.3 Factores de predisposición	7
4. Fisiopatología	10
4.1 Desbalance iónico y déficit energético	12
4.2 Excitotoxicidad	13
4.3 Incremento en los niveles de Ca ²⁺	16
4.4 Estrés oxidante	17
4.5 Muerte celular	22
5. Mecanismos antioxidantes	24
6. Dialil disulfuro (DADS)	28
7. Activación del factor Nrf2	30
Justificación	34
Hipótesis	36
Objetivos	37
Metodología	38
1. Reactivos	38
2. Animales	38
3. Diseño experimental	38
4. Inducción de la isquemia cerebral	41
5. Conducta	41
6. Histología	42
7. Preparación de los extractos nucleares	43
8. Activación de Nrf2 por ELISA	43
9. Actividad enzimática	44
10. Cuantificación de los niveles de GSH	47
11. Análisis estadístico	48

Resultados	49
1. Selección de la dosis de DADS	49
2. Conducta	51
3. Activación del factor Nrf2	52
4. Actividad enzimática	52
5. Niveles de GSH	54
Discusión	56
Conclusión	60
Bibliografía	61

RESUMEN

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) se consideran como una de las principales causas de muerte a nivel mundial y como la primera causa de incapacidad en personas en edad productiva. En México, de acuerdo a un estudio realizado en 2010 por el INEGI [INEGI, 2010], los ACV ocuparon el sexto sitio en la lista de las principales causas de defunción en la población mexicana. Los ACV más frecuentes son los de tipo isquémico (85% de incidencia), que se producen como consecuencia de una disminución en la perfusión sanguínea al cerebro. Esto ocasiona la activación de diversos mecanismos de daño conocidos como cascada isquémica que culminan con la muerte de las células y por lo tanto en una lesión cerebral seria. En esta cascada, el estrés oxidante representa una de las principales causas de la muerte celular [Durukan y Tatlisumak, 2007].

Por ello, se ha propuesto el uso de antioxidantes como terapia que podría ayudar a salvar las células presentes en el área de penumbra. En este contexto, el dialil disulfuro (DADS) es un antioxidante directo (ya que atrapa especies reactivas por sí mismo) e indirecto (ya que induce la expresión de enzimas de fase 2 y antioxidantes encargadas de metabolizar especies reactivas y electrófilas), que ha mostrado un efecto protector en modelos donde el estrés oxidante está involucrado [Guyonnet et al., 1999; Gupta et al., 2003; Fukao et al., 2004]. Por esta razón, se ha propuesto como una posible alternativa terapéutica o preventiva para el infarto cerebral, ya que hasta el momento no existe una terapia efectiva y segura que disminuya el daño. En el presente trabajo se estudió el efecto del DADS sobre el daño inducido por la isquemia cerebral.

El DADS se administró (25, 50 y 75 mg/kg) al inicio de la reperusión para seleccionar la dosis que mostrara un efecto protector y no tóxico en el estriado. La dosis que cumplió con tales características fue la de 25 mg/kg ya que disminuyó los signos de daño morfológico como picnosis y edema citotóxico comparado con el grupo sometido a isquemia y reperusión (IR) y no mostró un efecto tóxico. El daño neurológico se evaluó mediante la aplicación de 5 pruebas motoras encontrando que la administración del DADS disminuyó el déficit neurológico y mejoró la coordinación motora de los animales.

Por otro lado la administración de DADS solo incrementó la activación del factor Nrf2 en corteza frontal a las 2 h después del inicio de la reperusión. Mientras que la IR no provocó cambios significativos en los niveles del factor Nrf2 comparado con el grupo CT.

El DADS solo incrementó la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRx) en la corteza frontal 24 h después su administración en comparación con el grupo CT; Los animales sometidos a IR no mostraron cambios significativos en la actividad de la enzima GRx comparado con el grupo CT; sin embargo, la actividad de la GPx disminuyó un 50%. El tratamiento con DADS previno parcialmente la disminución de la actividad de la GPx inducida por la IR.

El DADS incrementó la proporción de glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG) en la corteza ipsilateral a las 4 h de su administración en comparación con el grupo CT. En los animales del grupo IR esa proporción disminuyó un 40% con respecto al grupo CT. Finalmente, la proporción de GSH/GSSG se incrementó en el grupo de animales sometidos a IR con el tratamiento de DADS.

En conclusión, el DADS disminuyó los signos de daño histológico y neurológico cuando se administró en animales sometidos a isquemia cerebral. Además fue capaz de inducir la activación de defensas antioxidantes relacionadas con el metabolismo del glutatión, a través de la activación del factor de transcripción Nrf2.

INTRODUCCIÓN

1. Definición

El accidente cerebro vascular (ACV) se define como la aparición de un conjunto de signos clínicos que alteran de manera focal o global al cerebro; tienen una duración de 24 h o más progresando a la muerte del individuo y que independientemente de su causa su origen es vascular [Wong, 1999].

2. Etiología

De acuerdo a su etiología el ACV se clasifica en dos grupos (Figura 1): el accidente isquémico, representando un 85 % de todos los casos y la hemorragia intracerebral no traumática con una incidencia del 15 % [Maas y Safdieh, 2009].

Generalmente el accidente isquémico es producido por la aterotrombosis, el embolismo y la disminución en la perfusión sistémica. La hemorragia intracerebral no traumática se clasifica en dos grupos: hemorragia intracerebral caracterizada por un sangrado interno del cerebro y la hemorragia sub-aracnoidea que es un sangrado entre las capas internas y externas que recubren al cerebro localizándose en la región sub-araquinoidea [Grysiewicz et al., 2008].

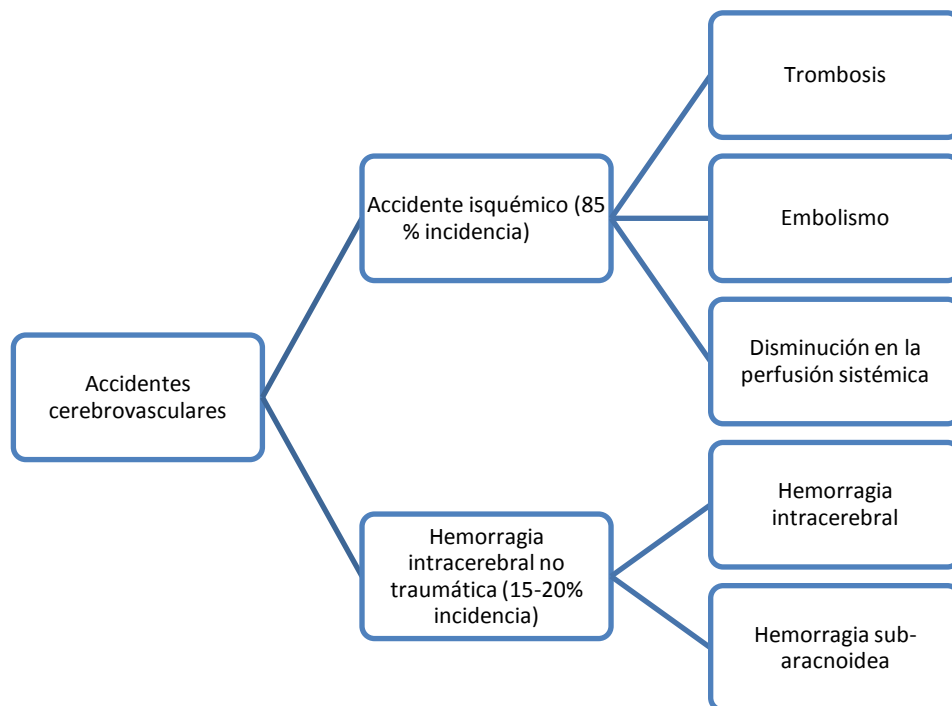


Figura 1. Clasificación de los accidentes cerebrovasculares de acuerdo a su etiología. Tomado de Caplan, 2009.

La trombosis *in situ* producida por placas de ateroma deriva en un accidente isquémico cuando hay un engrosamiento de las capas de tejido muscular y tejido fibroso, promoviendo la acumulación de material graso y la agrupación de plaquetas en la placa. La formación de este complejo de materiales favorece la deposición de trombina, fibrina y coágulos que finalmente ocluyen el flujo sanguíneo [Caplan, 2009]. A su vez, la trombosis *in situ* de las arterias que irrigan el tejido cerebral deriva en un accidente isquémico cuando alguna placa de ateroma se ulcera por mecanismos físicos, promoviendo la liberación de factores que promueven la formación de trombos como el factor tisular o el inhibidor del activador de plasminógeno [Maas y Safdieh, 2009]. También la trombosis puede ser iniciada por otras causas como la presencia de tumores, desordenes hematológicos y enfermedades autoinmunes como el púrpura trombótico trombocitopénico y la trombocitopenia mediada por heparina [Maas y Safdieh, 2009].

Otro mecanismo que promueve el accidente isquémico cerebral es el embolismo. Al igual que la trombosis *in situ*, el embolismo produce daño isquémico por deposición de material trombótico y no trombótico en alguna de las arterias que irrigan el cerebro. Generalmente el material ocluyente se produce en un órgano distante al cerebro siendo el corazón la principal fuente de material embólico. Las principales regiones en donde se producen estos materiales son las arterias carótida, aorta y vertebral, en donde cúmulos de plaquetas, coágulos o fragmentos de placas son bombeados al cerebro [Caplan, 2009].

Dependiendo del tamaño del material embólico será la arteria que puede ser ocluida. Émbolos de gran tamaño tienden a bloquear la circulación en arterias extracraneales como la carótida, la inominata, la subclava y las arterias vertebrales del cuello. Émbolos pequeños bloquean arterias intracraneales como las basílicas, la arteria carótida interna, las arterias cerebrales anteriores y principalmente la arteria cerebral media [Caplan, 2009].

Otro tipo de materiales embólicos como bacterias, partículas por administración de drogas, aire y células tumorales pueden alojarse en alguna de las arterias que irrigan al cerebro provocando un accidente isquémico [Mass y Safdieh, 2009].

Por otro lado, una disminución en la perfusión sistémica deriva en un accidente isquémico cuando existen desordenes a nivel cardíaco como la arritmia o el infarto agudo al miocardio o por una hipotensión sistémica, producida por hipovolemia y pérdida de sangre.

A diferencia del embolismo y la trombosis, la disminución en la perfusión sistémica tiende a producir una zona de daño más generalizada.

3. Epidemiología

Cada año alrededor de 795 000 personas sufren un accidente cerebrovascular, de los cuales aproximadamente 610 000 son ataques presentados por primera vez y 185 000 son ataques recurrentes [Jones et al., 2010].

Con respecto al sexo, los hombres jóvenes se encuentran con mayor riesgo de presentar un ACV; sin embargo, con la edad las mujeres tienen una mayor predisposición [Jones et al., 2010].

El riesgo de presentar un ACV varía de acuerdo a la causa, es decir, si se trata de un accidente isquémico o de una hemorragia intracerebral no traumática. Con respecto al accidente isquémico el riesgo de presentar un evento después de 7 días, 30 días, 1 año y 5 años es del 2%, 4%, 12% y 29%, respectivamente. De acuerdo al mecanismo por el cual se genera el accidente isquémico, el riesgo de presentar un evento posterior al primer evento durante los primeros días es de 18.5% por aterotrombosis, 5.3% por embolismo y 3.3% por causas desconocidas [Grysiewicz et al., 2008]. Con respecto a la hemorragia intracerebral no traumática el riesgo de presentar un evento durante los primeros 30 días después del primer evento es bajo, debido a la alta mortalidad durante este periodo de tiempo.

A su vez el ACV es considerado como una de las principales causas de discapacidad en países industrializados como Estados Unidos. Con base en los estudios realizados por The Framingham Heart Study (FHS) en 2003, las personas mayores de 65 años que han sufrido un ACV presentan distintos signos de discapacidad a los 6 meses del primer ataque, entre los cuales figuran síndromes neurológicos como la hemiparesis, la afasia, la dificultad para hablar, problemas cognitivos, déficits sensoriales y la hemianopsia [Roger, 2012; Hayes et al., 2003].

3.1 Mortalidad

La mortalidad de los accidentes cerebrovasculares de acuerdo a las estadísticas emitidas por la Organización Mundial de la Salud en 2002 y con proyecciones al año 2030 representa un 9.7 y un 10.3% dentro de las principales causas de defunción a nivel mundial [Mathers y Loncar, 2002]. En el año 2005 representó el 10% del total de las

causas de muerte a nivel mundial y se consideró como la segunda causa de muerte en todo el mundo, solo por debajo de las enfermedades isquémicas del corazón [Grysiewicz et al., 2008; Dichangs, 2007].

El riesgo de morir después de un evento isquémico se ve incrementado conforme transcurre el tiempo, de manera que la mortalidad se encuentra incrementada 5 años después de sufrir el primer accidente isquémico. De acuerdo a los reportes del Proyecto Epidemiológico Rochester, el riesgo de morir 5 años después de primer evento isquémico varía de acuerdo al subtipo, siendo el embolismo el mecanismo que presenta la tasa de mortalidad más alta pues de todos los sujetos afectados por embolismo el 80.4% muere, siguiendo el infarto lacunar o de vasos pequeños con un 35.1% y la trombosis con una mortalidad de 32.2% [Grysiewicz et al., 2008]

En México, de acuerdo a los resultados emitidos por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) en el año 2010, los ACV se situaron en el sexto sitio de las principales causas de muerte (Figura 2).

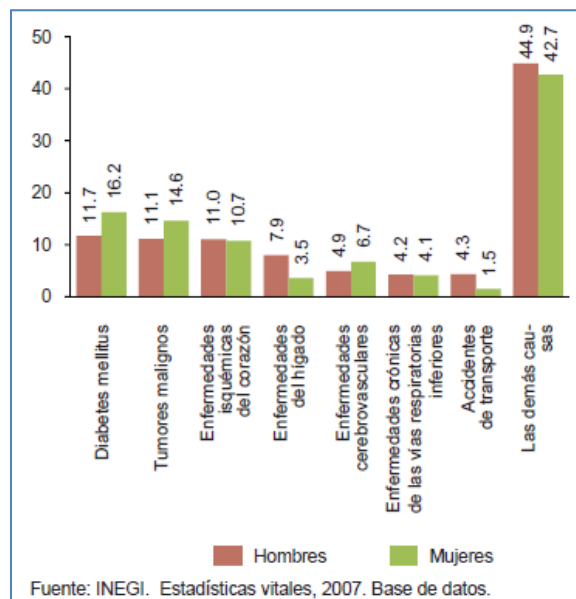


Figura 2. Estadísticas de las principales causas de muerte en hombres y mujeres en México durante 2007.

Fuente INEGI, 2010.

3.2 Distribución mundial

Los ACV presentan una distribución mundial variada, siendo la región de Europa del este y los continentes asiático y africano en donde se presentan con una alta incidencia y mortalidad de 151-251 casos por cada 100 000 habitantes. Por el contrario, en la región oeste de Europa y el continente americano la incidencia y mortalidad son menores con un total de 24.5-50.0 casos por cada 100 000 habitantes [Claiborne et al., 2009] (Figura 3).

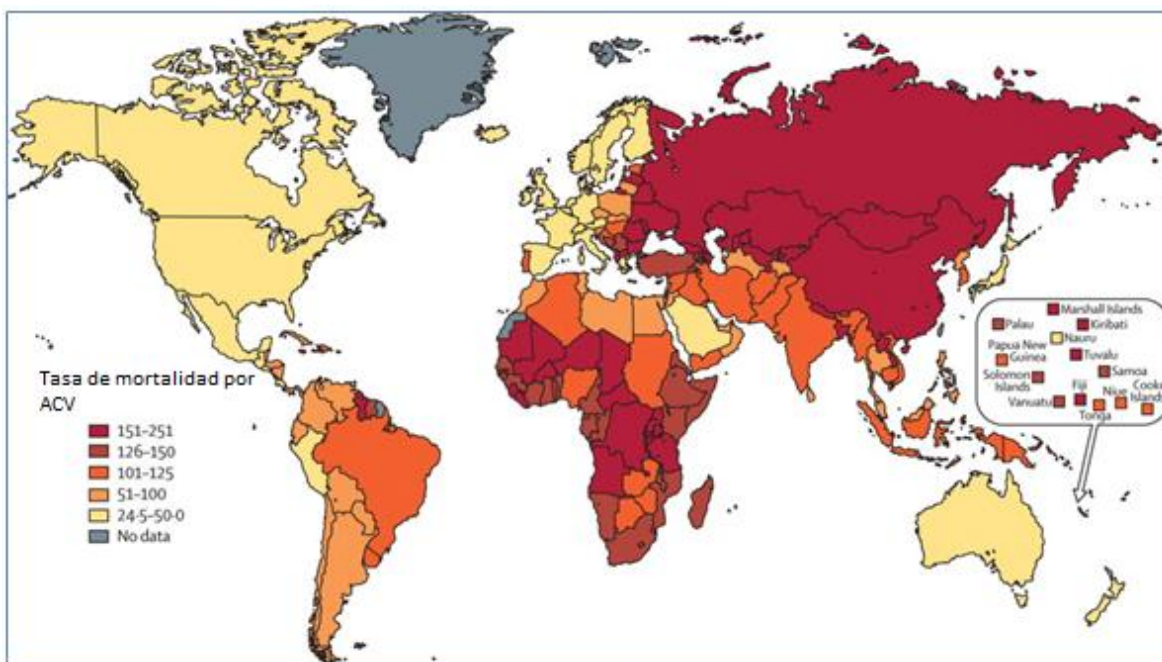


Figura 3. Razón de incidencia y mortalidad del ACV a nivel mundial (Tomada de Clairbone et al., 2009).

3.3 Factores de predisposición

Con base en los estudios epidemiológicos realizados por distintas entidades, los factores de riesgo asociados a los ACV pueden ser clasificados en factores que no pueden ser modificados como el sexo, la raza o la genética del individuo y en factores que pueden ser modificados como factores ambientales, el consumo de alcohol, el tabaquismo, el control de la Diabetes, el control de la presión sanguínea y el estilo de vida [Kirshner, 2009].

3.3.1 Factores susceptibles a ser modificados

3.3.1.1 Tabaquismo

Se sabe que el tabaquismo es uno de los factores de riesgo que incrementa las posibilidades de presentar un accidente isquémico debido a los componentes del cigarrillo, los cuales al llegar al cerebro producen una vasoconstricción de las arterias que lo irrigan favoreciendo el proceso patológico, o bien induciendo la formación de trombos [Kirshner, 2009].

Los fumadores jóvenes se encuentran más predispuestos a sufrir un accidente isquémico que los fumadores adultos pues los riesgos relativos estimados son de 2.9 y de 1.8, respectivamente. De la misma forma los exfumadores y los fumadores pasivos también presentan cierto riesgo a sufrir un accidente isquémico debido a la exposición al humo del tabaco presente en el medio ambiente [Grysiewicz et al., 2008].

3.3.1.2 Alcoholismo

El consumo de alcohol puede ser considerado como un factor de riesgo dependiendo de la cantidad de alcohol ingerido y de la frecuencia de consumo. Las personas que consumen una cantidad de alcohol mayor a 60g/día se encuentran mayormente predispuestas, al igual que los bebedores abstenidos. Por otro lado, las personas que consumen alcohol moderadamente presentan un bajo riesgo de sufrir un accidente isquémico debido al efecto que tiene el alcohol de incrementar los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), protegiendo al organismo de sufrir una enfermedad arterial coronaria [Kirshner, 2009].

3.3.1.3 Dislipidemia

La asociación entre las dislipidemias y el incremento en el riesgo de presentar un accidente isquémico se encuentra relacionada con presentar bajos niveles de HDL, altos niveles de colesterol, altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y altos niveles en LDL [Kirshner, 2009].

Sin embargo se ha encontrado que el uso de medicamentos como la atorvastatina reduce el riesgo de presentar un ACV en un 16% posterior a los 5 años de presentar el primer evento [Amarenco et al., 2006].

3.3.1.4 Hipertensión

La hipertensión juega un papel muy importante como factor de riesgo ya que se ha encontrado que una presión sistólica por debajo de los 115 mmHg incrementa el riesgo de presentar un accidente isquémico. Por otro lado, el presentar incrementos de 20 mmHg en la presión sistólica, está asociado con un incremento al doble en la mortalidad por accidente isquémico. Esto se debe a que la hipertensión acelera el proceso de la aterosclerosis [Grysiewicz et al., 2008].

3.3.1.5 Diabetes

Hasta el momento se ha estimado que el 40% de todos los accidentes isquémicos se encuentran relacionados con los efectos de la diabetes sola o en combinación con otra enfermedad [Grysiewicz et al., 2008].

Las personas que padecen diabetes se encuentran ante un alto riesgo de sufrir un accidente isquémico debido a la persistencia de otros factores de riesgo como la hipertensión, la obesidad y el colesterol elevado. Un mal control de la enfermedad puede estar asociado a la persistencia de estos factores de riesgo de la misma manera que un control excesivo de la glicemia puede aumentar la mortalidad [Kirshner, 2009].

3.3.2 Factores no susceptibles a ser modificados

3.3.2.1 Raza

La prevalencia de sufrir un ACV varía de acuerdo a la raza y de acuerdo al subtipo del accidente.

Estudios realizados en diferentes poblaciones revelan que los asiáticos son la raza más predispuesta a sufrir un accidente isquémico lacunar con respecto a los caucásicos. Por otro lado, los hispanos y los afroamericanos muestran una tendencia a desarrollar los otros subtipos de accidente isquémico [Kirshner, 2009].

3.3.2.2 Factores genéticos

Dentro de los factores genéticos que predisponen a una persona a sufrir un ACV se han descubierto que mutaciones en un solo gen favorecen el desarrollo de la enfermedad y también la aparición de otros cuadros clínicos a nivel sistémico. Sin embargo, se ha demostrado que el ACV es una patología que parece seguir una herencia multifactorial en donde los factores inherentes al individuo y el ambiente favorecen el proceso patológico [Alrajeh y Alkali, 2008].

De los genes que tienen un efecto individual son:

- *NOTCH3*. Este gen codifica para un receptor de membrana que participa en la transducción de señales y el desarrollo de las arterias. La mayoría de las mutaciones presentes en el gen son mutaciones sin sentido en los exones 3 y 6 del gen. La condición clínica asociada a mutaciones en este gen es una microangiopatía conocida como arteropatía autosómica dominante con infartos suncorticales y leucoencefalopatía (CADASIL por sus siglas en inglés) caracterizada por episodios isquémicos [Dichangs, 2007].
- *GLA*. Este gen codifica para la α -galactosidasa A y mutaciones en este gen predisponen a sufrir la enfermedad de Fabry, caracterizada por tener un patrón de herencia ligado al cromosoma X. Las mutaciones en el gen *GLA* provocan que su producto carezca de actividad y haya una acumulación de glucoesfingolípidos, especialmente de globotriaosilceramida, en diferentes tejidos como el microradio, el epitelio, la piel, el ojo y la vasculatura, afectando por igual vasos sanguíneos grandes y pequeños [Dichangs, 2007].

- *CBS*. El gen de la cistationin beta sintetasa codifica para la enzima que se encarga de degradar la homocisteína, obtenida de la ingesta diaria de metionina; la cual a concentraciones sanguíneas mayores a 100 $\mu\text{mol/L}$ resulta ser toxica al provocar daño a las arterias y alterar el sistema de coagulación sanguínea, favoreciendo la formación de trombos [Dichangs, 2007].

Por otro lado, de los genes que se ha visto que tienen influencia en la herencia multifactorial se encuentran:

- *ALOX5AP*. Este gen codifica para la proteína activadora de la 5-lipooxigenasa, la cual hidroliza el ácido araquidónico en presencia de la enzima 5-lipooxigenasa. En algunas poblaciones como en Islandia se ha visto que el haplotipo HapA aumenta el riesgo de presentar un accidente isquémico [Alrajeh y Alkali, 2008].
- *PDE4D*. Polimorfismos en el gen que codifica para la fosfodiesterasa 4D en poblaciones de Islandia, Estados Unidos de América, Reino Unido y Alemania se han asociado como factores de riesgo genéticos para sufrir un accidente isquémico [Alrajeh y Alkali, 2008].
- *ACE*. Polimorfismos del gen que codifica para la enzima convertidora de angiotensina se han asociado como factores de riesgo para sufrir un accidente isquémico por aterotrombosis. Individuos homocigotos para el alelo D/D presentan una actividad enzimática incrementada y esto se ha relacionado con un incremento en el riesgo relativo de presentar un accidente isquémico comparado con individuos heterocigotos I/D u homocigotos I/I [Alrajeh y Alkali, 2008].
- *EPHX*. El polimorfismo *EPHX2* en el gen de la epóxido hidrolasa se ha asociado a un incremento en el riesgo de presentar un accidente isquémico de acuerdo a estudios realizados en poblaciones alemanas y estadounidenses [Alrajeh y Alkali, 2008].

4. Fisiopatología

La isquemia se define como una disminución en el flujo sanguíneo cerebral (CBF por sus siglas en inglés) lo suficiente para alterar la función cerebral [Smith, 2004]. Como una consecuencia de la disminución del CBF, en los accidentes isquémicos focales se producen dos zonas de daño celular y tisular (Figura 4). La zona central de daño, conocida como núcleo o “core”, que se caracteriza por ser una región en donde el CBF disminuye a valores menores del 20% del basal o normal y existe una marcada reducción

en los niveles de ATP menores al 25% de su valor normal [Sims y Muyderman, 2010]. La región circundante al núcleo, la penumbra, se caracteriza por conservar un CBF entre un 20 y 40 % de su valor normal, es una zona en donde se metaboliza glucosa activamente y además los niveles de ATP se preservan por arriba de un 65% [Smith, 2004; Lo et al., 2003; Sims y Muyderman, 2010].

Los mecanismos de muerte celular en ambas regiones tienden a traslaparse, por un lado las poblaciones celulares presentes en el núcleo tienden a morir con mayor rapidez y en su mayoría por necrosis, mientras que las células de la penumbra pueden morir de manera más lenta por necrosis o apoptosis, predominando más la apoptosis [Lo et al., 2003].

Actualmente, se ha demostrado que sí las condiciones fisiológicas y bioquímicas no se restablecen en la zona de penumbra, entonces es posible que esta se convierta en parte de la zona del núcleo y por tanto incrementa el área de daño. Por ello, se ha propuesto que se utilicen diversos compuestos que ayuden a proteger y salvar a las células presentes en esta región de manera que se puedan atenuar los signos y síntomas como la incapacidad motora y la hemiplejía [Green, 2003].

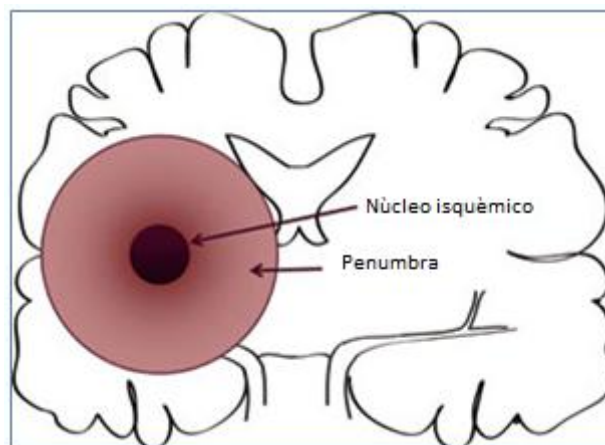


Figura 4. Zonas de daño causadas por el accidente isquémico en el cerebro, en el centro de la lesión se localiza el núcleo isquémico y alrededor la penumbra. Tomada de Coultrap et al., 2011..

Los mecanismos de daño celular y tisular que se generan durante el accidente isquémico se han podido caracterizar, notándose que estos eventos se desarrollan en una manera casi secuencial que se ha denominado “cascada isquémica” [Durukan y Tatlisumak, 2007]; sin embargo, es posible que en algún punto del proceso patológico estos eventos se traslapen. Los principales mecanismos de daño celular y tisular asociados al accidente

isquémico son: el desbalance iónico, el déficit energético, la excitotoxicidad, el aumento en los niveles intracelulares de calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs) y la disfunción mitocondrial. A continuación se detallarán cada uno de los mecanismos.

4.1 Desbalance iónico y déficit energético

El cerebro, es uno de los órganos que requiere de una mayor demanda energética en el organismo, ya que consume el 20% del oxígeno en circulación y el 25% de la glucosa [Mass y Safdieh, 2009] y obtiene energía del metabolismo de la glucosa presente en la sangre. El 70% de la energía que es consumida en el cerebro se utiliza para mantener la homeostasis iónica de los cationes Na^+ y K^+ a través de la ATPasa de Na^+/K^+ por lo que una reducción en los niveles de glucosa y oxígeno en el tejido derivan en una falla energética provocando daño celular y tisular [Mongin, 2007].

Durante las condiciones de hipoxia/anoxia e hipoglicemia en el accidente isquémico existe una disminución en la cantidad de glucosa que es metabolizada por las células del cerebro. Como este tejido no cuenta con un almacén de glucosa, es posible que se comiencen a acumular productos ácidos provenientes del metabolismo anaerobio de la misma célula y de los astrocitos. La acumulación de productos ácidos disminuye el pH intracelular interfiriendo con la cadena transportadora de electrones en la mitocondria disminuyendo así la producción de ATP. Esta disminución de ATP conlleva a que los transportadores de iones dependientes de esta molécula se inviertan. Por ejemplo, la ATPasa de Na^+/K^+ invierte su transporte provocando que haya una acumulación de Na^+ intracelular y de K^+ extracelular, se favorece también la acumulación de Ca^{2+} debido a una disminución en la actividad transportadora de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ [Smith, 2004; Durukan y Tatlisumak, 2007]. Otro transportador que también se ve afectado ante esta disminución de ATP es el transportador NCX el cual es un antiportador bilateral que se encarga de expulsar el Ca^{2+} ante la entrada de 3 Na^+ ; sin embargo su actividad se ve revertida ante estas condiciones permitiendo la acumulación de Ca^{2+} citosólico. Además, existe otro tipo de transportadores que se ven afectados durante el accidente isquémico como las uniones gap de las neuronas, los canales aniónicos regulados por volumen (VRACs) y los canales sensores de acidez [Besancon et al., 2008]. La entrada de estos cationes se ve acompañada por la entrada de aniones como Cl^- y la acumulación de H_2O en la célula provocando que ésta se hinche y presente rasgos de edema citotóxico.

La alteración en el transporte de iones en la célula promueve que esta se comience a despolarizar hasta que alcanza su umbral eléctrico de excitación, proceso que consume aún más energía, favorece la activación de canales de Ca^{2+} y Na^{+} dependientes de voltaje y favorece que el transporte de neurotransmisores excitadores se vea revertido por la activación de procesos como la exocitosis y la liberación de vesículas dependientes de Ca^{2+} [Mongin, 2007; Nishizawa, 2001]

4.2 Excitotoxicidad

4.2.1 Glutamato

El glutamato se considera como el principal aminoácido y neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central por excelencia. Cumple con las 3 características propuestas por Purves [2001] para ser considerado como un neurotransmisor por tener una localización presináptica, ser liberado ante una despolarización presináptica dependiente de Ca^{2+} y tener receptores en la célula postsináptica. El glutamato de manera normal se caracteriza por desarrollar un papel muy importante en procesos fisiológicos mayores como el desarrollo del aprendizaje, la memoria y la plasticidad sináptica [Mehta et al., 2013]; además de intervenir en el desarrollo del sistema nervioso, la diferenciación celular, la muerte celular y la migración celular en las primeras etapas [Danbolt, 2001].

El glutamato es sintetizado en la célula a partir de la glutamina y el α -cetoglutarato. La glutamina es ingresada a la célula a través de una proteína transportadora dependiente de Na^{+} . Posteriormente la glutamina se transloca a la mitocondria en donde es convertida a glutamato por acción de la enzima glutaminasa [Platt, 2007]. El α -cetoglutarato proviene de dos distintas fuentes, una es del ciclo de Krebs y la otra es la captura desde el espacio sináptico. El α -cetoglutarato es transaminado por acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, produciendo glutamato [Platt, 2007].

El mecanismo de acción del glutamato se relaciona con la activación de sus receptores en la membrana plasmática de las neuronas. Estos receptores se clasifican en dos tipos comprendidos en tres familias. La primera clase son los receptores ionotrópicos, llamados así por ser canales permeables a cationes como el Na^{+} y el Ca^{2+} y dependiendo de su ligando agonista se clasifican en dos familias: los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) comprendidos por las isoformas NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D y los receptores de la familia de los ácidos α -amino-3 hidroxi-5 metil-4 isoxazol propiónico (AMPA) y kaínico comprendidos por las isoformas GluR 1-4 y GluR 5-9 y KA1 y KA2,

respectivamente. Los receptores AMPA tienen una baja afinidad pero un mecanismo de apertura rápido, por el contrario los receptores NMDA tienen una alta afinidad; sin embargo, su mecanismo de apertura es lento ya que se requiere una previa despolarización de la célula para liberar el ión Mg^{2+} que bloquea al canal [Danbolt, 2001]. La tercera familia está conformada por receptores metabotrópicos, acoplados a proteína G, la cual se subdivide en los grupos I (mGluR 1 y mGluR 5), II (mGluR 2 y mGluR 3) y III (mGluR 4, mGluR 6 y mGluR7). El grupo I se encuentra acoplado a la fosfolipasa C mientras los grupos II y III están negativamente acoplados a la adenilato ciclasa [Danbolt, 2001].

Para evitar que se acumule el glutamato en el espacio extracelular existen diferentes mecanismos celulares que se encargan de mantener a este aminoácido en concentraciones del orden de 5-10 mmol/Kg. Dentro de estos mecanismos figuran los transportadores dependientes de Na^+ presentes en diversas poblaciones celulares del cerebro, los cuales poseen grandes ventajas cinéticas, de afinidad y de expresión sobre transportadores independientes de Na^+ . Existen al menos 5 tipos de transportadores (EAAT1-EAAT5) los cuales son denominados transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT por sus siglas en inglés) y que se encuentran distribuidos en astrocitos (EAAT1, EAAT2), neuronas (EAAT3), células piramidales del hipocampo, corteza y neuronas GABAérgicas (EAAT3, EAAT4) y en la retina (EAAT5) [Arriza et al., 1997]. El modo en el que operan estos transportadores es mediante un simporte con 3 moléculas de Na^+ , 1 molécula de H^+ y 1 molécula de glutamato y un antiporte con 1 molécula de K^+ [Danbolt, 2001] (Figura 5).

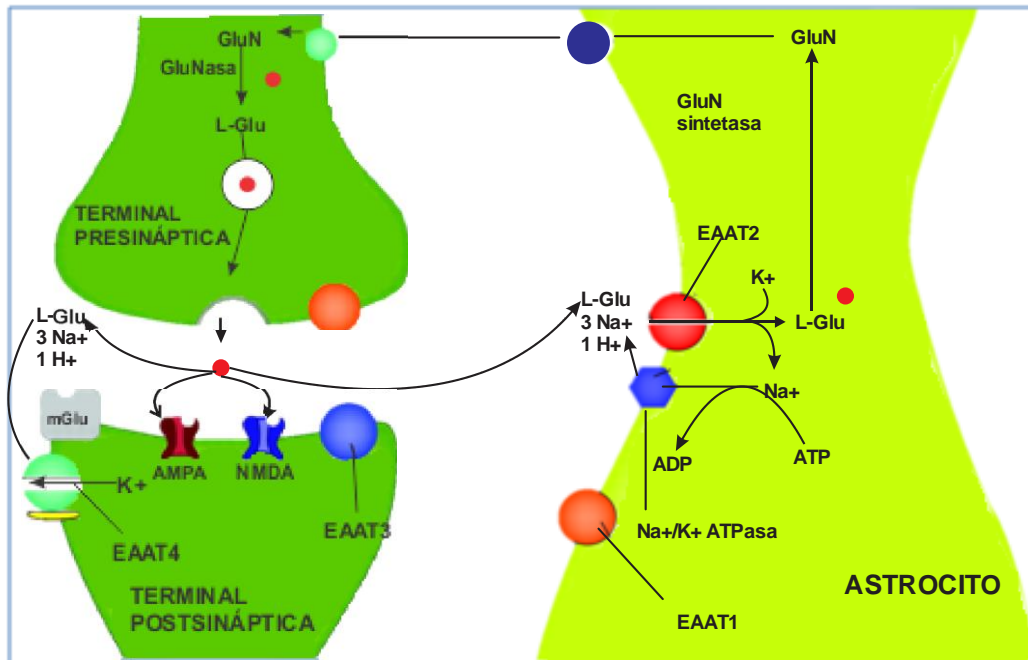


Figura 5. Transporte y metabolismo de glutamato entre las células del sistema nervioso central. Cuando el glutamato es liberado de la neurona presináptica, este puede unirse a sus receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos en la neurona post-sináptica o bien ser retirado del espacio sináptico por medio de los transportadores EAAT2 y EAAT4. El receptor EAAT2 introduce el glutamato a la célula utilizando la energía de la bomba Na^+/K^+ . Una vez que el glutamato se introduce a la célula puede ser metabolizado a su precursor, la glutamina o almacenarse en vesículas. Abreviaciones: GluN (glutamina), GluNasa (glutaminasa), GluN sintetasa (glutamina sintetasa), L-Glu (L-glutamato), mGlu (receptor metabotrópico de glutamato), EAAT (transportador de aminoácidos excitadores), AMPA (ácido α -amino 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y NMDA (N-metil D-aspartato). Tomada y modificada de Benarroch, 2010.

4.2.2 Daño por exceso de glutamato

La excitotoxicidad se define como la aparición de efectos tóxicos en la célula después de que se ha prolongado la sobreactivación de los receptores de aminoácidos excitadores por una acumulación excesiva del glutamato en el espacio extracelular [Mehta et al., 2013; Lipton, 1999]. La excitotoxicidad es un evento que aparece en las primeras etapas de la disminución de la perfusión sanguínea en el accidente isquémico y conlleva a la aparición de eventos que contribuyen al daño celular [Dirnagl et al., 1999]

Durante las primeras etapas de anoxia/hipoxia y de hipoglicemia la liberación del glutamato hacia el espacio extracelular se favorece por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y por exocitosis [Lipton, 1999]. La prematura acumulación de Ca^{2+} acelera la liberación de vesículas que almacenan este neurotransmisor hacia el espacio extracelular. A su vez los niveles de ATP que se conservan inicialmente en el

accidente isquémico permiten que la exocitosis sea otro mecanismo por el cual el glutamato es liberado. Por otro lado, en etapas tardías del accidente isquémico la falla energética hace que la liberación del glutamato sea un proceso completamente independiente de Ca^{2+} , mediante la reversión de transportadores dependientes de Na^+ , los cuales han sido mencionados previamente [Nishizawa, 2001]. Este proceso se ve aún más favorecido porque no depende de la cantidad de ATP en la célula y utiliza solamente el gradiente iónico que se genera en las células.

La alteración en la expresión de los transportadores de glutamato en células CA1 del hipocampo se ha propuesto como un mecanismo potencial en la excitotoxicidad. Bruhn y colaboradores [2000] demostraron que en las primeras 24 h de reperfusión en ratas, existe una disminución en los niveles de mRNA de EAAT2 la cual persiste hasta 4 días después.

Para que el glutamato pueda ejercer su efecto en los receptores post-sinápticos del tipo NMDA es necesario que exista una previa despolarización de la célula, esta despolarización permite que el Mg^{2+} que bloquea el canal del receptor se libere, favoreciendo que los iones Ca^+ y Na^+ puedan entrar a la célula y que el K^+ sea expulsado cuando el receptor se activa por unión con el glutamato. Por otro lado, la activación de los receptores AMPA incrementa el flujo de iones Na^+ y K^+ dentro y fuera de la célula, respectivamente y como consecuencia se incrementa la entrada de Ca^{2+} , la cual es mediada por canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (VSCC por sus siglas en inglés) activando indirectamente a los receptores NMDA que aún permanecen bloqueados por Mg^{2+} [Dirnagl et al., 1999].

El resultado final de la activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos conduce a la elevación de los niveles citosólicos de Ca^{2+} , el cual puede participar en diferentes procesos que llevan a la muerte celular.

4.3 Incremento en los niveles de Ca^{2+}

El metabolismo del Ca^{2+} dentro de la célula es un proceso que se encuentra regulado principalmente por mecanismos que se encargan de introducirlo y expulsarlo; además de los encargados de secuestrarlo dentro de organelos celulares como el retículo endoplásmico y la mitocondria. De manera normal las concentraciones de Ca^{2+} libre en citosol y espacio extracelular son de $0.1 \mu\text{mol/L}$ y de $1000 \mu\text{mol/L}$, respectivamente. Sin

embargo, la concentración intracelular de Ca^{2+} es de $1000 \mu\text{mol/L}$, por lo que alrededor del 99% se encuentra unido a proteínas, fosfolípidos o almacenado en los calciosomas del retículo endoplásmico o secuestrado en la mitocondria [Kristián y Siesjö, 1997]. De esta manera la regulación en los niveles intracelulares de Ca^{2+} depende de antiportadores presentes a nivel de membrana citoplasmática como los receptores NCX y la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y de simportadoras presentes en las membranas de la mitocondria y del retículo endoplásmico como las proteínas LETM 1 y MCU1. Sin embargo, durante el accidente isquémico estos mecanismos se ven sobrepasados por los responsables de introducirlo al citosol o bien de liberarlo de los compartimentos intracelulares en donde se encuentra presente. Por ejemplo, canales dependientes de voltaje y los receptores ionotrópicos NMDA presentes a nivel de membrana, la reversión en la actividad de las bombas que se encargan de expulsarlo y de otros canales previamente discutidos [Besancon et al., 2008].

Dentro de los efectos que tiene el Ca^{2+} dentro de la célula se encuentran la activación de enzimas proteolíticas que degradan la actina, la espectrina y la laminina presente en la matriz extracelular. También se activan enzimas como la fosfolipasa A_2 provocando que exista un incremento en la producción de ERO y por consiguiente daño en las estructuras celulares que conducen a la muerte celular [Dirnagl et al., 1999].

4.4 Estrés oxidante

El estrés oxidante es el estado de desbalance entre la producción de radicales libres, particularmente las ERO y la capacidad del organismo de defenderse en contra de ellas, provocando daño oxidativo progresivo [Alexandrova et al., 2005].

Un radical libre se define como una molécula o átomo que contiene uno o más electrones no apareados, que puede existir en forma independiente. Una ERO es un término que incluye a radicales de oxígeno como el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el peroxilo ($\text{RO}_2\cdot$) y el hidroxiperoxilo ($\text{HO}_2\cdot$) y oxidantes no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HOCl) y el ozono (O_3) [Bayir, 2005].

Los radicales libres se consideran como moléculas con una alta reactividad ya que tienen la capacidad de reaccionar con moléculas radicales no radicales. Las reacciones con estas últimas se caracterizan por ser reacciones en donde la molécula no radical se

convierte en radical; la reacción tiende a ser en cadena originando cada vez más radicales y la velocidad de la reacción depende de la naturaleza del radical libre.

El daño producido por las ERO incluye la oxidación de moléculas como el DNA, los fosfolípidos de las membranas y las proteínas. El daño al DNA por ERO genera alteraciones en una base nitrogenada, rompimientos de cadenas, entrecruzamiento de DNA-proteína, deleciones en la secuencia de nucleótidos generando sitios apúricos y apirimídicos [Bayir, 2005]. Sin embargo, la modificación más importante que sufre el DNA es la hidroxilación de la guanina, produciendo 8-hidroxil-2'-desoxiguanosina.

En los fosfolípidos de membrana el daño producido se debe a la reacción que existe entre las ERO como el $\text{OH}\cdot$ y las cadenas de ácido grasos polinsaturados, los productos finales de estas reacciones son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) [Bayir, 2005].

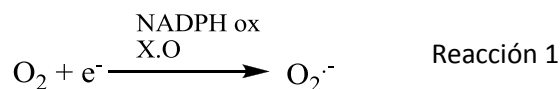
Las proteínas también son susceptibles al daño por ERO. Las modificaciones estructurales que se observan con mayor frecuencia en estas biomoléculas son la oxidación de aminoácidos azufrados como la metionina y la cisteína, la producción de radicales tiol, la formación de metionina sulfóxido y la aparición de puentes disulfuro [Bayir, 2005].

El cerebro es un órgano muy susceptible a la producción y al daño por ERO, principalmente por su metabolismo altamente oxidativo, su bajo contenido de enzimas antioxidantes y por su alto contenido de ácidos grasos en las membranas celulares [Olmez y Ozyurt, 2012]

La producción de ERO se ha vinculado con el desarrollo y la aparición de diversos desórdenes neurológicos y la disfunción cerebral. Dentro de estas afectaciones destacan las enfermedades neurodegenerativas y el accidente isquémico cerebral. En el accidente isquémico cerebral se ha visto que durante la reperfusión, la producción de ERO se ve incrementada. Esto se debe a que el oxígeno puede ser utilizado como sustrato de reacciones enzimáticas oxidantes y además induce el estallido respiratorio mitocondrial [Chan, 1996].

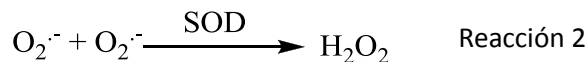
4.3.1 Formación de ERO

En el accidente isquémico la principal ERO que se forma a partir de la reducción del oxígeno molecular es el $O_2^{\cdot-}$ (Reacción 1) a partir del cual se generan otras especies como HO_2^{\cdot} , H_2O_2 y el OH^{\cdot} .

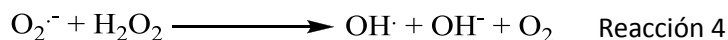
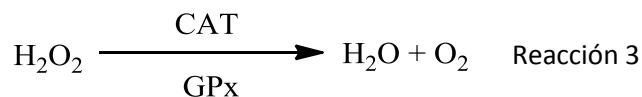


Esta reacción es catalizada por las enzimas NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (X.O) o a través de la cadena mitocondrial transportadora de electrones [Olmez y Ozyurt, 2012].

El $O_2^{\cdot-}$ no es un oxidante altamente reactivo pero tiende a tener una vida media mayor a la de otros radicales. El $O_2^{\cdot-}$ es neutralizado en la célula a H_2O_2 por cualquiera de las tres isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Reacción 2), que son la citoplasmática dependiente de Cu y Zn (CuZn-SOD), la mitocondrial dependiente de Mn (Mn-SOD) y la extracelular dependiente de Cu y Zn (EC-SOD) [Chan, 1996].



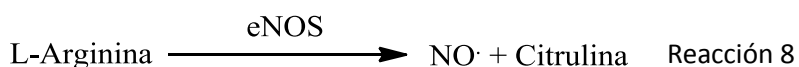
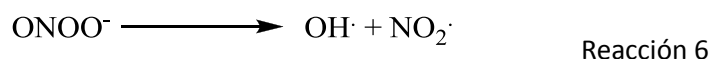
El H_2O_2 formado se descompone a H_2O y O_2 por medio de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Reacción 3), esta última oxida al glutatión reducido (GSH), el cual es nuevamente regenerado por la enzima glutatión reductasa (GRx) a expensas de la oxidación del cofactor NADPH [Chan, 1996]. Sin embargo, el H_2O_2 puede formar el radical OH^{\cdot} a través de la reacción de Haber-Weiss (Reacción 4).



La reacción se ve favorecida en presencia de metales como el Fe^{2+} , en donde la oxidación de este metal produce una gran cantidad de OH^{\cdot} , en una reacción que es conocida como reacción de Fenton (Reacción 5) [Flora, 2009].



Otra fuente de $\text{OH}\cdot$ es a partir de la descomposición del peroxinitrito (ONOO^-) (Reacción 6), el cual se forma de la reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) (Reacción 7). El $\text{NO}\cdot$ proviene de la reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Reacción 8)



El ONOO^- es un poderoso prooxidante que puede interactuar con la SOD para formar un intermediario parecido a nitronio (nitronium-like intermediate), el cual es capaz de nitrar residuos de tirosinas de otras proteínas [Chan, 1996; Beckman et al., 1992]. A su vez el ONOO^- se puede degradar rápidamente a $\text{OH}\cdot$ y a radical dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$). El radical $\text{OH}\cdot$ tiene la capacidad de iniciar la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas y el daño al DNA.

4.3.2 Fuentes de ERO

Durante el accidente isquémico la producción de ERO tiene una cinética que ha sido completamente definida. Se ha demostrado que la producción de ERO se localiza al inicio del evento isquémico y continúa aumentando de manera gradual hasta que alcanza un pico máximo en el inicio de la reperfusión, posteriormente comienza a disminuir hasta que alcanza sus niveles basales [Olmez y Ozyurt, 2012]. En estudios recientes se han identificado las principales fuentes de ERO y ERN que intervienen durante la isquemia cerebral, así como los factores que favorecen su producción. Dentro de estas fuentes se encuentran los cambios en el pH intracelular, la liberación de moléculas pro-oxidantes como el Fe unido a proteínas, las conversiones enzimáticas, la activación de enzimas pro-oxidantes y la disfunción mitocondrial [Manzanero et al., 2013].

La disminución del pH intracelular induce la producción de estrés oxidante al inactivar las defensas antioxidantes de la célula y al liberar el Fe unido a las proteínas, el cual actuar como un agente pro-oxidante al intervenir en la reacción de Fenton. Además, la toxicidad

desencadenada por el glutamato se favorece ante la disminución del pH intracelular [Manzanero et al., 2013].

Una fuente de radicales libres como el $O_2^{\cdot-}$ es el metabolismo de los ácidos nucleicos provenientes del daño al DNA. Los ácidos nucleicos se metabolizan por medio de la enzima fosforilasa de nucleótidos de purina para generar xantina e hipoxantina, la cual se metaboliza a urato por medio de la xantina oxidasa (XO) con la producción de $O_2^{\cdot-}$. Esta enzima proviene de la degradación proteolítica de la xantina deshidrogenasa, la cual es incapaz de producir radicales libres [Lipton, 1999]

El metabolismo oxidativo del ácido araquidónico representa otra fuente de radicales libres durante la isquemia cerebral. Como se ha mencionado, el cerebro se caracteriza por tener una gran cantidad de ácidos grasos en las membranas celulares; los cuales, son degradados por acción de la enzima fosfolipasa A_2 , que se activa por el incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular. El ácido araquidónico formado se metaboliza a eicosanoides como la prostaglandina G_2 (PGG_2) por medio de la enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX-2). La PGG_2 rápidamente se peroxida a prostaglandina H_2 con la formación de $O_2^{\cdot-}$ [Lipton, 1999; Bolaños et al., 2009].

Por su parte la mitocondria juega un papel muy importante como fuente de ERO y ERN en la isquemia cerebral. Como se ha discutido previamente, el cerebro es un órgano que requiere una gran cantidad de ATP para conservar la homeostasis iónica de las células, por lo cual la obtención de energía en forma de ATP depende de la actividad mitocondrial. La mitocondria en condiciones normales es capaz de producir una pequeña cantidad de $O_2^{\cdot-}$ proveniente de la filtración prematura de electrones al O_2 en los complejos I y III. Sin embargo, la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ producido en la mitocondria se eleva en la isquemia cuando en el complejo I, el NAD^+ se reduce a NADH y los electrones regresan al sitio donde se encuentra el flavin mononucleótido en donde se favorece la producción de $O_2^{\cdot-}$; también la coenzima Q en su forma reducida regresa al complejo I y reducir al NAD^+ permitiendo que se produzca $O_2^{\cdot-}$, este proceso es conocido como transporte reverso de electrones [Bolaños et al., 2009]. En el complejo III, la producción de $O_2^{\cdot-}$ se presenta cuando el ciclo Q se inhibe por las condiciones fisiológicas relacionadas con la isquemia [Bolaños et al., 2009]. El radical $O_2^{\cdot-}$ tiene una vida media muy corta, además rápidamente es dismutado por acción de la MnSOD hacia H_2O_2 , el cual reacciona con Fe^{2+} para producir OH^{\cdot} y generar daño oxidante. Esta producción de $O_2^{\cdot-}$ y su interacción con otras ERO en la mitocondria origina la producción de otros radicales como el $ONOO^{\cdot-}$ el cual genera daño

en estructuras mitocondriales e incrementa el número de señales que conducen a la muerte celular.

El radical NO^\cdot también juega un papel muy importante en el daño producido por las ERO y las ERN en la isquemia cerebral. Este radical se forma por medio de la reacción catalizada por la enzima NOS la cual presenta distintas isoformas en el cuerpo [Alderton et al., 2001].

En condiciones normales el NO^\cdot es indispensable para la dilatación de los vasos sanguíneos, incluso se ha propuesto que actúa como un agente protector durante los accidentes isquémicos. Sin embargo, su sobreproducción favorece la formación de otros radicales que son más reactivos y dañinos para los componentes celulares, como el ONOO^\cdot , el cual tiene un pKa de 6.8, por lo tanto rápidamente se protona en condiciones de pH fisiológico, formando el ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual tiene una vida media de 1-2 s por lo que se disocia rápidamente a radical OH^\cdot [Bolaños et al., 2009].

4.5 Muerte celular

Los mecanismos de muerte celular que se han identificado en el accidente isquémico son la necrosis, la apoptosis y la autofagia. Los tres mecanismos se desarrollan como una consecuencia de todos los eventos metabólicos y moleculares que la célula sufre durante la cascada isquémica. La duración y el efecto de estos eventos predispone a la célula a morir particularmente en una u otra forma. La necrosis es un tipo de muerte celular característico de neuronas y otros tipos celulares del núcleo isquémico, ya que las células se lisan y se libera su contenido al medio extracelular. Las condiciones de hipoxia/anoxia e hipoglicemia conducen a una disminución en la producción de metabolitos relacionados con la energía celular, conduciendo a la célula a morir por necrosis. Se ha demostrado que la mitocondria juega un papel muy importante en la necrosis debido a los cambios metabólicos y estructurales a los cuales se ve sujeta en la isquemia. Uno de los cambios estructurales más importantes que sufre la mitocondria es la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, el cual es un complejo protéico conformado por tres péptidos: la adenina nucleótido translocasa, un canal dependiente de voltaje para aniones y la ciclofilina D. Este complejo protéico se inserta en la membrana interna de la mitocondria, disminuyendo su permeabilidad de manera que transitan a través de ella solutos con un peso de 1.5 kDa [Sims y Muyderman, 2009] provocando que exista un desacoplamiento del gradiente electroquímico responsable de la producción de ATP. La

apertura de este poro depende de la cantidad de Ca^{2+} que interacciona con la mitocondria y de las ERO. La disminución de ATP en el citosol y la activación de enzimas líticas dependientes de Ca^{2+} llevan a la célula a morir por necrosis [Durukan y Tatlisumak, 2007]. La apoptosis es un tipo de muerte celular que se caracteriza por ser ordenado y no promover la inflamación. A diferencia de la necrosis, en la apoptosis no hay una ruptura de la membrana celular de manera que cursa sin liberarse el contenido de la célula. Morfológicamente se caracteriza por una fragmentación del material genético en fragmentos de 180-200 pb y por producir “blebbing” de la membrana celular [Elmore, 2007].

En la zona de penumbra, las células mueren con mayor frecuencia por apoptosis, siendo la vía intrínseca la que tiene mayor predominio. La muerte por apoptosis de las células presentes en la penumbra se da por dos mecanismos: la apoptosis dependiente de caspasas y la apoptosis independiente de caspasas [Sims y Muyderman, 2010].

La apoptosis dependiente de caspasas comienza cuando se liberan moléculas apoptogénicas, como el citocromo C, al citosol. El citocromo C interacciona con un complejo de proteínas conocidas como factor activador de proteasas apoptóticas (APAF-1) y la pro-caspasa 9 formando un complejo proteico conocido como apoptosoma. El apoptosoma degrada a la pro-caspasa 9 para activarla y puede degradar a otras caspasas ejecutoras como la caspasa 3 y la caspasa 7. Las caspasas ejecutoras se encargan de activar a la DNAasa activada por caspasas (CAD) para que se transloque al núcleo y comience a degradar el material genético, provocando condensación de la cromatina. En condiciones normales, las caspasas se encuentran inhibidas por proteínas conocidas como inhibidoras de proteínas apoptóticas (IAP), para inhibir el efecto de las IAPs de la mitocondria se liberan otras dos proteínas: el segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína de bajo punto isoeléctrico de unión directa a IAP (Smac/DIABLO por sus siglas en inglés) y la endoproteasa Omi regulada por estrés/proteína A_2 con requerimiento de alta temperatura (Omi/HtrA₂). Estas proteínas se encargan de bloquear y degradar a las IAPs, especialmente XIAP, que es el miembro más potente de la familia [Sims y Muyderman, 2010].

Una vez que la caspasa 3 ha sido activada, la vía ejecutora de la apoptosis es favorecida donde los principales sustratos blanco de la caspasa 3 son la enzima polimerasa de poli(ADP-ribosa) (PARP), la proteína de citoesqueleto alfa fodrina, la proteína nuclear NuMA, la gelosina, entre otras que son degradadas y que conducen a la célula a sufrir los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis [Elmore, 2007].

Por otro lado, la apoptosis independiente de caspasas es inducida por una proteína integral de la membrana interna de la mitocondria conocida como factor inductor de apoptosis (AIF). Esta proteína se libera por proteólisis al citoplasma, ahí interacciona con la ciclofina A y se transloca al núcleo celular en donde degrada el material genético.

Para que estas dos vías de la apoptosis tengan lugar en la célula, es indispensable que la mitocondria sufra un cambio en su estructura de manera que puedan exportarse al citosol todos los componentes apoptogénicos, este cambio estructural es precisamente la formación de un poro con mayor permeabilidad que el poro de transición mitocondrial. Se ha demostrado que el poro está compuesto por proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 como Bim, Bax, Bid y Bad [Elmore, 2007].

5 Mecanismos antioxidantes

El cerebro resulta ser un órgano muy susceptible al daño por estrés oxidante, por su alto consumo de oxígeno, su alto contenido de ácidos grasos insaturados presentes en las membranas celulares, su contenido de hierro en forma libre en diferentes zonas del cerebro y porque a diferencia de otros órganos tiene una disminuida cantidad de defensas antioxidantes [Olmez y Ozyurt, 2012].

Un antioxidante es una sustancia capaz de prevenir o disminuir la oxidación de las moléculas [Flora, 2009]. Los antioxidantes pueden proteger contra el daño oxidante a través de tres distintos mecanismos: atrapando especies reactivas y reaccionando con ellas (antioxidante directo), quelando metales que participan en reacciones en donde se producen especies reactivas [Flora, 2009] e induciendo mecanismos que incrementen la actividad de otras defensas antioxidantes (antioxidante indirecto). De acuerdo a su naturaleza los antioxidantes se clasifican en dos grupos: los antioxidantes no enzimáticos como el α -tocoferol, el ascorbato, los carotenos, el glutatión, la tioredoxina, entre otros y los antioxidantes enzimáticos como la SOD, la GPx, la GRx, etc [Flora 2009].

El α -tocoferol o vitamina E, es un antioxidante liposoluble presente en las membranas celulares y cuya principal función es evitar la lipoperoxidación. El α -tocoferol reacciona con diferentes clases de moléculas oxidantes y radicales libres como el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el radical $\text{CCl}_3\cdot$, el $\text{OH}\cdot$ y el $\text{O}_2\cdot^-$, el producto que se forma de estas reacciones se conoce como radical tocoferoxil. Las interacciones que presenta el α -tocoferol con otras moléculas antioxidantes son muy importantes, pues su efecto sinérgico disminuye aún más el daño por lipoperoxidación. Por ejemplo, el α -tocoferol previene la oxidación de los

enlaces conjugados del β -caroteno y además tiene un efecto sinergista con la enzima GPx [Flora, 2009].

El ácido ascórbico o vitamina C, es otro antioxidante soluble en agua, que se encarga de neutralizar radicales libres de manera directa. El ácido ascórbico es capaz de reaccionar con moléculas radicales como el $\text{OH}\cdot$ y con moléculas oxidantes como el $\text{O}_2\cdot^-$ y el oxígeno singulete. Una de las principales interacciones del ácido ascórbico es con la forma oxidada del α -tocoferol porque ayuda a regenerarlo. Sin embargo, existen estudios en donde en presencia de metales en transición, el ácido ascórbico actúa como una molécula pro-oxidante, aunque en estos estudios no se ha comprobado que este efecto pueda tener influencia en la lipoperoxidación [Flora, 2009].

El β -caroteno, es un pigmento presente en las plantas y precursor de la vitamina A, que ha mostrado una alta capacidad de neutralizar el oxígeno singulete. Por otra parte la vitamina A no tiene esta capacidad [Flora, 2009].

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por el ácido glutámico, la cisteína y la glicina. Este péptido tiene distintas funciones dentro de la célula, las principales son actuar como agente antioxidante, como agente detoxificante de xenobióticos y como agente que ayuda a mantener el grupo sulfhidrilo de las proteínas en un estado reducido [Dringen, 2000]. Este tripéptido se sintetiza a partir de la conjugación de los aminoácidos ácido glutámico y cisteína por acción de la enzima γ -glutamilcisteín sintetasa (GCS), formando el dipéptido γGluCys . Posteriormente, el dipéptido se conjuga con el aminoácido glicina, reacción catalizada por la glutatión sintetasa, para formar el tripéptido del glutatión [Dringen, 2000]. Una vez sintetizado, el GSH tiene distintos destinos metabólicos dentro de la célula, uno de ellos es su oxidación cuando reacciona de manera directa con ERO o cuando funciona como donador de electrones en la reacción catalizada por la enzima GPx. El producto de estas reacciones es la formación del glutatión oxidado, también conocido como glutatión disulfuro (GSSG), el cual es un sustrato de una flavoenzima conocida como GRx y que se encarga de regenerar el GSH a partir de GSSG [Dringen, 2000].

En los dos mecanismos anteriores no existe un consumo neto de GSH en la célula, porque se está regenerando; sin embargo, cuando forma conjugados con xenobióticos a través de la enzima glutatión-S-transferasa (GST), la cantidad de glutatión intracelular disminuye y por lo tanto se genera más GSH a través de su síntesis *de novo* [Dringen, 2000].

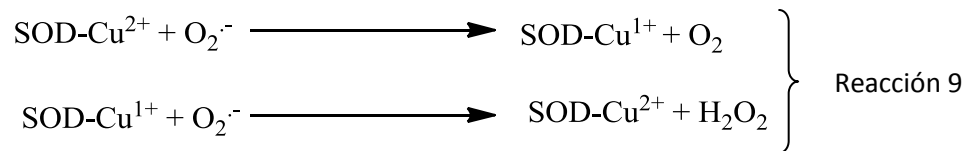
En el grupo de defensas antioxidantes enzimáticas se encuentran las enzimas catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRx) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) [Mori et al., 1994].

La SOD es una enzima que cataliza la conversión o dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a una molécula de H_2O_2 y a una de O_2 (Reacción 9). En el cuerpo humano existen tres diferentes isoformas de la enzima, que se encuentran distribuidas de manera diferente en los compartimentos celulares y extracelulares.

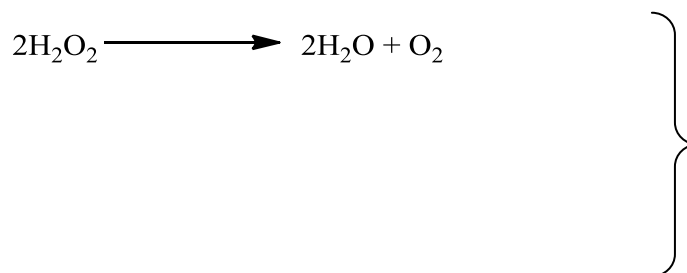
La SOD 1 es una enzima homodimérica de un peso molecular de 32.5 kDa, se encuentra codificada por el gen *SOD 1* y en su sitio activo tiene un centro metálico conformado por cobre y zinc (CuZn SOD). Esta enzima se localiza principalmente en el citoplasma de las células.

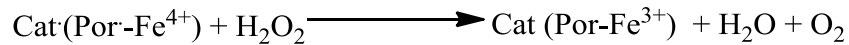
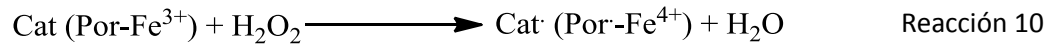
La SOD 2 es la isoforma que se encuentra localizada principalmente en la mitocondria, tiene un peso molecular de 95 kDa, y en su centro activo contiene manganeso (MnSOD). Esta enzima se encarga de destruir el $O_2^{\cdot-}$ proveniente de la filtración de electrones prematura al O_2 en la cadena respiratoria mitocondrial.

Finalmente, la SOD 3 es una isoforma localizada en el espacio extracelular y que al igual que la SOD 1 en su sitio activo cuenta con los metales Cu y Zn.



La catalasa es una enzima presente en todos los organismos aerobios y en algunos organismos anaerobios, su principal función consiste en la degradación del H_2O_2 en H_2O y O_2 . La reacción catalítica de esta enzima se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso una molécula de H_2O_2 oxida al Fe presente en el grupo prostético de la enzima, generando Fe^{IV} y un radical catiónico de porfirina. En el segundo paso una segunda molécula de H_2O_2 reduce al compuesto radical de porfirina y al Fe^{IV} para regenerar a la enzima y producir de manera global dos moléculas de H_2O y una de O_2 (Reacción 10). La catalasa existe como una enzima con distintos grupos prostéticos, como catalasa con grupo hemo y catalasas sin grupo hemo [Switala y Loewen, 2002]. En el ser humano la catalasa es una enzima que tiene un grupo hemo como grupo prostético [Putnam et al., 2000].





La GPx es una enzima que se encuentra expresada principalmente en tejido hepático y eritrocitos, en menor cantidad le siguen el corazón y pulmón y con una disminuida actividad en músculo esquelético [Chance et al., 1979]. La enzima cataliza la oxidación de dos moléculas de GSH y la reducción de un hidroperóxido. El mecanismo de reacción propuesto es muy parecido al de las peroxidasas que contienen un grupo hemo dentro de su estructura, en un primer paso la enzima reacciona con el hidroperóxido para llevar a la enzima a un estado oxidado y el hidroperóxido en uno reducido. En el segundo paso las dos moléculas de GSH se oxidan para regenerar a la enzima a su estado inicial y producirse GSSG (Reacción 11) [Chance et al., 1979]. Estructuralmente la GPx consta de cuatro subunidades que contienen selenio en su centro activo.



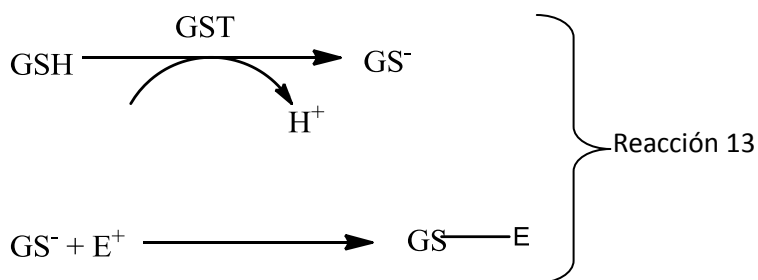
La GRx es la enzima encargada de regenerar GSSG a GSH con la oxidación de NADPH (Reacción 12). El mecanismo de reacción de la enzima propone que durante un primer paso, el NADPH reduce al centro de FAD presente en el sitio activo de la enzima y los equivalentes reducidos son transferidos a un puente disulfuro formado entre los residuos Cys58 y Cys63. En el segundo paso el ditiol producido reacciona con el GSSG aceptando un electron para reducirse a GSH y a un complejo GS-Cys58. Finalmente, el complejo GS-Cys58 se disocia cuando un grupo S de Cys63 lo ataca nucleofílicamente produciendo otra molécula de GSH [Pai y Schulz, 1983].



La GST es la enzima que cataliza la reacción de adición del GSH a una especie electrófila lipofílica generalmente derivada del metabolismo de xenobióticos. A esta enzima se le atribuye la capacidad de detoxificar xenobióticos que son considerados como carcinógenos o especies oxidantes que dañan tejidos [Atkins et al., 1993].

El mecanismo de reacción enzimático propone que en el centro activo de la enzima existe un residuo de tirosina que interacciona con el grupo tiol de la cisteína presente en el GSH, de manera que el grupo fenil de la tirosina es capaz de sustraer el protón del grupo tiol

produciendo una especie nucleófila que reacciona con los electrófilos derivados del metabolismo (Reacción 13). Se ha demostrado que la tirosina presente en el centro activo de la GST disminuye su pKa como una consecuencia del ambiente químico en el que se encuentra, principalmente influenciado por el residuo Arg21. Como consecuencia, a pH fisiológico la tirosina pierde un protón y en esta forma atrapa el protón del grupo tiol presente en el GSH [Angelucci et al., 2005]



6 Dialil disulfuro (DADS)

En los últimos años ha existido un incremento en el interés por utilizar compuestos presentes en los alimentos como posibles alternativas preventivas o terapéuticas encaminadas a curar o tratar las enfermedades que afectan al ser humano. Uno de los alimentos que ha recibido este interés es el ajo. Tradicionalmente esta especie se ha utilizado como remedio para tratar diversos cuadros patológicos que aquejan al ser humano; sin embargo, poco se sabía acerca de los compuestos responsables de tal actividad biológica. En la actualidad se ha demostrado que los constituyentes del ajo presentan actividad antitumoral, detoxificante, antioxidante, antibacteriana, cardioprotectora, entre otras [Tsai et al., 2012].

De acuerdo a sus características fisicoquímicas los componentes del ajo son clasificados con base a su solubilidad en dos grupos. Los compuestos liposolubles son aquellos presentes en el aceite de ajo y que derivan de la molécula alina. Mientras que los compuestos hidrosolubles se encuentran presentes en el extracto de ajo envejecido, el cual se obtiene por un proceso de inmersión de pedazos de ajo en alcohol o vinagre durante varios meses, los compuestos obtenidos en este extracto difieren completamente de aquellos presentes en el aceite de ajo y entre ellos se encuentra la S-alilcisteína y la S-alil mercaptocisteína (Figura 6) [Tsai et al., 2012].

Dentro de los principales constituyentes del aceite de ajo se encuentran los organosulfurados pertenecientes a la familia de los alil sulfuros como el dialil sulfuro (DAS), el dialil disulfuro (DADS), el dialil trisulfuro (DATS), entre otros. Estos compuestos provienen de la degradación de la molécula alina, la cual en presencia de oxígeno es

degradada a alicina por acción de la enzima alinasa [Tsai et al., 2012] y esta última se descompone en los alil sulfuros siendo el DADS el segundo en abundancia (21.9% de 0.2-0.5 mL en el aceite de ajo) [Fukao et al., 2004].

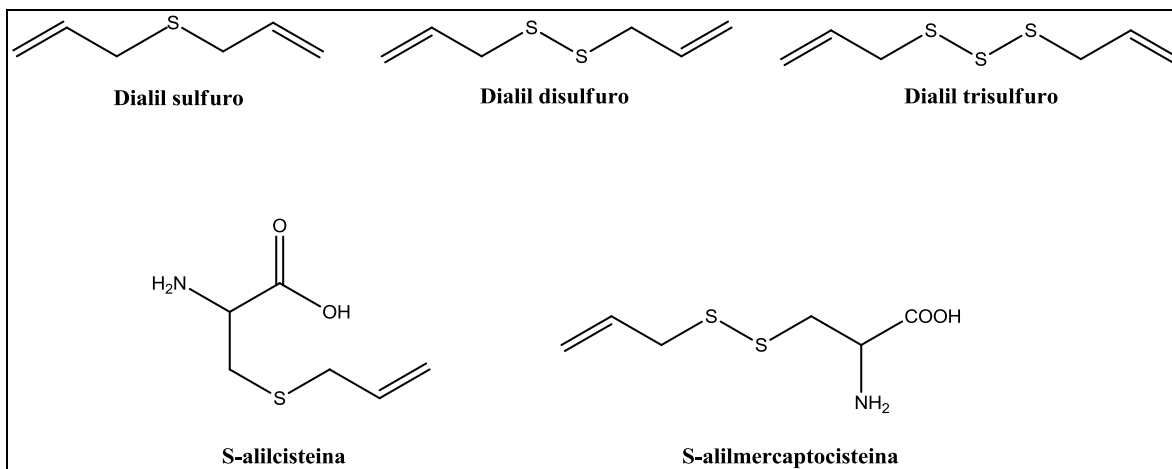


Figura 6. En el panel superior se muestran los compuestos organosulfurados del aceite de ajo y en la parte inferior los compuestos del extracto de ajo envejecido.

El DADS es un compuesto cuya masa molecular es de 146.028 g/mol, su densidad es de 1.01 g/mL y su punto de ebullición es de 180°C. De acuerdo a sus características organolépticas es un compuesto líquido de color amarillento y de olor característico al ajo. Por sus propiedades moleculares es un compuesto no polar y por lo tanto solamente soluble en etanol y aceites.

Poco se sabe de sus parámetros farmacocinéticos, hasta la fecha Sun y colaboradores [2006] determinaron los valores de la concentración máxima (Cmax), el tiempo en el que se alcanza esa concentración (Tmax) y el área bajo la curva (AUC) (9335.8 ng/mL, 1.0 min y 91087.9 mg/L min, respectivamente) del compuesto cuando se administró en ratas vía intravenosa. Estos resultados demostraron que el compuesto presentó una mayor absorción con respecto al DATS, una menor eliminación y una rápida fase de distribución comparado con el DATS

El DADS ha sido utilizado ampliamente en modelos de cáncer debido a la actividad antiproliferativa que ejerce en las células tumorales, principalmente por la inducción de apoptosis [Lu et al., 2004]. También ha demostrado poseer actividad antibacteriana, disminuir los niveles de colesterol e inhibir la agregación plaquetaria. Sin embargo, una de sus propiedades biológicas más importantes es su actividad antioxidante. El DADS es un compuesto que ha demostrado ser un agente antioxidante directo [Chung, 2006] al

atrapar OH^\cdot y H_2O_2 incluso de manera más eficiente que la alina y la alicina, así como antioxidante indirecto al activar el factor Nrf2 e inducir la actividad de las enzimas de fase 2 [Chen et al., 2004].

7 Activación del factor Nrf2

El factor de transcripción nuclear Nrf2 ha sido ampliamente estudiado por estar relacionado con el mantenimiento de la homeostasis celular a través de diferentes mecanismos que regulan la diferenciación, la proliferación, el crecimiento y la apoptosis [Bryan et al., 2013]. Además, se ha demostrado que es el regulador maestro del arsenal antioxidante y detoxificante de la célula porque controla la expresión de genes que codifican para enzimas de fase 1 y 2 y para las enzimas antioxidantes. Este factor de transcripción es considerado como una molécula blanco potencial que es regulada para el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, la neurodegeneración y las enfermedades en donde el estrés oxidante juega un papel fundamental [Bryan et al., 2013].

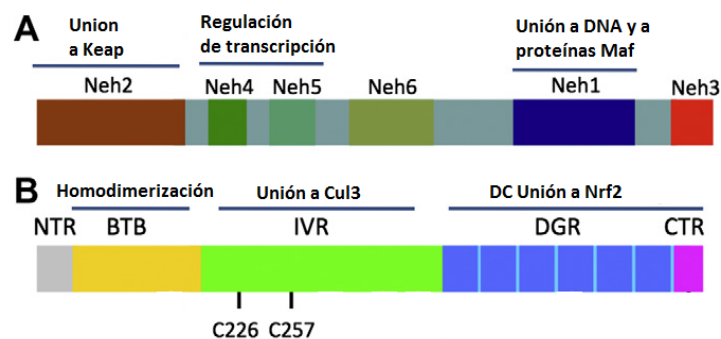
La proteína Nrf2 es identificada como una proteína relacionada con el factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), un importante regulador de la expresión del gen de la cadena de la β -globina en células eritroides. Estructuralmente es una proteína conformada por 6 dominios Neh (Neh 1- Neh 6), cada uno de los cuales se encuentra asociado con alguna función regulatoria específica (Figura 7A). Por ejemplo, el dominio Neh 2 es el encargado de regular la interacción con la proteína Keap1, los dominios Neh 4 y Neh 5 se asocian con su actividad transcripcional y el dominio Neh 1 con la translocación del factor al núcleo [Bryan et al., 2013].

Hasta el momento el mecanismo de acción mediante el cual se activa ha sido muy estudiado; sin embargo existen controversias en cuanto a la compartimentalización del proceso de regulación, las modificaciones químicas necesarias para activarse y los mecanismos encargados de degradarlo [Li et al., 2012].

La activación del factor Nrf2 es un proceso muy bien regulado, la presencia de especies electrófilas u oxidantes dentro de la célula son una señal que desencadena su activación, cuando esta señal o estímulo desaparece el factor deja de activarse. Uno de los componentes básicos en su activación es la proteína Keap1 (Kelch-like-ECH-associated protein 1). Esta proteína es un homodimero de dos subunidades que se conforma por los dominios BTB – encargado de la dimerización –, el dominio DC – asociado a la interacción con Nrf2 – y el dominio IVR-encargado de la unión a Cul3- (Figura 7B). Keap1

forma un complejo con la proteína Cul3, de manera que se forma un complejo proteico con actividad de ubiquitin ligasa, que es el encargado de regular la degradación de Nrf2 [Urano y Motohashi, 2011].

El mecanismo clásico de activación y degradación de Nrf2 propone que en condiciones normales el factor se encuentra secuestrado en el citoplasma formando un complejo con la proteína Keap1-Cul3 de forma que se favorece la poliubiquitinación de Nrf2 por Cul3 y su degradación en el proteasoma S26 (Figura 7C). Cuando aparece un estímulo adecuado que induce cambios en la estructura química de Keap 1 -específicamente la oxidación, nitración o formación de aductos con el glutatión en sus residuos de cisteína 151, 273 y/o 288 - esta sufre cambios conformacionales que provocan que las interacciones débiles entre los dominios DC y Neh 2 desaparezcan y entonces el factor Nrf2 es liberado al núcleo, en donde se asocia con proteínas pequeñas de la familia Maf (MafG, MafK y MafF) y Jun (c-Jun, Jyn-D y Jun-B) [Kaspar, 2009] formando heterodímeros, esenciales para estabilizar al factor Nrf2 y para que reconozca al elemento de respuesta antioxidante (ARE), el cual es una secuencia de nucleótidos (TCAG/CXXXGC) [Bryan et al., 2013; Urano y Motohashi, 2011], presente en la región del promotor de los genes regulados por el factor, iniciando así su transcripción (Figura 7D). Además de la modificación de los residuos específicos de cisteína en Keap 1, necesaria para que se disocie de Nrf2, se requiere que exista una fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) de Nrf2 en el residuo de Ser 40.



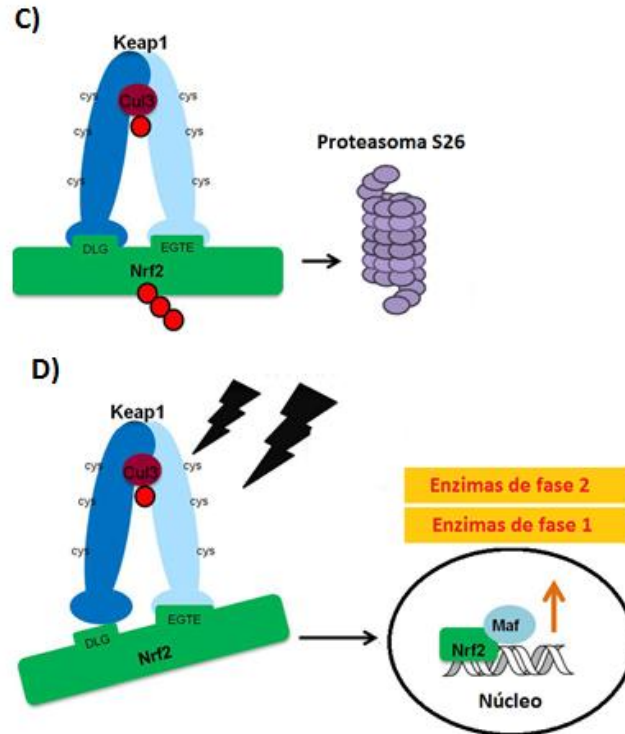


Figura 7. A) estructura lineal de la proteína del factor de transcripción Nrf2, incluyendo sus principales dominios y sitios de unión. B) estructura lineal de la proteína Keap 1 con sus principales dominios y sitios de unión. C) Mecanismo de regulación de la degradación del factor de transcripción Nrf2 unido al complejo Keap1-Cul3. D) Mecanismo de activación del factor Nrf2. A y B se tomaron y modificaron de Uruno y Motoshi, 2011. C y D se tomaron y modificaron de Bryan y Olayanju, 2012.

No obstante se ha demostrado que existen otras rutas que regulan y degradan al factor de transcripción Nrf2 de manera independiente de Keap1 [Bryan et al., 2013].

La autofagia de Keap1 es una propuesta que sugiere que la proteína p62 (secuestrosoma 1) se asocia a Keap1 y promueve su ubiquitinación y su posterior degradación en el proteasoma [Bryan et al., 2013]

Por otro lado, los eventos independientes a Keap1 incluyen la regulación a nivel transcripcional, donde el propio factor Nrf2 es capaz de controlar su propia transcripción. Existe la presencia de elementos ARE y XRE (elemento de respuesta a xenobióticos) presentes en la región del promotor del gen de Nrf2, apoyando la idea de que Nrf2 es capaz de controlar su propia expresión cuando exista un incremento de especies electrófilas provenientes de las enzimas de fase 1 transcripcionalmente reguladas por XRE. La regulación a nivel post-transcripcional se efectúa mediante la acción de

mircoRNA (miRNA) que modifican la maduración, la degradación y la transcripción del transcrito de Nrf2. Hasta el momento solo se han identificado 4 miRNA que intervienen en la regulación de Nrf2 (miRNA-144, miRNA-28, miRNA-200 y miRNA-34) [Bryan et al., 2013].

Finalmente, las modificaciones post-traduccionales son otro de los mecanismos propuestos que regulan la activación de Nrf2 de manera independiente a Keap1. Dentro de las modificaciones post-traduccionales más importantes que sufre Nrf2 se encuentran las fosforilaciones y las acetilaciones. Las fosforilaciones ejercen un papel dual en la regulación de Nrf2, ya que la fosforilación de diferentes residuos en los dominios Neh de Nrf2 promueve la degradación de Nrf2 o bien su disociación de Keap1 y su posterior translocación al núcleo, aunque este último evento está en discusión. Por ejemplo, la fosforilación del residuo Ser40 se ha discutido que es la principal señal implicada en la disociación de Nrf2 y Keap1 y su translocación al núcleo; sin embargo, Li y colaboradores [2012] observaron que la suplementación de cultivos celulares con inductores de la activación de Nrf2, como el sulforafano, inhiben la fosforilación de Nrf2 en el residuo Ser40 a las 24 h de tratamiento y aún así Nrf2 se encuentra presente en el núcleo. Las principales cinasas que se han reportado son la proteína cinasa C (PKC), las tirosinas cinasas (TK), la MAP cinasa (MAPK), la ERK, la PI3K/Akt, entre otras [Bryan et al., 2013].

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares representan una de las principales causas de muerte a nivel mundial y en México, ocupando el segundo y el sexto lugar en las listas de las principales causas de defunción, respectivamente [Mathers y Loncar, 2005; INEGI, 2011]. Además, son la principal causa de discapacidad en personas que la padecen, dejándoles inhabilitadas de realizar sus actividades cotidianas y al cuidado de alguien más afectando de manera primordial a las personas en edad económicamente activa.

La principal forma de ACV que se presenta en la población es el accidente isquémico, con una incidencia del 85% de los casos totales [Maas y Safdieh, 2009]. Hasta el momento solamente han sido aprobados por la FDA fármacos encaminados a resolver el problema de la oclusión vascular (aterotrombosis o embolismo) que generan la isquemia. Tales fármacos, como el activador tisular de plasminógeno recombinante (rt-PA), han presentado escasos resultados positivos en la clínica debido a los efectos secundarios que presenta y a su disminuida ventana terapéutica, justificándose que es necesaria la búsqueda de otras alternativas terapéuticas.

El estrés oxidante juega un papel muy importante como una de las causas principales de la muerte celular en el accidente isquémico, especialmente durante la reperfusión [Olmez y Ozyurt, 2012]; ya que la entrada de oxígeno al tejido provoca que se generen y acumulen ERO y ERN, las cuales pueden dañar proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos. Por ello, es importante encontrar alternativas terapéuticas que no solamente estén encaminadas a resolver el problema vascular que genera la isquemia cerebral, sino que estén dirigidas a brindar citoprotección al evitar que la célula muera y empeoren las condiciones neurológicas del individuo que lo sufre [Roger, 2012; Hayes et al., 2003].

Debido a lo anterior se ha propuesto el uso del DADS, el cual se ha utilizado en diversos modelos de enfermedades como el cáncer o la isquemia *in vitro* [Koh et al., 2005]; sin embargo, hasta el momento no existen reportes de estudios *in vivo* en modelos de isquemia cerebral. Una de las ventajas que presenta este compuesto sobre otros compuestos organosulfurados del ajo, como el DAS o el DATS, es que es un excelente activador del factor de transcripción nuclear Nrf2 [Chen et al., 2004], muestra mejores parámetros farmacocinéticos que el DATS como Cmax y AUC [Sun et al., 2006] y no presenta toxicidad a altas dosis como el DATS. Por ello, que en este trabajo se evaluó el efecto del DADS sobre las alteraciones morfológicas, bioquímicas y neurológicas que se inducen en un modelo de isquemia y reperfusión, cuando el compuesto es administrado al

inicio del reto oxidante (inicio de la reperfusión). Además se estudió el mecanismo por el cual el DADS probablemente ejerció su efecto protector, enfocándonos principalmente en su capacidad de activar el factor de transcripción Nrf2.



HIPÓTESIS

Si el estrés oxidante es un mecanismo importante que participa en la muerte neuronal en la isquemia cerebral y el DADS es un compuesto que ha mostrado tener actividad antioxidante directa e indirecta, entonces el grupo de animales tratado con DADS al inicio de la reperfusión presentará una disminución en las alteraciones morfológicas tisulares, neurológicas y bioquímicas, comparado con el grupo de animales que solamente se sometían a isquemia y reperfusión (IR).

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar el efecto que ejerce el DADS sobre las alteraciones, bioquímicas, conductuales e histológicas que se inducen en un modelo de isquemia/reperfusión (IR) en rata.

2. Objetivos Particulares

- Seleccionar la dosis del DADS que ejerza un efecto protector pero no un efecto tóxico en los animales.
- Evaluar el efecto del DADS sobre el aspecto histológico del tejido cerebral y las alteraciones conductuales cuando se induce el evento de IR.
- Evaluar el efecto del DADS sobre la activación del factor Nrf2 en el evento de IR.
- Evaluar el efecto del DADS sobre la actividad enzimática de algunas enzimas de fase 2 y sobre los niveles de glutatión en el tejido cerebral después del evento de IR.

METODOLOGÍA

1. Reactivos

El DADS se obtuvo de LKT laboratorios (St Paul, MN, USA). El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA), el Nonidet P-40, el tritón, el reactivo de Folin-Ciocalteu, el ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetano) sulfónico (HEPES), el ditioneitol (DTT), el floruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), la glutatión reductasa (GRx), el NADPH, el orto-ftaldehído (OPA), el ácido fosfórico, el glutatión oxidado (GSSG), la N-etil-maleinimida (NEM), el cocktail inhibidor de fosfatasas y proteasas, la albúmina y el GSH se obtuvieron de Sigma (St Louis, MO, USA).

El kit de ELISA para detectar la activación del factor Nrf2 se obtuvo de Active Motif (Carlsbad, CA, USA).

Todos los demás reactivos que se usaron fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

2. Animales

En el desarrollo del protocolo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con una masa de 280 a 320 g, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Las ratas se colocaron en cajas de acrílico transparente, cuatro por cada caja, con libre acceso a alimento (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) e iluminación (ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad). Todos los procedimientos que se realizaron en los animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

3. Diseño experimental

Se realizó en dos fases, en la primera se determinó la dosis de DADS que ejerciera un efecto protector pero no un efecto tóxico sobre los animales después de la operación a la que fueron sometidos para inducir la IR. Posteriormente, en la segunda fase se trabajó con la dosis que cumplió con las características previamente señaladas de manera que se cuantificaron diferentes parámetros bioquímicos para determinar la protección brindada

por el DADS.

Para seleccionar la dosis de DADS que ejerciera un efecto protector pero no tóxico, se utilizaron los siguientes ocho grupos de animales (n=4):

CT: Grupo control

CT DADS 25: Grupo control de DADS con una administración vía i.p de 25 mg/kg

CT DADS 50: Grupo control de DADS con una administración vía i.p de 50 mg/kg

CT DADS 75: Grupo control de DADS con una administración vía i.p de 75 mg/kg

IR: Grupo sometido a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión

IR + DADS 25: Grupo sometido a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión más una sola administración vía i.p de 25 mg/kg.

IR + DADS 50: Grupo sometido a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión más una sola administración vía i.p de 50 mg/kg.

IR + DADS 75: Grupo sometido a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión más una sola administración vía i.p de 75 mg/kg.

El DADS se administró 1 minuto antes del inicio de la reperfusión disolviendo el volumen calculado de DADS en 200 μ L de aceite vegetal (Figura 8).

Previo al sacrificio de los animales (24 h) se evaluó la conducta tomando en cuenta 5 criterios. Los animales se anestesiaron con 500 μ L de pentobarbital vía i.p y se perfundieron por vía transcardiaca con SSI + heparina (500 mL/2 mL), seguido de una solución de paraformaldehído al 4% disuelto en PBS. Después de la perfusión se extrajo el cerebro y se colocó en 25 mL de paraformaldehído 4% por 18 h para fijar el tejido y realizar la tinción con hematoxilina/eosina, para determinar la dosis protectora del compuesto. Se contó el número de células por campo que mostraron alteraciones morfológicas en la zona de penumbra del estriado izquierdo a las 24 h del inicio de la reperfusión.

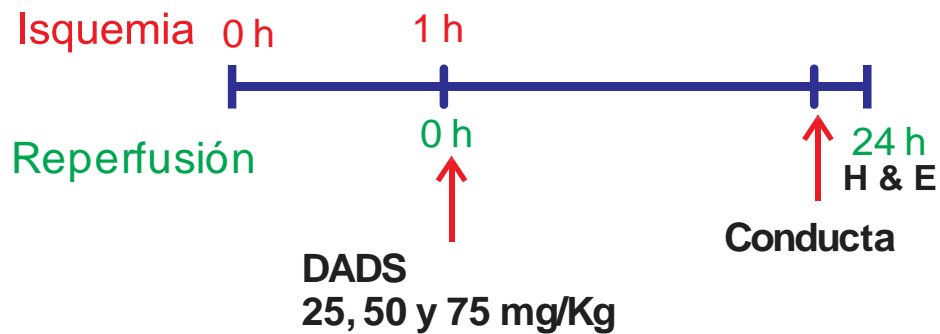


Figura 8. Esquema de administración del DADS para la evaluación del daño histológico en animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperusión

Una vez que se obtuvo la dosis que mostró un efecto protector sin toxicidad (25 mg/Kg), comenzó la segunda etapa del protocolo en la cual se cuantificaron diferentes parámetros como la actividad de las principales enzimas de fase 2, los niveles de glutatión, la activación del factor Nrf2 y se utilizaron los siguientes grupos de animales:

CT: Grupo control.

DADS: Grupo control de DADS con una administración vía i.p de 25 mg/kg

IR: Grupo con 1h de isquemia y tiempo variable de reperusión como se mencionará a continuación.

IR + DADS: Grupo con 1 h de isquemia y tiempo variable de reperusión más una sola dosis vía i.p de 25 mg/kg de DADS.

La administración del DADS se realizó 1 minuto antes del inicio de la reperusión, disolviendo el volumen calculado de DADS en 200 µL de vehículo. Se determinó en corteza frontal ipsilateral la actividad de las enzimas CAT, GRx, GPx y GST (a las 24 h del inicio de la reperusión), los niveles de GSH (a las 4 h del inicio de la reperusión) y la actividad de Nrf2 a las 2 h del inicio de reperusión (Figura 9).

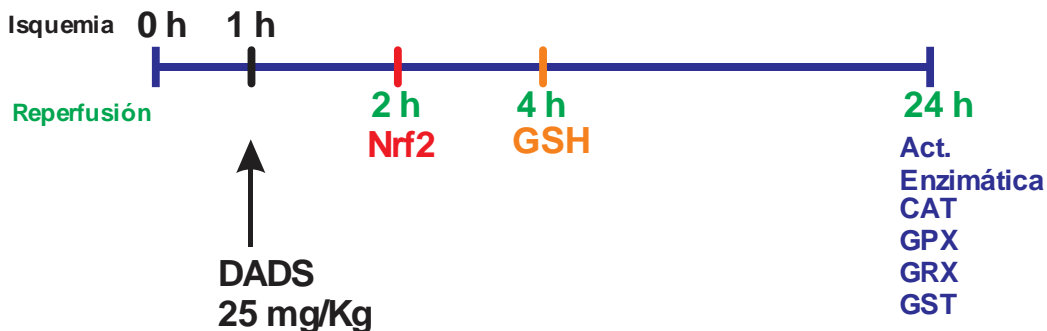


Figura 9. Diseño experimental utilizado para determinar la activación de Nrf2, los niveles de GSH y la actividad de las enzimas CAT, GRx, GPx y GST

4. Inducción de la isquemia cerebral

La inducción de la isquemia cerebral se realizó siguiendo el procedimiento utilizado por Longa y colaboradores [1989].

Previo a la operación, los animales fueron anestesiados en una cámara con una mezcla de isoflurano/O₂/N₂ 2.5/20/80%. La cirugía comenzó con una incisión longitudinal de 1 cm en la región supraesternal en dirección cefálica para exponer la arteria carótida interna (ACI), externa (ACE) y común (ACC). Las arterias tiroideas, occipitales y pterigopaladina fueron cauterizadas y cortadas. Posteriormente, se realizó una tracción con una sutura de seda negra en la región distal del nacimiento de la ACE, se cauterizó y se cortó por arriba de la seda. De la misma manera se realizó tracción en la región del nacimiento de la arteria carótida externa, omitiendo la cauterización. Por debajo de la sutura se colocó un clip y se realizó una microincisión en la arteria carótida externa en el espacio comprendido entre las suturas, por donde se introdujo un filamento de Nylon (3-0) de 30 mm de longitud para llegar a la arteria carótida interna, para bloquear el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media, comenzando con el proceso de isquemia.

Transcurrido el tiempo de isquemia, el animal nuevamente se anestesió para retirarle el filamento de Nylon, comenzando con la reperfusión.

5. Conducta

Para evaluar la conducta de los animales, se utilizó una batería de 5 pruebas que permitieron estimar el nivel de daño inducido por el procedimiento quirúrgico sobre la alteración motora. Cuando el animal no mostrará alteración en el desempeño de cada prueba se asignó una calificación de 0, mientras que la incapacidad para realizar la prueba fue calificada como 1. Las pruebas utilizadas se mencionan a continuación:

Evaluación del movimiento espontáneo. Los animales fueron colocados sobre la superficie de la mesa, y se observó que presentaran movimiento espontáneo en un periodo menor a 10 s.

Giros contralaterales. Se evaluaron colocando a la rata sobre una superficie plana y tomándola de la base de la cola con una inclinación de 45°, permitiendo que la rata tocara la mesa con sus miembros delanteros. Las ratas con daño comenzaron a dar giros hacia el lado contrario al hemisferio cerebral en el que se indujo el evento de IR durante un periodo de 30 s.

Prueba de colgar. Se evaluó tomando a la rata por la cola y elevándola a unos 30 cm de la superficie de la mesa, observando la flexión del miembro delantero contralateral. Las ratas con daño isquémico flexionaron varias veces el miembro delantero contralateral, mientras las ratas sin daño extendieron ambas extremidades tratando de alcanzar la superficie de la mesa.

Reflejo de agarrar. Se determinó tomando a las ratas de la base de la cola y acercándolas tres veces a un cable. Las ratas sin daño se sostuvieron del cable con ambos miembros delanteros, mientras que las ratas isquémicas no pueden sostenerse del cable.

Prueba de sostenerse. Se realizó en aquellas ratas que pudieron agarrar el cable. Para ello se evaluó el tiempo en el que las ratas pueden permanecer sujetas al cable con las extremidades delanteras, sin que utilicen la cabeza para apoyarse. Las ratas normales se sostuvieron del cable por lo menos 10 s, las ratas con daño isquémico se soltaron del cable en menos de 3 s.

6. Histología

Para la evaluación histológica, transcurridas las 18 h de fijación del cerebro en paraformaldehído al 4%, los cerebros se colocaron de manera individual en cassettes de inclusión comenzando con la deshidratación del tejido para lo cual se utilizaron soluciones de xilol y etanol en diferentes concentraciones. Finalmente los tejidos se incluyeron en parafina enriquecida con polímeros de bajo peso molecular y se cortaron con un micrótopo 820 Histo-Stat (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, USA). Los cortes (5 μm) se realizaron en un plano coronal, iniciando en el estriado cubriendo una distancia de 300 μm .

Los cortes se tiñieron en un tren de tinción de hematoxilina y eosina y fueron visualizados con un microscopio (Leica, Cambridge, UK) utilizando el objetivo de 40X. Para obtener las imágenes visualizadas se utilizó una cámara DFC-300FX (Leica Microsystems Digital Imaging, Coldhams, Lane, UK), con la cual se tomaron 5 fotografías por campo en la zona de penumbra del estriado izquierdo.

Para el análisis de las imágenes se tomaron en cuenta aspectos de daño celular como picnosis, vacuolización citoplasmática, daño en la integridad del neuropilo, edema intersticial, atrofia neuronal y presencia de muerte por necrosis. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células dañadas por campo.

7. Preparación de los extractos nucleares

Los extractos nucleares se utilizaron para determinar la activación del factor Nrf2 por ELISA. Para ello, los animales fueron sacrificados 2 h después de la reperusión y se extrajo la corteza frontal izquierda la cual se homogenizó a 4°C con 500 µL de amortiguador de lisis HB (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Nonidet P-40 0.5% e inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X), se incubó en hielo por 15 min y se centrifugó a 850 x g a 4°C por 10 min. El sobrenadante, que corresponde a la fracción citoplasmática, se separó en un tubo y se almacenó a -70° para su uso posterior. El pellet se resuspendió en 500 µL de amortiguador HB sin Nonidet P-40 y se incubó 15 min en hielo. Después se añadió Nonidet P-40 a una concentración final del 0.5%, se incubó 5 min más y se agitó 10 s en la mayor intensidad.

Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 14000 x g a 4°C por 2 min. El sobrenadante se juntó con la fracción citoplasmática y el pellet, fracción nuclear, se resuspendió en 50 µL de amortiguador de lisis completa (*Complete Lysis Buffer*) (TransAM Nrf2), se agitó por 10 s en la mayor intensidad y se incubó en hielo durante 30 min en un agitador orbital. Al finalizar el tiempo de incubación la suspensión se agitó por 30 s en la máxima intensidad, se centrifugó a 14000 x g a 4°C por 10 min y el sobrenadante que es la fracción nuclear se separó en dos alícuotas, una de 10 µL para cuantificar proteínas por el método de Lowry y el resto se almacenó a -70°C hasta su uso.

8. Activación de Nrf2 por ELISA

Para cuantificar la activación del factor de transcripción nuclear Nrf2, se empleó un kit de ELISA utilizando los extractos nucleares previamente descritos.

El fundamento de la cuantificación del factor Nrf2 activo empleando el kit se basa en la unión que se establece entre el factor activo y el oligonucleótido que se encuentra unido a la placa y que cuenta con la secuencia ARE. Posteriormente, se añade un anticuerpo primario capaz de reconocer al factor unido al oligonucleótido y para revelar se utiliza un anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) que es capaz de reconocer el fragmento Fc del anticuerpo primario. Al añadir el sustrato se produce una reacción que genera un producto colorido que puede ser fácilmente cuantificado por colorimetría.

Para la cuantificación se adicionaron 40 µL de amortiguador de unión completa (*Complete Binding Buffer*) a cada pozo y 10 µL de extracto nuclear diluidos en amortiguador de lisis completa. Se emplearon 0.5 µL del control positivo provisto por el kit diluido en 9.5 µL de

Complete Lysis Buffer. La placa se incubó en oscuridad durante 1 h a 100 rpm y al finalizar el tiempo los pozos se lavaron tres veces con 200 µL de Wash Buffer 1X.

Se adicionaron 100 µL de anticuerpo primario anti-Nrf2 diluido 1:1000 en amortiguador de unión del anticuerpo (*Antibody Binding Buffer*) 1X a cada pozo. La placa se incubó en oscuridad durante 1 h, sin agitación, a temperatura ambiente y al final los pozos se lavaron tres veces con 200 µL de amortiguador de lavado (*Wash Buffer*) 1X.

Posteriormente, se adicionaron a cada pozo 100 µL de anticuerpo HRP-conjugado diluido 1:1000 en amortiguador de unión del anticuerpo, la placa se incubó 1 h a temperatura ambiente sin agitación y al finalizar el tiempo, cada pozo se lavó 4 veces con 200 µL de amortiguador de lavado.

Para revelar la placa se adicionaron 100 µL de amortiguador de desarrollo (*Developing Buffer*) a todos los pozos, incubando 15 min a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz. Al terminar se adicionaron 100 µL de disolución de parado (*Stop Solution*) y la placa se leyó en un lector de ELISA a 450 nm de longitud de onda durante los primeros 5 min.

Para el ensayo se emplearon 2 pozos como blanco, pozos como control positivo y un pozo para cada muestra.

9. Actividad enzimática

9.1 Preparación de los homogenados

La corteza ipsilateral se homogenizó en 500 µL de amortiguador de lisis pH 7.9 (tris base 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM, tritón 1% e inhibidores de proteasas 1X). El homogenizado se centrifugó a 14000 rpm por 20 min a 4°C y el sobrenadante se separó y almacenó a -70°C hasta su uso.

9.2 Cuantificación de las proteínas

La cuantificación de proteínas en las muestras se realizó siguiendo el método propuesto por Lowry y colaboradores [1951] el cual abarca dos etapas. Durante la primera etapa se lleva a cabo la reducción del Cu^{2+} en medio alcalino el cual se coordina con los grupos amino de las proteínas para formar un complejo que exponga los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, serina y triptófano. En la segunda etapa se adiciona el reactivo de Folín (fosfomolibdato fosfotungstato) el cual es reducido por los grupos fenólicos

expuestos en las proteínas, desarrollando un compuesto colorido que puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

Para el ensayo se realizó una curva de calibración (5-50 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$) de albúmina. Las muestras se diluyeron 1:50 y se preparó un blanco con agua destilada. A cada tubo se le añadió 1 mL de disolución C (50 mL de disolución de Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4% y tratrato de sodio 0.02% más 1 mL de CuSO_4 5%), se incubó por 10 min a temperatura ambiente y después se añadieron 100 μL de reactivo de Folin 1 N con agitación a cada tubo incubando por 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 660 nm.

9.3 Actividad de la GPx

La cuantificación espectrofotométrica de la actividad se basa en la reacción que cataliza midiendo la desaparición de NADPH (Figura 10).

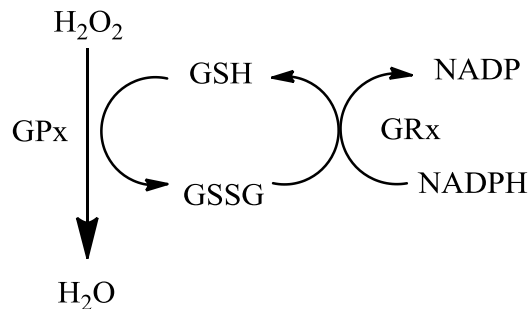


Figura 10. Reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRx)

Para el ensayo, en un tubo de vidrio, se adicionaron 800 μL de mezcla de reacción (EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y GRx 1 U/mL en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7), 100 μL de H_2O_2 30 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y 100 μL de muestra. Como blanco se utilizó amortiguador de fosfatos, también se utilizó un tubo inespecífico al cual se le añadieron 800 μL de mezcla de reacción, 100 μL de H_2O_2 y 100 μL de amortiguador de fosfatos. La absorbancia se determinó a 340 nm midiendo por 150 s en intervalos de 30 s.

Para determinar la actividad enzimática se calculó el promedio de los deltas de cada muestra y del tubo inespecífico; se restó el valor del promedio del tubo inespecífico al de la muestra, se multiplicó por un factor (0.16) y se dividió entre la cantidad de proteína utilizada para el ensayo. La actividad calculada se expresó como U/mg proteína.

9.4 Actividad de la GRx

La cuantificación espectrofotométrica de la actividad se basa en la reacción que cataliza midiendo la desaparición del NADPH (Figura 10).

Para este ensayo se utilizaron 950 μL de mezcla de reacción (EDTA 0.5 mM, GSSG 1.1 mM y NADPH 1 mM en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6) más 50 μL de muestra. Como blanco se utilizó amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6. La lectura de la absorbancia se realizó a 340 nm por 120 s midiendo en intervalos de 15 s.

El cálculo de la actividad enzimática se realizó calculando el promedio de los deltas de cada muestra, multiplicándolos por un factor (0.16) y dividiéndolos entre la cantidad de proteína utilizada en el ensayo. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

9.5 Actividad de la CAT

La cuantificación espectrofotométrica de la actividad se basa en la reacción que cataliza midiendo la desaparición de H_2O_2 (Figura 11).

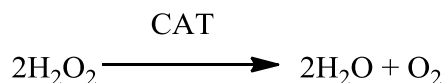


Figura 11. Reacción catalizada por la catalasa (CAT)

Para el ensayo se utilizaron 725 μL de H_2O_2 30 mM (diluido en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7) y 25 μL de la muestra. Como blanco se utilizó amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7. La lectura de la absorbancia se realizó a 240 nm por 150 s midiendo en intervalos de 30 s.

El cálculo de la actividad enzimática se realizó obteniendo el logaritmo natural del cociente del primer resultado de absorbancia entre el último resultado, el cual se multiplicó por el recíproco del delta del tiempo, que fue de 150 s y finalmente este valor se dividió entre la cantidad de proteína utilizada en el ensayo. Los resultados se expresaron como K/mg de proteína.

9.6 Actividad de la GST

La cuantificación espectrofotométrica de la actividad se realizó de acuerdo al método utilizado por Habig y colaboradores [1974], el cual se basa en la medición de formación del conjugado entre el GSH y el CDNB (Figura 12).

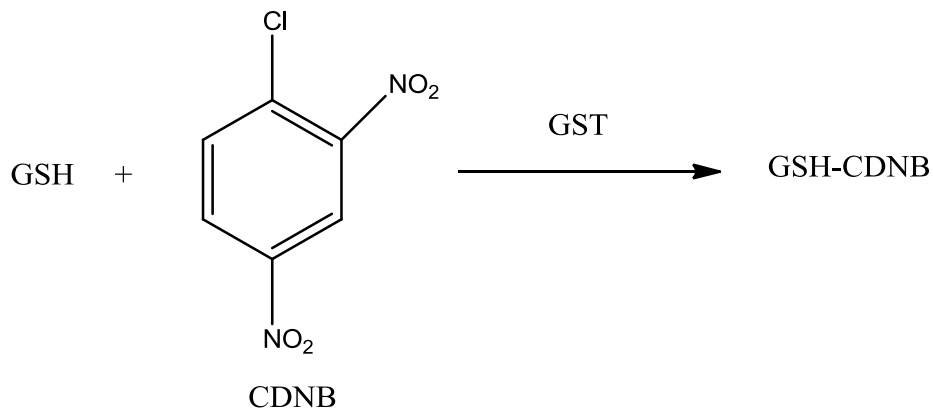


Figura 12. Reacción entre el GSH y el 1-cloro 2, 4-dinitrobencono (CDNB) para cuantificar la actividad de la Glutación S-transfereasa (GST)

Para el ensayo se utilizaron 850 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5, 20 μL de GSH 50 mM, 50 μL de CDNB [6mM] disuelto en etanol al 95% y 80 μL de la muestra. Como blanco se utilizó agua destilada en lugar de la muestra adicionando los otros reactivos. La lectura de absorbancia se realizó a 340 nm por 180 s en intervalos de 30 s.

El cálculo de la actividad enzimática se realizó obteniendo el promedio de los deltas de cada muestra, este valor se dividió entre 0.5 min y se dividió entre el valor del coeficiente de extinción molar del CDNB que es de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Finalmente, este valor de actividad total se dividió entre la cantidad de proteína que se utilizó para el ensayo. Los resultados se expresaron como U/mg proteína.

10. Cuantificación de los niveles de GSH

La cuantificación de los niveles de GSH y GSSG se realizó siguiendo el método de Hissin y Hilf [1976] donde se utiliza el OPA para formar un aducto fluorescente con el GSH o GSSG en medio básico (Figura 13). A su vez se calculó la razón de GSH/GSSG como indicador de estrés oxidante en la célula.

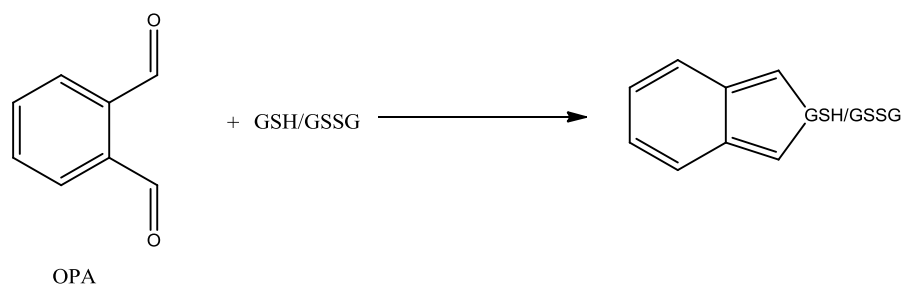


Figura 13. Reacción del glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG) con el o-ftaldehído (OPA) para la cuantificación del cociente de GSH/GSSG

Las muestras se congelaron utilizando nitrógeno líquido y se determinó su masa. Posteriormente, se homogenizaron con amortiguador fosfatos-EDTA 0.3/0.1 M pH 8, utilizando el volumen necesario para obtener una dilución 1:4 (masa/volumen). Al homogenizado se le añadió 1.0 mL de H₃PO₄ 25% para precipitar proteínas y se centrifugó a 3000 x g a 4°C por 15 min. Se separaron en dos tubos 500 µL de sobrenadante para cuantificar GSH y el otro para GSSG. Al tubo donde se cuantificó el GSSG se le añadieron 200 µL de NEM 0.4 M y 4.3 mL de NaOH 0.1 M y se incubó por 25 min a temperatura ambiente. Al tubo en donde se determinó la cantidad de GSH se le añadieron 4.5 mL de amortiguador de fosfatos-EDTA 0.3/0.1 M pH 8. A la par se preparó una curva de calibración de GSH (0.2-4.0 µg/100 µL) y una de GSSG (0.2-4.0 µg/100 µL). De la dilución de las muestras y de los estándares para construir la curva se tomaron 100 µL y se diluyeron en 1.8 mL del amortiguador de fosfatos-EDTA para cuantificar GSH y de NaOH 0.1M para cuantificar GSSG. Posteriormente, se añadieron 100 µL de OPA 1 mg/mL y los tubos se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Finalmente, se depositaron 200 µL de cada tubo a cada pozo y la placa se leyó a 420 y 350 nm de emisión y absorción, respectivamente.

11. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media ± error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba de Tukey, usando el software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de P<0.05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Selección de la dosis mediante la evaluación del daño morfológico

El daño producido por el evento de IR es notorio ya que se observa un mayor número de células picnóticas, edema vasogénico y daño al neurópilo en el grupo IR. La administración de DADS desde la dosis de 25 y hasta la de 75 mg/Kg de peso disminuyó considerablemente el daño medido como picnosis e integridad del neurópilo, el cual se conservó con respecto al grupo IR. Sin embargo, es posible observar células con edema citotóxico tras la administración de DADS al inicio de la reperfusión (Figura 14, panel superior).

La administración de DADS por sí solo a las dosis estudiadas no produjo daño en las células del estriado ni en el neurópilo. En algunas secciones del estriado de estos grupos solamente se logran observar células con edema citotóxico (Figura 14, panel superior).

Estas observaciones se corroboraron al hacer la cuantificación del daño celular mostrado en la figura 14, panel inferior.

El daño celular producido en el estriado después de que los animales fueron sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión fue muy notable, ya que el porcentaje de células con daño en el estriado fue de 92.88% con respecto al grupo control, donde se observó un 15.2% de daño celular. La administración de las diferentes dosis de DADS al inicio de la reperfusión disminuyó significativamente la cantidad de células con daño morfológico en un porcentaje muy similar. La dosis de 25 mg/kg disminuyó un 40.27%, mientras que las dosis de 50 y 75 mg/Kg disminuyeron el daño en un 30.83 y 26.45%, respectivamente, con respecto al grupo IR. Para evaluar el efecto tóxico del DADS, se incluyeron 3 grupos de animales a los que se les administraron las tres dosis estudiadas del compuesto (25, 50 y 75 mg/Kg). No se observó un efecto tóxico con ninguna de las dosis, ya que los animales que recibieron 25 mg/Kg mostraron un 17.23% de daño, con la dosis de 50 mg/Kg se observó un 31.55% y con la dosis de 75 mg/Kg un 27.84%, con respecto al grupo control (Figura 14, panel inferior).

Debido a que el efecto protector observado sobre el daño morfológico con las tres dosis de DADS estudiadas fue muy similar, se eligió la dosis de 25 mg/Kg para realizar los estudios posteriores.

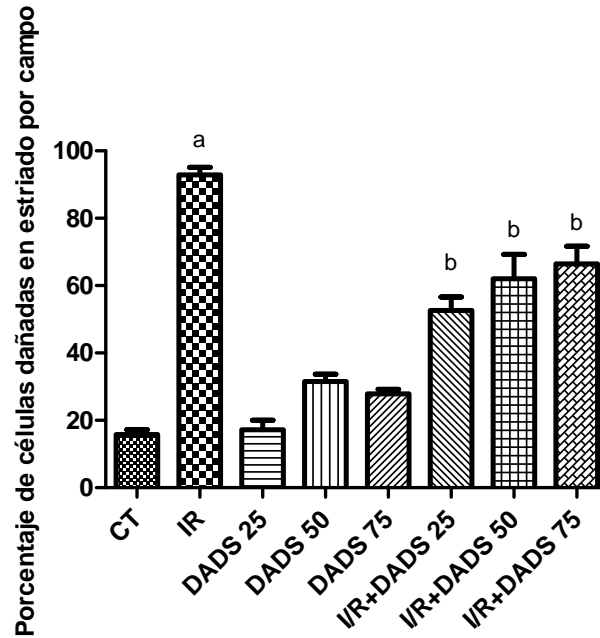
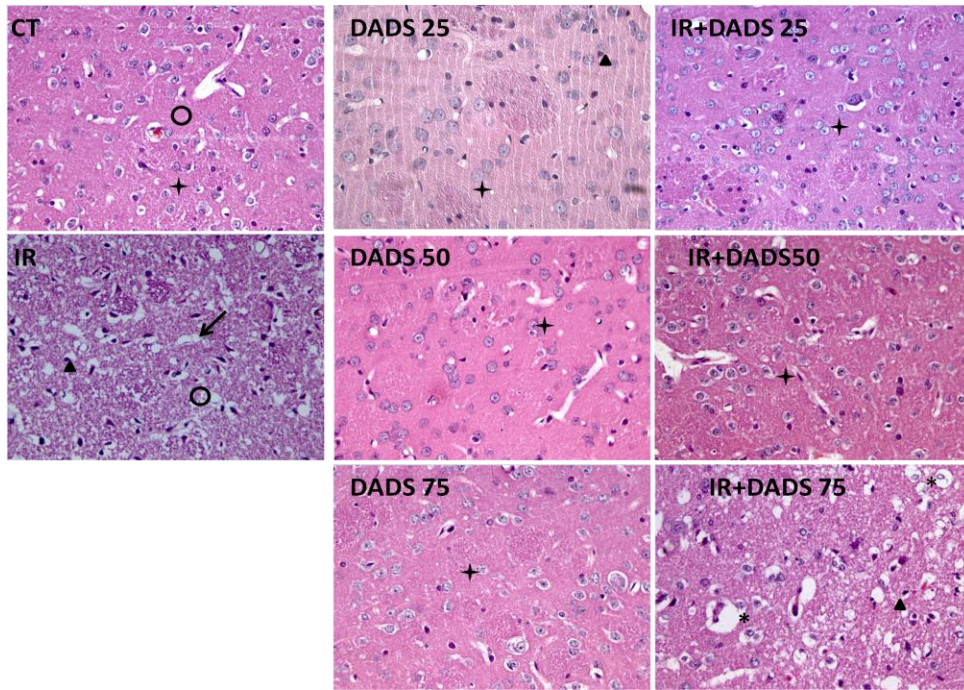


Figura 14. Efecto de diferentes dosis de DADS (25, 50 y 75 mg/Kg) sobre el daño celular inducido por 1 h de isquemia y 24 h de reperusión (IR). Se muestran imágenes representativas tomadas a 40 X (panel superior). Las estrellas señalan células sin daño, los triángulos núcleos picnóticos, las flechas edema vasogénico y los asteriscos edema citotóxico. En el grupo IR se presenta una

disrupción del neurópilo con respecto al grupo control señalado con un círculo. La gráfica muestra la cuantificación del daño en los diferentes grupos (panel inferior). Los valores se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.05 vs CT y ^bP<0.05 vs IR

2. Conducta

Para determinar el efecto del DADS sobre el daño neurológico en animales sometidos a IR se evaluaron 5 pruebas de capacidad motora y de reflejos a las 24 h de reperfusión. Los animales sometidos a IR mostraron un aumento significativo en el déficit neurológico, ya que presentaron giros contralaterales al lado de la lesión, flexión de miembro anterior contralateral y la incapacidad de sostenerse de un cable y permanecer sujeto por más de 3 segundos. La administración de DADS 25 mg/Kg al inicio de la reperfusión (grupo IR+DADS) disminuyó el déficit neurológico significativamente con respecto al grupo IR. El grupo administrado con solo DADS no mostró una diferencia con respecto al grupo CT sugiriendo que el compuesto no produce daño neurológico (Figura 15).

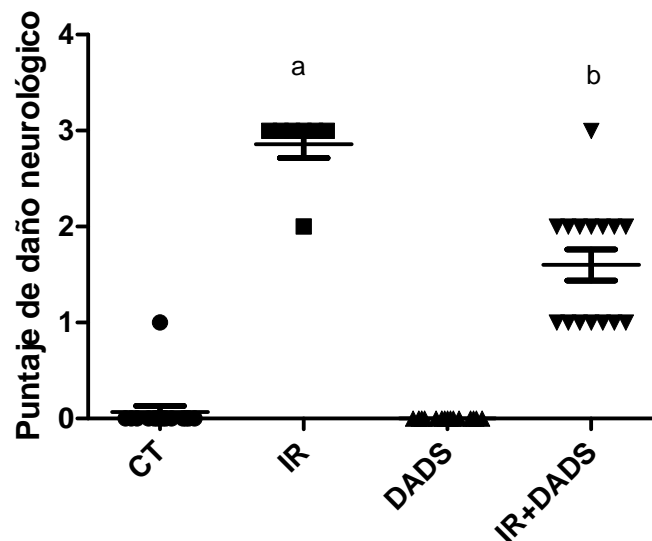


Figura 15. Efecto del DADS 25 mg/kg sobre el déficit neurológico en los animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión (IR). Las pruebas evaluadas fueron habilidad motora, giros contralaterales al lado de la lesión, flexión del miembro contralateral anterior, capacidad de agarrarse de un cable y mantenimiento del agarre por más de tres segundos. Se asignó una calificación de 0 a la capacidad de realizar una tarea y 1 a la incapacidad de realizarla o a la aparición de un evento anormal. Los datos se muestran como la media \pm EEM. ^aP<0.05 vs CT y ^bP<0.05 vs IR.

3. Activación del factor Nrf2

Para evaluar la activación del factor de transcripción Nrf2, se obtuvo el extracto nuclear de la corteza ipsilateral después de 2 h de reperfusión y los niveles de Nrf2 se cuantificaron utilizando el kit TransAM Nrf2.

Los animales sometidos a IR no mostraron cambios significativos en la activación del factor de transcripción Nrf2 con respecto al grupo CT. Sin embargo, la administración de DADS incrementó de manera significativa la activación del factor (0.0097 D.O/mg proteína) con respecto al control (0.0068 D.O/mg proteína). Por otro lado, la administración del DADS al inicio de la reperfusión provocó un ligero incremento que no fue significativo con respecto al grupo CT (Figura 16).

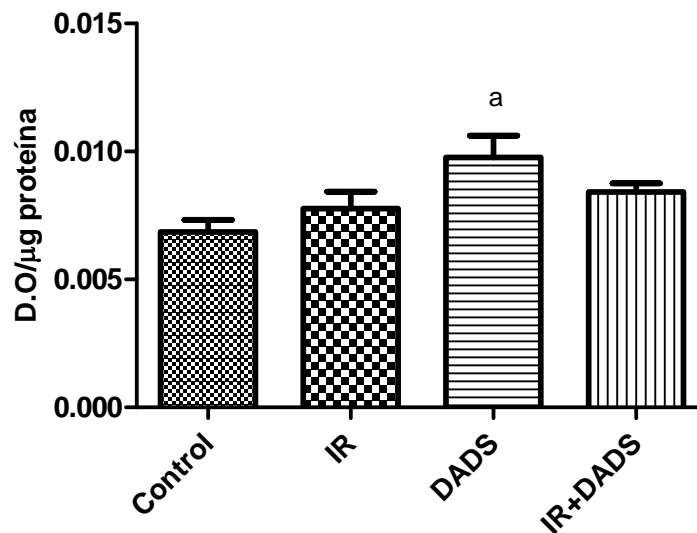


Figura 16. Efecto del DADS 25 mg/Kg sobre la activación del factor de transcripción Nrf2 en extractos nucleares de corteza frontal de animales sometidos a 1 h de isquemia y 2 h de reperfusión (IR). La activación del factor Nrf2 se expresó como la densidad óptica (D.O) emitida por la sonda acoplada al anticuerpo por μg de proteína en la muestra. Los datos se muestran como la media + EEM. ^aP <0.05 vs Control.

4. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la GPx y la GRx se midió en corteza ipsilateral a las 24 h de reperfusión, mediante un ensayo espectrofotométrico en donde se determinó la oxidación del NADPH a 340 nm.

Se observó una disminución en la actividad de la GPx en el grupo IR (0.26 ± 0.016 U/mg proteína) con respecto al grupo CT (0.57 ± 0.092 U/mg proteína) pero no fue significativo. Por otro lado, la actividad de la enzima se incrementó de manera significativa en el grupo DADS (1.00 ± 0.13 U/mg de proteína) con respecto al grupo CT. También se observó que

la actividad de la enzima se incrementó ligeramente en el grupo IR + DADS (0.46 ± 0.054 U/mg proteína) en comparación con el grupo IR, sin embargo dicho cambio no fue significativo (Figura 17 A).

La actividad de la enzima GRx no mostró cambios significativos entre los grupos CT e IR; sin embargo, el grupo tratado con DADS incrementó la actividad con respecto al (0.0044 ± 0.0003 U/mg proteína) grupo CT (0.0027 ± 0.0001 U/mg de proteína). Igualmente la actividad de la enzima se encontró incrementada en el grupo IR + DADS (0.0040 ± 0.0002 U/mg proteína) con respecto al grupo IR (0.0029 ± 0.0003 U/mg proteína) (Figura 17 B).

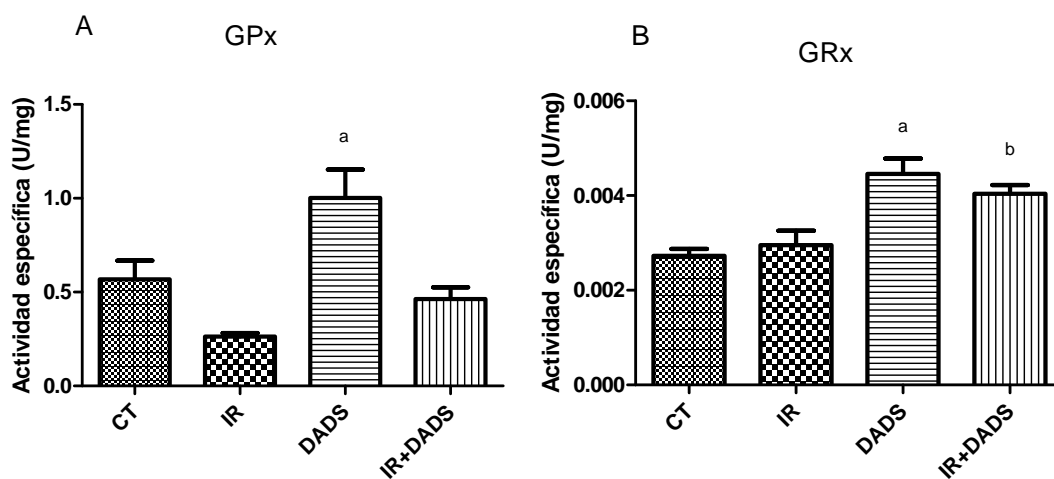


Figura 17. Efecto del DADS 25 mg/Kg sobre la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (A) y la glutatión reductasa (B) en homogenizado total de corteza frontal ipsilateral de animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperusión (IR). La actividad se determinó espectrofotométricamente y se expresó como actividad específica (U/ mg de proteína). Los datos se muestran como la media + EEM. ^aP < 0.05 vs CT y ^bP < 0.05 vs IR

Por otro lado, las actividades de las enzimas CAT y GST no mostraron cambios significativos entre los 4 grupos de animales (Tabla 1)

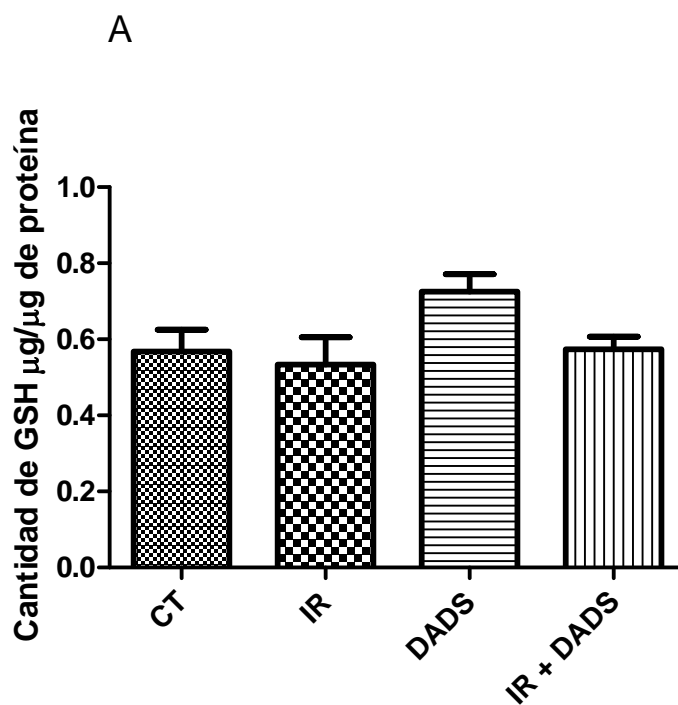
Tabla 1. Efecto del DADS 25 mg/kg sobre la actividad de las enzimas CAT y GST en corteza frontal ipsilateral en animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperusión (IR). Los datos se muestran como la media ± EEM.

Grupo	Actividad CAT (U/mg proteína)	Actividad GST (U/mg proteína)
CT	0.0039 ± 0.0005	0.226 ± 0.022
IR	0.0028 ± 0.0002	0.294 ± 0.042
DADS	0.0045 ± 0.0001	0.287 ± 0.041
IR + DADS	0.0015 ± 0.0005	0.251 ± 0.028

5. Niveles de GSH

A pesar de que se observaron tendencias en los diferentes grupos (los cuales se mencionan a continuación) estas no fueron estadísticamente significativas.

El tratamiento con DADS incrementó el nivel de GSH un 29% (Figura 18 A) y la relación GSH/GSSG un 75% (Figura 18 C), mientras que redujo el nivel de GSSG un 12% (Figura 18 B), con respecto al grupo CT. Por otro lado, en el grupo de IR, se observó una ligera disminución del nivel de GSH 12% (Figura 18 A) y el cociente GSH/GSSG un 23% (Figura 18 C) y un aumento del nivel de GSSG un 33% (Figura 18 B) con respecto al grupo CT. Estos cambios fueron prevenidos con el tratamiento con DADS (grupo IR + DADS).



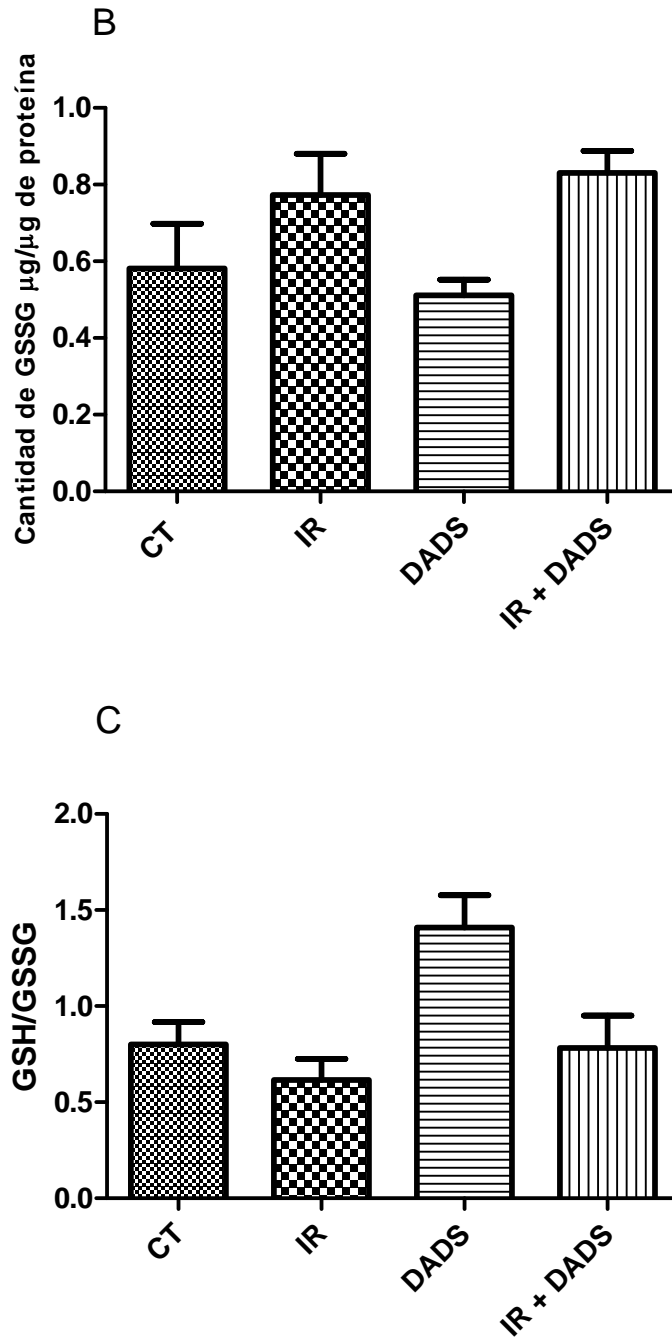


Figura 18. Efecto del DADS 25 mg/Kg sobre los niveles de A) glutatión reducido (GSH) B) glutatión oxidado (GSSG) y C) la relación GSH/GSSG en corteza frontal ipsilateral de animales sometidos a 1 h de isquemia y 4 h de reperfusión (IR). Los datos de expresan como la cantidad de GSH por μg de proteína (A) y la cantidad de GSSG por μg de proteína (B) y se muestran como la media \pm EEM.

DISCUSIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares se han convertido en un problema de salud pública en países industrializados, ya que representan la tercera causa de muerte en la población, solamente por debajo del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares.

Actualmente se han desarrollado diversas alternativas terapéuticas basadas en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y que están encaminadas en atacar alguno o algunos de los mecanismos involucrados en el daño y la muerte celular. Hasta la fecha solo ha sido aprobado por la FDA el activador tisular de plasminógeno recombinante (rt-PA) como tratamiento del infarto, y cuyo uso se encuentra limitado a algunos casos debido a su corta ventana terapéutica y al daño oxidativo que se genera cuando se restablece la perfusión sanguínea. Por ello, la búsqueda de agentes terapéuticos está justificada a pesar de que no se han observado resultados positivos en ensayos experimentales. En especial, la reperfusión juega un papel muy importante en el daño neurológico ya que durante esta etapa, se presenta un incremento en la producción de ERO las cuales son una de las principales causas del daño y muerte celular [Alexandrova et al., 2005; Doyle et al., 2008; Lo et al., 2003].

En los últimos años ha aumentado el interés por utilizar agentes antioxidantes como estrategia terapéutica neuroprotectora; en especial, la familia de compuestos organosulfurados presentes en el aceite de ajo como el DADS, dialil trisulfuro, entre otros. Estos compuestos además de tener actividad anticancerígena, antiinflamatoria, inmunomoduladora y detoxificante [Tsai et al., 2012], poseen actividad antioxidante directa al atrapar radicales libres por sí mismos y actividad antioxidante indirecta al inducir respuestas antioxidantes dentro de la célula. El DADS es el segundo componente volátil del aceite de ajo y ha demostrado ser un buen inductor de enzimas detoxificantes y antioxidantes [Fisher et al., 2007; Chen et al., 2004], ya que protege a la célula contra el daño producido por el estrés oxidante en modelos de hipoxia *in vitro* [Koh et al., 2005]. Sin embargo, el efecto del DADS aún no ha sido evaluado en modelos *in vivo* de isquemia cerebral.

Uno de los posibles mecanismos implicados en la protección celular brindada por el DADS propone que está asociado con la inducción de las enzimas antioxidantes y de fase 2 como la GST, la GPx, la GRx, la hemoxigenasa-1 (HO-1), entre otras. Esta inducción se ha propuesto que se lleva a cabo mediante la activación del factor de transcripción Nrf2, el

cuál es el regulador maestro de la transcripción de los genes que codifican para dichas enzimas.

El uso de modelos de isquemia cerebral *in vivo* como la oclusión de la arteria cerebral media, descrito por Longa y colaboradores [1989], permite generar la zona de penumbra y núcleo de daño isquémico. Además permite evaluar la capacidad neuroprotectora de diversos agentes [Durukan y Tatlisumak, 2007].

En el presente estudio se evaluó el efecto del DADS sobre el daño cerebral isquémico..Se encontró que la administración de DADS al inicio de la reperfusión disminuye los signos de daño celular e histológico como el edema citotóxico, el edema vasogénico, la picnosis y el daño al neurópilo en comparación con el grupo de animales que solo fueron sometidos a IR sin recibir ningún tratamiento. Sin embargo, al administrar el compuesto en dosis cada vez mayores en animales sometidos a IR el número de células con daño incrementó ligeramente. Por otro lado, cuando el compuesto se administró solo no se observaron cambios significativos en el número de células dañadas, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fukao y colaboradores [2004], ya que ellos no observaron un efecto tóxico en animales administrados con 1.46 y 14.6 mg/Kg de peso vía intraperitoneal. Esto también se puede relacionar con reportes en donde se ha demostrado que el DADS en concentraciones bajas (por debajo a 50 μ M) presenta un efecto citoprotector pero a concentraciones mayores a 50 μ M es capaz de incrementar la cantidad de ERO como el H_2O_2 y promover la activación y liberación de moléculas proapoptóticas como citocromo c y la caspasa 3 [Koh et al., 2005].

Uno de los principales objetivos del uso de las terapias citoprotectoras en el accidente isquémico cerebral es la disminución del daño neurológico y las secuelas que deja la enfermedad en pacientes que la padecen. Dentro de las principales consecuencias a nivel neurológico se encuentran la hemiparesis, la afasia, la dificultad para hablar, los problemas cognitivos, el déficit sensorial y la hemianopsia [Roger et al., 2012; Hayes et al., 2003].

En animales resulta difícil evaluar las afectaciones previamente descritas, por ello se han desarrollado diferentes baterías de pruebas dirigidas a evaluar el daño motor, sensorial y perceptivo desencadenados por la isquemia cerebral.

En este estudio cuando los animales fueron administrados con DADS a una dosis de 25 mg/Kg de peso al inicio de la reperfusión mostraron una disminución significativa en los signos de daño neurológico descritos por Aguilera y colaboradores [2010] en comparación

con el grupo control de IR. Estos resultados sugieren que el DADS es capaz no solo de disminuir el daño morfológico, sino también los signos de daño en la función motora a las 24 h posteriores al evento de la reperfusión.

Uno de los mecanismos de acción propuestos para explicar el efecto protector del DADS se relaciona con su capacidad de activar al factor nuclear Nrf2. Aunque actualmente esté en discusión el mecanismo clásico de activación debido a los hallazgos encontrados por Li y colaboradores [2012], donde los agentes quimiopreventivos bloquean la degradación de Nrf2 por ubiquitinación al promover su disociación del complejo Keap1-Cul3-Rbx1, favoreciendo su translocación al núcleo y su asociación con proteínas de la familia Maf de manera que el nuevo complejo formado pueda reconocer el elemento de respuesta antioxidante (ARE) ubicado en la región promotora de los genes regulados por Nrf2 e inducir así su transcripción [Bryan et al., 2013].

En este estudio se encontró que los niveles de Nrf2 se encuentran incrementados significativamente en corteza frontal, 2 h después de administrar el DADS a una dosis de 25 mg/kg i.p en comparación con los animales del grupo control. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Chen y colaboradores [2004] quienes observaron que el tratamiento con DADS de células HepG2 incrementó los niveles de Nrf2. A pesar de que en el grupo IR los niveles del factor Nrf2 fueron similares a los del grupo CT a las 2 h después del inicio de la reperfusión, esto no fue suficiente para atenuar el daño celular que se produce por este evento.

Una de las principales propiedades que tienen los compuestos organosulfurados del ajo, es su capacidad de inducir la actividad de enzimas de fase 1 y 2. En estudios previos se ha demostrado que este efecto es el responsable de proteger al organismo del reto tóxico al que se encuentra expuesto diariamente [Fisher et al., 2007; Fukao et al., 2004]. La inducción de estas enzimas es a través de la activación del receptor constitutivo de androsterona (CAR) o por la activación del factor de transcripción Nrf2, que como se observó en este estudio el tratamiento con DADS lo activa. Por otro lado, ya se ha reportado que el DADS es capaz de incrementar significativamente la actividad de las enzimas relacionadas con la detoxificación de xenobióticos y moléculas pro-oxidantes, como la NADPH quinona oxidoreductasa 1 (NQ1), la γ -glutamylcistein sintetasa (GCS), la hemoxigenasa 1 (HO-1), la GPx, entre otras [Fisher et al., 2007; Fukao et al., 2004]. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto del DADS sobre las enzimas antioxidantes en tejido cerebral, ya que solo hay reportes en tejido hepático, renal,

pulmonar e intestinal [Guyonnet et al., 1999]. Por ello en este trabajo se evaluó el efecto del DADS sobre la inducción de estas enzimas en corteza frontal, cuando los animales se sometieron a IR. Los resultados obtenidos muestran que el DADS es capaz de inducir enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH a las 24 h de reperusión, como la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRx), estas enzimas oxidan el GSH al metabolizar el H_2O_2 y posteriormente lo reducen, respectivamente, para obtener nuevamente GSH. En este estudio se observó que la enzima GRx incrementó su actividad en los grupos de animales DADS e IR+DADS con respecto al grupo CT e IR, respectivamente, concordando con los resultados que obtuvo Huh y colaboradores [1988] quienes observaron que el DADS 20 mg/Kg administrado en ratas es capaz de incrementar significativamente la actividad de la enzima GRx. Por otro lado, la enzima GPx se incrementó significativamente tras la administración del DADS, este dato concuerda con el que obtuvieron Fukao y colaboradores [2004] quienes observaron que el DADS incrementó ligeramente la actividad de la GPx. Por otro lado, no se observó un cambio significativo en la actividad de las enzimas CAT y GST y a diferencia de los resultados obtenidos por Guyonnet y colaboradores [1999] el DADS no incrementó la actividad de la GST.

Estos datos sugieren que el posible efecto protector brindado por el DADS podría estar relacionado con el consumo y la regeneración de GSH en el tejido cerebral, por ello se decidió cuantificar los niveles de GSH.

El GSH es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina. Debido a su estructura química, participa en una gran cantidad de procesos como el transporte de aminoácidos, la síntesis de nucleótidos, la detoxificación de xenobióticos y la neutralización de especies oxidantes en la célula [Pastore et al., 2003]. En el cerebro el GSH juega un papel muy importante pues representa una de las principales defensas antioxidantes de este órgano que es muy susceptible al daño por estrés oxidante [Dringen, 2000]. El metabolismo del glutatión en el cerebro se encuentra básicamente regulado por dos procesos que son la síntesis *de novo* y el consumo. La síntesis *de novo* se regula a través de la enzima γ -glutamylcistein sintetasa (GCS) y el consumo a partir de las enzimas GPx y GST.

Se ha propuesto que el cálculo de la relación GSH/GSSG representa un marcador del estatus de estrés oxidante en la célula [Pastore et al., 2003]. Nuestros resultados muestran que la relación de ambas especies se encuentra incrementada en el grupo DADS a diferencia del grupo IR, indicando que el DADS mejora el estatus de estrés oxidante cuando es administrado al inicio de la reperusión. Sin embargo, los resultados

obtenidos no señalan que existan diferencias significativas entre estos dos grupos. Los resultados anteriores concuerdan con los que se obtuvieron en la actividad enzimática, pues al existir un incremento en la actividad de las enzimas encargadas de metabolizar y regenerar al GSH, los niveles de esta molécula también se encuentran incrementados en los animales que recibieron tratamiento con DADS durante el proceso de IR. Estos datos además nos sugieren que el posible efecto neuroprotector del DADS durante la IR podría estar asociado al metabolismo del GSH a través de las enzimas GPx y GRx, propiciando que las especies reactivas generadas sean neutralizadas de por el GSH que está siendo consumido y regenerado. Aunque no debe descartarse la participación de las enzimas que sintetizan al GSH, las cuales podrían ser evaluadas en estudios posteriores.

CONCLUSION

El DADS fue capaz de proteger el cerebro contra el daño inducido por la isquemia y la reperfusión y de mejorar el estatus neurológico cuando fue administrado en una dosis de 25 mg/kg i.p al inicio de la reperfusión. Dicho efecto podría estar asociado con su actividad de antioxidante indirecto ya que indujo la activación del factor Nrf2, incremento la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GRx y mostró una tendencia al incrementar el estado antioxidante celular al aumentar el cociente GSH/GSSG en las células.

BIOBLOGRAFIA

1. Aguilera P, Chánez M, Ortiz A, León D, Barrera D, Espinoza M, Villeda J, Sánchez A, Maldonado P. 2010. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine*. 17(2-3): 241-247.
2. Alderton W, Cooper C, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*. 357(3): 593-615.
3. Alexandrova ML, Bochev PG, Markova VI, Bechev BG, Popova MA, Danovska MP, Simeonova VK . 2005. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radical Biology and Medicine*. 39(3): 297-316.
4. Alrajeh S, Alkali N. 2008. Genetics of Ischemic Stroke. *Neurosciences*. 13(4): 343-349.
5. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A 3rd, Goldstein L, Hennerici M, Rudolph A, Sillese H, Simunovic L, Szarek M, Welch K, Zivin J.. 2006. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *The New England Journal of Medicine*. 355(6): 549-559.
6. Angelucci F, Baiocco P, Brunori M, Gourlay L, Morea V, Bellelli A. 2005. Insights into the catalytic mechanism of glutathione S-transferase: The lesson from *Schistosoma haematobium*. *Structure*. 13(9): 1241-1246.
7. Arriza J, Eliasof S, Kavanaugh M, Amara S. 1997. Excitatory aminoacid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(8): 4155-4160.
8. Atkins W, Wang R, Bird A, Newton D, Lu A. 1993. The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. *Journal of Biological Chemistry*. 268(26): 19188-19191.
9. Bayir H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*. 33(12): S498-S501.

10. Beckman J, Carson M, Smith C, Koppenol W. 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*. 364(6438): 584.
11. Benarroch E. 2010. Glutamate transporters: diversity, function and involvement in neurologic disease. *Neurology*. 74(3): 259-264.
12. Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo E. 2008. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends in Pharmacology Sciences*. 29(5): 268-275.
13. Bolaños J, Moro M, Lizasoain I, Almeida A. 2009. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorder and stroke: Therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61(14): 1299-1315.
14. Bruhn T, Levy L, Nielsen M, Christensen T, Johansen F, Diemer N. 2000. Ischemia induced changes in expression in the astrocyte glutamate transporter GLT1 in hippocampus of the rat. *Neurochemistry International*. 37(2-3): 277-285.
15. Bryan H, Olayanju A, Goldring C, Park B. 2012. The Nrf2 cell defense pathway: Keap-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*. 85(6): 705-717.
16. Caplan L. 2009. *Caplan's stroke: A clinical approach*. 4^o edición. Saunders Elsevier. Philadelphia.
17. Chan P. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 27(6): 1124-1129.
18. Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59(3): 527-605.
19. Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair S, Li W, Kong A. 2004. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: Effect of chemical structure and stress signals. *Free Radical Biology and Medicine*. 37(10): 1578-1590.
20. Chung L. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: Allyl cysteine, alline, allicine and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food*. 9(2): 205-213.

21. Claiborne S, Mendis S, Mathers C. 2009. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance and monitoring. *The Lancet Neurology*. 8(4): 345-354.
22. Coultrap J, Vest R, Ashpole N, Hudmon A, Ulrich B. 2011. CaMKII in cerebral ischemia. *Acta Pharmacologica Sinica*. 32(7): 86-872
23. Danbolt N. 2001. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 65(1): 1-105.
24. Dichgans M. 2007. Genetics of ischaemic stroke. *The Lancet Neurology*. 6: 149-161.
25. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*. 22(9): 391-397.
26. Doyle K, Simon R, Poore M. 2008. Mechanism of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 55(3): 310-318.
27. Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 62(6): 649-671.
28. Durukan A, Tatlisumak T. 2007. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 87(1): 179-197.
29. Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathology*. 34(4): 495-516.
30. Fisher C, Augustine L, Maher J, Nelson D, Slitt A, Klaassen C, Lehman-McKeeman L, Cherrington N. 2007. Induction of drug metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane receptor and nuclear factor E2-related factor 2. *Drug Metabolism and Disposition*. 35(6): 995-1000.
31. Flora S. 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2(4): 191-206.
32. Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T. 2004. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food and Chemical Toxicology*. 42(5): 743-749.

33. Green R, Odergren T, Ashwood T. 2003. Animals models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends in Pharmacological Sciences*. 24(8): 402-408.
34. Grysiewicz R, Thomas K, Pandey D. 2008. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: Incidence, prevalence, mortality and risk factors. *Neurologic Clinics*. 26(4): 871-895.
35. Gupta R, Singh M, Sharma A. 2003. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Food and Chemical Toxicology*. 48(2): 209-215
36. Guyonnet D, Siess M, Le Bon A, Suschetet M. 1999. Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 154(1): 50-58.
37. Habig W, Pabst M, Jakoby W. 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130-7139.
38. Hajnóczky G, Csordás G. 2010. Calcium signalling: Fishing out molecules of mitochondrial calcium transport. *Current Biology*. 20(20): R888-R891.
39. Hayes M, Beiser A, Kase C, Scaramucci A, D'Agostino R, Wolf P. 2003. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: The Framingham study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 12(3): 119-126.
40. Hissin P, Hilf R. 1976. A Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*. 74(1): 214-226
41. Huh K, Park J, Lee S. 1988. Effect of diallyl disulfide on the hepatic glutathione reductase activity. *Archives in Pharmacological research*. 11(4): 273-277.
42. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010. INEGI Mujeres y hombres en México 2010. México. P 15.
43. Jones D, Adams R, Brown T, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson T, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho P, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger V, Rosamond W,

- Sacco R, Sorlie P, Roger V, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J. 2010. Heart disease and stroke statistics – 2010 update: A report from American Heart Association. *Journal of the American Heart Association*. 121(7): e46-e215.
44. Kaspar J, Niture S, Jaiswal A. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap 1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 47(9): 1304-1309.
45. Kirshner H. 2009. Differentiating ischemic stroke subtypes: risk factors and secondary prevention. *Journal of the Neurological Sciences*. 279(1-2): 1-8.
46. Koh S, Kwon H, Park K, Ko J, Kim J, Hwang M, Yum Y, Kim O, Kim J, Kim H, Do B, Kim K, Kim H, Roh H, Yu H, Jung H, Kim S. 2005. Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Molecular Brain Research*. 133(2): 176-186.
47. Kristián T, Siesjö B. 1998. Calcium in ischemic cell death. *Stroke*. 29(3): 705-718.
48. Li Y, Paonessa J, Zhang Y. 2012. Mechanism of chemical activation of Nrf2. *Journal Plos One*. 7(4): 1-7.
49. Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*. 79(4): 1432-1516.
50. Lo E, Dalkara T, Moskowitz M. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature Reviews Neuroscience*. 4(5): 399-415.
51. Longa E, Weinstein P, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 20(1): 84-91.
52. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
53. Lu H, Sue C, Yu C, Chen S, Chen G, Chung J. 2004. Diallyl disulfide induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 42(10): 1543-1552.
54. Manzanero S, Santro T, Arumugam T. 2013. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. *Neurochemistry International*. 62(5): 712-718.

55. Mathers C, Loncar D. 2005. Updated projections of global mortality and burden of diseases, 2002-2030: data sources, methods and results, World Health Organization. 1-130.
56. Mass M, Safdieh J. 2009. Ischemic stroke: Pathophysiology and principles of localization. *Neurology*. 13(1): 2-16.
57. Mehta A, Prabhakar M, Kumer P, Sharma P. 2013. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*. 698(1-3): 6-18.
58. Mongin A. 2007. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology*. 14(3-4): 183-193.
59. Mori A, Liu J, Wang X, Kawai M. 1994. Free radical scavenging by brain homogenate: implication to free radical damage and antioxidant defense in brain. *Neurochemistry International*. 24(3): 201-207.
60. Nishizawa Y. 2001. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences*. 69(4): 36-381.
61. Olmez I, Ozyurt H. 2012. Reactive oxygen species in ischemic cerebrovascular disease. *Neurochemistry International*. 60(2): 208-212.
62. Pai E, Schulz G. 1983. The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*. 258(3): 1752-1757.
63. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*. 333(1): 19-39.
64. Platt S. 2007. The role of glutamate in central nervous system health and disease—a review. *Veterinary Journal*. 173(2): 278-286.
65. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D. 2001. *Neuroscience*. 2ª edición. Sunderland. Massachusetts.
66. Putnam C, Arvai A, Bourne Y, Tainer J. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic system. *Journal of Molecular Biology*. 296(1): 295-309.

67. Sims N, Muyderman H. 2010. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1802(1): 80-91.
68. Smith W. 2004. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *Journal of Interventional Radiology*. 15(1-2): S3-S12.
69. Sun X, Guo T, He J, Zhao M, Yan M, Cui F, Deng Y. 2006. Simultaneous determination of diallyl trisulfide and diallyl disulfide in rat blood by gas chromatography with electron capture detection. *Pharmazie*. 61(12): 985-988.
70. Switala J, Loewen P. 2002. Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 401(2): 145-154.
71. Tsai C, Chen H, Sheen L, Lii C. 2012. Garlic: Health benefits and actions. *Biomedicine*. 2(1): 17-29.
72. Uruno A, Motohashi H. 2011. The Keap1-Nrf2 system as an *in vivo* sensor for electrophiles. *Nitric Oxide*. 25(2): 153-160.
73. Wong K. 1999. Risk factors of early death in acute ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. A prospective hospital-based study in Asia. *Stroke*. 30(11): 2326-2330.