



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LA SAC (S-ALILCISTEÍNA) ACTIVA EL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN Nrf2 EN HIPOCAMPO E INCREMENTA
LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN
ESTRIADO, HIPOCAMPO Y CORTEZA FRONTAL
CEREBRAL TRAS UN ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN
CRÓNICA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ÚRZULA MONSERRAT FRANCO ENZÁSTIGA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: DR. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: Profesor: DRA. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ

SECRETARIO: Profesor: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

2° SUPLENTE: Profesor: DRA. MARIA ELENA BRAVO GOMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA, “MANUEL VELASCO SUÁREZ”,
LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL**

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL PROYECTO DEL ICYTDF/299/2012

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 A LA ALUMNA DURANTE EL PERIODO DE SEPTIEMBRE DE 2013 A AGOSTO DE 2014.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez

SUSTENTANTE (S):

Úrzula Monserrat Franco Enzástiga



A mis padres





ABREVIATURAS

ARE	Elemento de respuesta antioxidante (Antioxidant Response Element)
CAT	Catalasa
DL50	Dosis letal 50
EAE	Extracto de ajo envejecido
ERO	Especie(s) reactiva(s) de oxígeno
ERN	Especie(s) reactiva(s) de nitrógeno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
Keap1	Proteína-1 ECH asociada como Kelch (Kelch-like erythroid cell derived protein with CNC homology (ECH)-associated protein 1)
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)- related factor 2)
O₂^{•-}	Radical anión superóxido
•OH	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Anión peroxonitrato
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•]	Radical peroxilo
SAC	S-alilcisteína
SOD	Superóxido dismutasa



ÍNDICE GENERAL

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	3
	1. Estrés oxidante y nitrosante.....	3
	2. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN).....	4
	3. ERO y sus fuentes	6
	4. ERN y sus fuentes	9
	5. Consecuencias del estrés oxidante y nitrosante.....	10
	6. Sistemas antioxidantes.....	13
	7. Enzimas antioxidantes y detoxificantes.....	14
	7.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	14
	7.2. Catalasa (CAT).....	15
	7.3. Glutación peroxidasa (GPx).....	16
	7.4. Glutación reductasa (GR).....	17
	7.5. Glutación S-transferasa (GST).....	18
	8. Enfermedades neurodegenerativas.....	18
	9. Enfermedades neurodegenerativas y su relación con el estrés oxidante.....	21
	10. La S-alilcisteína (SAC) y el extracto de ajo envejecido (EAE).....	23
	11. Actividad biológica de la SAC.....	28
	12. Vía Nrf2-Keap1.....	30
III.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	37
IV.	HIPÓTESIS.....	39
V.	OBJETIVOS.....	39
	1. Objetivo general.....	39
	1.1. Objetivos particulares.....	39



VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1. Reactivos	40
1.1. Síntesis de la S-alilcisteína.....	40
2. Animales.....	41
3. Esquema de administración de la SAC.....	41
4. Método experimental.....	41
4.1. Preparación de extractos nucleares a partir del tejido.....	41
4.1.1. Determinación de la activación de Nrf2.....	42
4.2. Preparación del tejido para determinación de actividades enzimáticas.....	42
4.2.1. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).....	43
4.2.2. Actividad de la glutatión reductasa (GR).....	43
4.2.3. Actividad de la catalasa (CAT).....	43
4.2.4. Actividad de la superóxido dismutasa total (SOD).....	44
4.2.5. Actividad de la glutatión S-transferasa (GST).....	44
5. Análisis estadístico.....	45
VII. RESULTADOS.....	46
1. Efecto de la SAC sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2.....	46
2. Efecto de la SAC en la actividad de enzimas antioxidantes...	47
3. Efecto de la SAC en enzima de fase II GST.....	51
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	53
IX. CONCLUSIÓN.....	59
X. PERSPECTIVAS.....	60
XI. LITERATURA CITADA	61





I. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son resultado del metabolismo celular normal de las células aerobias. El sistema antioxidante intrínseco de la célula juega un papel decisivo en la prevención de la pérdida de la homeostasis redox que podría llevar a la muerte celular. Sin embargo, el desequilibrio en los sistemas de defensa antioxidante, la sobreproducción endógena de ERO o los estímulos extrínsecos que generen especies reactivas pueden producir el evento conocido como estrés oxidante, donde se observa un desbalance en la producción de especies oxidantes con respecto a los antioxidantes en la célula. El estrés oxidante se ha relacionado directamente con enfermedades crónico-neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre otras, cuya incidencia ha ido incrementando con el paso del tiempo. En años recientes ha aumentado el interés por los nutraceuticos, moléculas presentes en los alimentos que proporcionan efectos benéficos a la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de las enfermedades, por lo que pueden ser utilizados como potenciales herramientas preventivas o terapéuticas en contra de las enfermedades neurodegenerativas. La S-alilcisteína (SAC) es el compuesto organosulfurado más abundante del extracto de ajo envejecido (EAE). Sus propiedades neuroprotectoras han sido demostradas en diferentes paradigmas neurotóxicos, lo cual puede atribuirse a su amplio perfil antioxidante y antiinflamatorio.

Debido a lo anterior, se evaluó el efecto antioxidante del nutraceutico SAC en un modelo crónico en la corteza frontal cerebral, el estriado y el hipocampo en ratas macho Wistar. Se determinó su efecto sobre la actividad de enzimas antioxidantes y de fase II, así como la activación del factor de transcripción Nrf2. Para ello, los animales fueron tratados durante tres meses con SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg *i.g.*) cada 24 h. Nrf2 fue activado por la SAC en el hipocampo, y no se observaron cambios significativos en el estriado ni en la corteza frontal. Por otro lado, la SAC incrementó significativamente la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa



(GPx), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en hipocampo, estriado y corteza frontal; no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima de fase II, glutatión S-transferasa (GST). Estos resultados sugieren que, en el hipocampo el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes podría estar asociado con la capacidad de la SAC para inducir la activación del factor de transcripción Nrf2; sin embargo, en el estriado y la corteza frontal el incremento observado en las actividades enzimáticas podría deberse a la posible activación de otras vías mediadas por la SAC puesto que no se encontraron diferencias significativas en la activación del factor Nrf2. Para comprobar lo anterior, se requieren más estudios.



II. INTRODUCCIÓN

1. Estrés oxidante y nitrosante

Bajo condiciones fisiológicas normales, las células de los organismos mantienen un constante balance de óxido-reducción mientras conservan el equilibrio entre la producción de especies oxidantes/nitrosantes generadas del metabolismo celular normal y la defensa antioxidante, proceso denominado *homeostasis redox*. Normalmente, la homeostasis redox asegura que la célula responda apropiadamente a estímulos internos y externos [Trachootham *et al.*, 2008]. Sin embargo, el estado redox de la célula puede alterarse, resultando en un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno (ERO/ERN) y la capacidad antioxidante de la célula, proceso denominado *estrés oxidante/nitrosante*.

El concepto de *estrés oxidante* fue introducido por primera vez por Helmut Sies, quien lo definió como un desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes en favor de las primeras generando un proceso que potencialmente causa daño celular y que mantiene un radio de oxidantes/antioxidantes > 1 [Sies, 1997].

Un proceso paralelo es el *estrés nitrosante*, definido como el radio de agentes nitrosantes/antioxidantes > 1 [Klandorf & Van-Dike, 2012]. El concepto de estrés nitrosante surge bajo la premisa de que las interacciones entre agentes oxidantes y nitrosantes generan productos que son más tóxicos que los reactivos por sí mismos. La nitración (adición de un grupo nitro, $-\text{NO}_2$, a un compuesto) y la nitrosilación (unión de un grupo nitrosilo, $-\text{N}=\text{O}$, a un grupo tiol o a un metal) están involucradas predominantemente con mecanismos de daño celular, aunque las ERN también tienen papeles importantes en el metabolismo celular [Ljubuncic *et al.*, 2010].

El estrés oxidante/nitrosante se caracteriza por ocurrir de manera local en áreas específicas del organismo [Klandorf & Van-Dike, 2012]. Este estado deletéreo en las células puede originarse por a) una deficiencia del sistema de defensa antioxidante o b) por un incremento en la formación de ERO/ERN y la incapacidad del sistema antioxidante para contrarrestarlo [Valko *et al.*, 2007]. La alta reactividad y el poder



oxidante de las ERO/ERN provoca peroxidación lipídica y daño a la membrana celular, proteínas, ácidos nucleicos [Sies, 1991] y carbohidratos [Singh *et al.*, 2004]. Por ello, el estrés oxidante/nitrosante tiene un papel crucial en una gran variedad de condiciones patológicas incluyendo el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas [Birben *et al.*, 2012], así como en el proceso de envejecimiento [Singh, 2004; Jacobson & Duchon, 2002]. Altos niveles de estrés oxidante/nitrosante pueden causar depleción de ATP, evasión del proceso de muerte celular por apoptosis y muerte por necrosis [Beal, 2005].

2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y de Nitrógeno (ERN)

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la vida de los organismos aerobios. Esta molécula se caracteriza por ser un bi-radical, puesto que sus orbitales moleculares externos se encuentran ocupados por dos electrones desapareados con spins paralelos en un orbital π diferente. La estructura electrónica del O_2 favorece la adición de electrones de uno a uno en cada orbital π disponible reduciéndose en el proceso y por lo tanto, funcionando como un fuerte agente oxidante [Thannickal & Fanburg, 2000]. Es así como el O_2 da lugar a las ERO que son moléculas químicamente reactivas [Rege *et al.*, 2013] resultantes de la reducción parcial del O_2 como consecuencia del metabolismo celular [Birben *et al.*, 2012].

Las ERO incluyen a) *radicales libres* que se definen como iones o moléculas capaces de existir en forma independiente, que se caracterizan por tener en el último orbital uno o más electrones desapareados. Debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, los radicales libres son altamente reactivos y al reaccionar con otra molécula, se reducen ganando estabilidad. Sin embargo, al estabilizarse, desestabilizan a las moléculas vecinas generando una reacción en cadena [Borek, 2001; Birben *et al.*, 2012] y b) especies *no radicales*, agentes oxidantes fácilmente convertibles en radicales libres [Borek, 2001; Sierra *et al.*, 2004].

De forma paralela, las ERN son moléculas que derivan del metabolismo celular e incluyen una variedad de especies que contienen O_2 y nitrógeno que pueden causar, no solo oxidación, sino también nitración y nitrosilación de biomoléculas [Ogino &



Wang, 2007]. Al igual que las ERO, las ERN se dividen en dos grupos: a) radicales libres y b) no radicales, tal y como se muestran en la **tabla 1** [Kohen & Niska, 2002].

Tabla 1. Nombre y símbolo/fórmula química de las principales especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)

	ERO	Símbolo	ERN	Símbolo
Radicales	Anión superóxido Hidroxilo Alcoxilo Peroxilo	$O_2^{\cdot-}$ OH^{\cdot} RO^{\cdot} ROO^{\cdot}	Óxido nítrico Dióxido de nitrógeno	NO^{\cdot} NO_2^{\cdot}
No radicales	Peróxido de hidrógeno Ácido hipocloroso Ozono Oxígeno singulete	H_2O_2 $HClO$ O_3 $^1\Delta O_2$	Peroxonitrito Ácido nitroso Cation nitrosilo Anión nitroxilo Cation nitronio Trióxido de dinitrógeno	$ONOO^-$ HNO_2 NO^+ NO^- NO_2^+ N_2O_3

Además de su naturaleza química, las especies reactivas son diferentes en cuanto al valor de su vida media. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso ($HClO$) presentan tiempos de vida media del orden de minutos; los radicales peroxilo (ROO^{\cdot}) y óxido nítrico (NO^{\cdot}), del orden de segundos; los radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y alcoxilo (RO^{\cdot}), así como el oxígeno singulete ($^1\Delta O_2$) del orden de microsegundos y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) del orden de nanosegundos [Kehrer, 2000].

En concentraciones fisiológicas, las ERO y ERN tienen funciones en procesos celulares como son: defensa en contra de agentes infecciosos, señalización celular



al fungir como segundos mensajeros para promover la proliferación y supervivencia celular, restablecimiento de la homeostasis redox y regulación de la apoptosis [Valko *et al.*, 2007; Thannickal & Fanburg, 2000].

La formación de las ERO y las ERN puede ser tanto enzimática como no enzimática [Thannickal & Fanburg, 2000]. Hay procesos biológicos que las liberan como un subproducto del metabolismo y otros que las generan como parte de una vía de transducción de señales o como mecanismo de defensa celular [Morgan & Liu, 2011].

3. ERO y sus fuentes

Las tres ERO de mayor importancia fisiológica son el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), los cuales se forman como intermediarios en el proceso de reducción univalente de una molécula de O_2 a H_2O en el metabolismo celular (**Fig. 1**) [Marín-García, 2011].

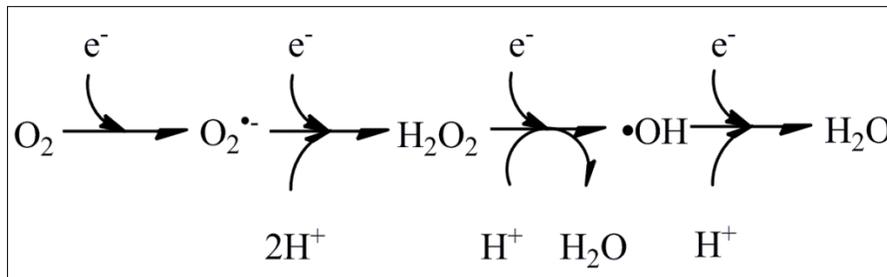


FIGURA 1. Esquema de la reducción univalente del O_2 . La transferencia sucesiva de 4 electrones convierte al oxígeno molecular (O_2) en H_2O y produce tres intermediarios reactivos, el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), los cuales, en exceso, pueden dañar a la célula.

Las fuentes de ERO endógenas en la célula son diversas, siendo la respiración aerobia en la mitocondria la principal, puesto que del 2 al 5% del O_2 consumido durante la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP impulsada por la transferencia de electrones al O_2) no es reducido bivalentemente, sino solo parcialmente, dando lugar al $O_2^{\cdot-}$.



Esto ocurre cuando las velocidades de entrada y transferencia de electrones en la cadena respiratoria no están ajustadas, de tal manera que aumenta el $O_2^{\cdot-}$ en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo c reductasa), a medida que el radical ubiquinona parcialmente reducido, $\cdot Q^{\cdot-}$, cede un electrón al O_2 [Nelson & Cox, 2009]. La adición de un electrón al O_2 genera el radical $O_2^{\cdot-}$, ya sea por “fuga de electrones” durante la fosforilación oxidativa, o por catálisis enzimática mediada por oxidasas como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. Esta última se encuentra en leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos activados. Cuando ocurre la fagocitosis éstas células producen el $O_2^{\cdot-}$, que tiene actividad bactericida. Por otra parte, la xantina oxidasa es miembro de la familia de flavoproteínas con hierro-molibdeno y tiene un papel importante en el catabolismo de las purinas [Colín *et al.*, 2012].

Dado que el $O_2^{\cdot-}$, por su carga negativa, carece de capacidad para difundir a través de las membranas lipídicas, esta especie reactiva tiende a permanecer en el compartimento en el que es producida. Sin embargo, no permanece por mucho tiempo en los compartimentos puesto que es inestable en medios acuosos, siendo su tiempo vida media de 10^{-6} s. La inestabilidad del $O_2^{\cdot-}$ se refiere a que esta especie reactiva es rápidamente dismutada a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de las diferentes isoformas de superóxido dismutasa (SOD), o en ausencia de éstas, ocurre la dismutación espontánea del radical $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 [Thannickal & Fanburg, 2000]. Además, el H_2O_2 puede ser producido por oxidasas como la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la monoaminoxidasa (MAO) [Birben *et al.*, 2012]. Los peroxisomas son otra fuente importante de H_2O_2 , al ser éste un subproducto de la degradación de ácidos grasos [Borek, 2001]. Los peroxisomas contienen a la enzima Acil-CoA oxidasa que al llevar a cabo su función genera H_2O_2 [Thannickal & Fanburg, 2000].

En presencia de iones cloruro, el H_2O_2 es convertido en ácido hipocloroso (HClO), el cual es altamente oxidante y juega un papel importante en la eliminación de patógenos de las vías respiratorias.



Dado que el H_2O_2 no es un radical libre, goza de mayor estabilidad que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y es capaz de difundir a través de la membrana mitocondrial hacia el citoplasma. El H_2O_2 es un agente oxidante más débil que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ [Thannickal & Fanburg, 2000]; sin embargo esta ERO puede producir $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción de Fenton en presencia de iones metálicos como el Fe^{2+} y el Cu^+ [Sayre *et al.*, 2008].

El $\cdot\text{OH}$ es el radical más reactivo encontrado en los sistemas biológicos; es capaz de reaccionar con todas las biomoléculas y dado su tiempo de vida media *in vivo* de 10^{-9} s puede atacar rápidamente las macromoléculas cercanas a nanómetros de su lugar de formación [Valko *et al.*, 2007; Sayre *et al.*, 2008].

No solo la mitocondria y los peroxisomas fungen como fuentes de ERO, sino también el retículo endoplásmico a través de la familia de enzimas b5 y citocromo p450, que oxidan ácidos grasos insaturados y xenobióticos y, reducen el O_2 produciendo $\text{O}_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 . Además, la envoltura nuclear contiene citocromo oxidasa y sistemas de transporte electrónico de función desconocida. Se ha postulado que la fuga de electrones de estos sistemas enzimáticos puede dar lugar a ERO, las cuales podrían dañar el ADN.

La auto-oxidación de moléculas pequeñas como la dopamina, la adrenalina, las flavinas y las hidroquinonas puede fungir como una importante fuente de ERO. De manera alternativa, la dopamina puede ser desaminada por la MAO dando lugar al metabolito no tóxico ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) y a H_2O_2 [Lotharuis & Brundin, 2002]. Se ha propuesto que el efecto prooxidante de la dopamina podría estar implicado en la inducción de apoptosis en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson [Thannickal & Fanburg, 2000].

4. ERN y sus fuentes

El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es una molécula pequeña con un electrón desapareado generada en los tejidos biológicos por la familia de isoenzimas óxido-nítrico sintasa (NOS). Las isoformas de NOS incluyen: la NOS neuronal (nNOS) y la NOS endotelial (eNOS), las cuales se expresan de manera constitutiva y requieren de la



formación de un complejo Ca^{2+} - calmodulina para su activación. La isoforma inducible (iNOS) ejecuta su actividad de manera independiente al Ca^{2+} . En presencia de O_2 , estas isoenzimas catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina con la formación de $\text{NO}\bullet$ a través de una reacción oxidativa [Valko *et al.*, 2007; Ljubuncic *et al.*, 2010].

El $\text{NO}\bullet$ actúa como una molécula de señalización biológica en una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la regulación del tono vascular y la presión sanguínea, así como mecanismos de defensa y regulación inmune. En un ambiente acuoso, el $\text{NO}\bullet$ tiene un tiempo de vida media de pocos segundos y como también es liposoluble, difunde a través del citoplasma y las membranas plasmáticas. A partir del $\text{NO}\bullet$ se origina su forma oxidada, el radical nitrosonio (NO^+). El NO^+ puede recibir un segundo electrón procedente de la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ mediado por la enzima SOD, de manera que se forma el ONOO^- , el cual puede descomponerse en el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) y en el ión nitronio (NO_2^+) [Repetto & Reppetto, 2009]. A nivel celular, el $\text{NO}\bullet$ ha sido ampliamente implicado en el estrés nitrosante, efecto deletéreo que se ha asociado a la inhibición del desarrollo celular y la apoptosis [Ljubuncic *et al.*, 2010].

Las células del sistema inmune producen tanto $\text{O}_2^{\bullet-}$ como $\text{NO}\bullet$ durante procesos inflamatorios. Bajo estas condiciones, estas especies pueden reaccionar para producir cantidades significativas del altamente oxidante, anión ONOO^- , el cual es un potente agente oxidante que puede causar fragmentación del ADN y lipoperoxidación [Valko *et al.*, 2007].

Uno de los blancos del $\text{NO}\bullet$ es la citocromo c oxidasa, enzima terminal en la cadena transportadora de electrones, la cual es inhibida por el $\text{NO}\bullet$ en una manera reversible y competitiva con el O_2 . La consecuente reducción de la actividad de la citocromo c oxidasa lleva a la liberación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, el cual bajo ciertas circunstancias reacciona con el radical $\text{NO}\bullet$ para formar ONOO^- . Dado que la constante de velocidad de la reacción del $\text{NO}\bullet$ con $\text{O}_2^{\bullet-}$ es mayor que la de la reacción llevada a cabo por cualquiera de las isoformas de SOD para dismutar el $\text{O}_2^{\bullet-}$, el ONOO^- se



formará en cualquier célula o tejido en donde ambas especies existan simultáneamente. El ONOO^- puede aceptar un protón generando ONOOH , el cual por ruptura homolítica genera $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$. Adicionalmente, el $\text{NO}\bullet$ en presencia de O_2 puede generar N_2O_3 , mientras que si reacciona con $\bullet\text{OH}$ genera ácido nitroso (HNO_2).

Además de las fuentes endógenas de ERO y ERN (**Fig. 2**), nuestros organismos están expuestos a fuentes exógenas que dan lugar a especies reactivas. Dentro de éstas fuentes se encuentran la radiación ionizante, el ozono, el tabaco y los medicamentos [Birben *et al.*, 2012]. Por ejemplo, la radiación UV puede generar por excitación del O_2 el oxígeno singulete ($^1\Delta\text{O}_2$) [Borek, 2001].

5. Consecuencias del estrés oxidante y nitrosante

Cuando las células de los organismos se ven desbordadas por un exceso de especies reactivas, la consecuencia química directa es el daño a las biomoléculas, que se convierten en la diana de las ERO y las ERN. Los lípidos poliinsaturados de las membranas biológicas y las lipoproteínas son altamente susceptibles al daño mediado por estrés oxidante [Valko *et al.*, 2007; Sayre *et al.*, 2008]. El proceso de ataque y daño a los lípidos poliinsaturados se debe a reacciones en cadena mediadas por radicales libres como el altamente reactivo $\text{OH}\bullet$ y el hidroperoxilo ($\text{HOO}\bullet$), que para estabilizarse inician la abstracción de un átomo de hidrógeno del metileno bis-alílico de los lípidos poliinsaturados formando un radical lipídico. La presencia de un doble enlace adyacente a un grupo metileno en los lípidos hace débil al enlace $-\text{CH}$ y por lo tanto el hidrógeno es más susceptible de ser abstraído. El radical lipídico es estabilizado por rearreglo molecular del doble enlace para formar un dieno conjugado que, en presencia de O_2 genera el radical peroxilo ($\text{ROO}\bullet$). El $\text{ROO}\bullet$ es por sí mismo capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado generando una cadena de propagación de la auto-oxidación de los ácidos grasos conocida como lipoperoxidación. Como consecuencia de este daño a los lípidos se forman algunos hidropéroxidos lipídicos inestables que se degradan, generando como productos terminales principales



malondialdehído y 4-hidroxinonenal [Gutteridge, 1995; Sayre *et al.*, 2008]. Estos aldehídos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos resultando en mutaciones y alteraciones funcionales de la célula [Trachootham *et al.*, 2008].

La acción de ERO/ERN como el ONOO^- sobre las proteínas puede resultar en la oxidación de cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos, aunque la cisteína y la metionina son mayormente susceptibles a la acción de las ERO/ERN generando entrecruzamiento entre proteínas u oxidación por nitrosilación. La oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos como la lisina y arginina resulta en la formación de grupos carbonilo, los cuales pueden formarse también por vías como la lipoperoxidación y la glicosilación. Esta última se refiere al daño a las proteínas que ocurre durante eventos de estrés oxidante severo, en el que hay formación de aductos entre los grupos amino libres de las proteínas y productos secundarios de la oxidación de azúcares [Sayre *et al.*, 2008; Valko *et al.*, 2007; Trachootham *et al.*, 2008].

El $\text{OH}\cdot$ es conocido por reaccionar con las bases púricas y pirimídicas del ADN, así como con sus azúcares puesto que éstos componentes contienen O y N como centros nucleofílicos. La lesión más estudiada del ADN es la formación de la 8-hidroxi-deoxi-guanosina (8-OH-dG), una modificación permanente en el ADN que representa el primer paso en procesos de mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento [Valko *et al.*, 2007]. El $\text{NO}\cdot$ y el ONOO^- también pueden reaccionar con las bases del ADN e inducir rupturas de una sola hebra [Trachootham *et al.*, 2008].

El exceso de ERO/ERN tiene un gran potencial para causar daño en lípidos, proteínas y al ADN. Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por las ERO/ERN, los organismos aerobios han desarrollado elaborados mecanismos de defensa antioxidante [Borek, 2001; Trachootham *et al.*, 2008].

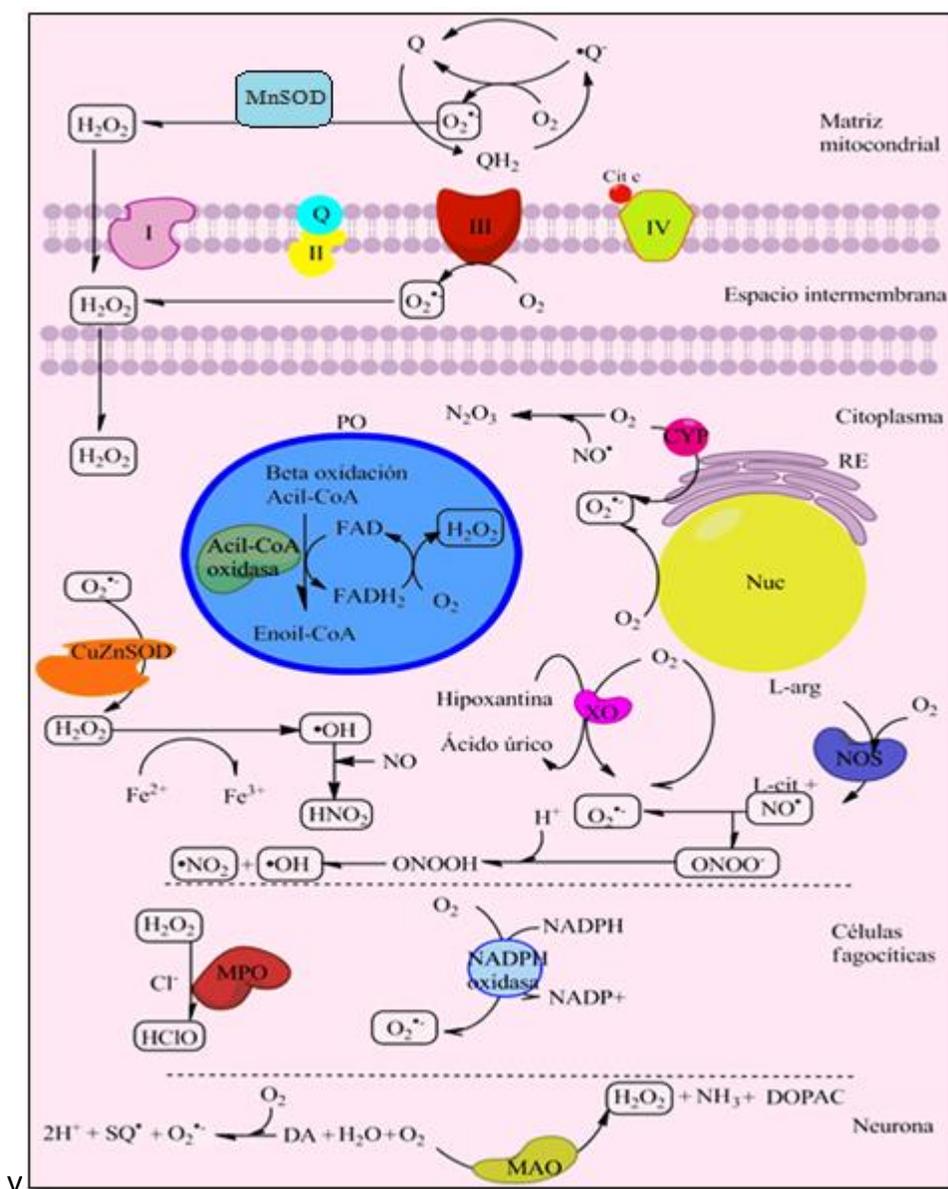


FIGURA 2. Fuentes intracelulares de ERO y ERN. Las principales fuentes de especies reactivas descritas en el texto se encuentran representadas en esta figura. Abreviaturas: MnSOD, manganeso superóxido dismutasa; I, II, III y IV, complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria de electrones; Cit c, citocromo c; Q, quinona; QH₂, ubiquinol; •Q[•], radical ubiquinona parcialmente reducido; FAD, flavín adenín dinucleótido; FADH, flavín adenín dinucleótido hidrogenado; RE, retículo endoplásmico; PO, peroxisoma; Nuc, núcleo; CuZnSOD, cobre-zinc superóxido dismutasa; XO, xantina oxidasa; L-arg, L-arginina; L-cit, L-citrulina; NOS, óxido nítrico sintasa; MPO, mieloperoxidasa; NADP⁺, nicotidamida adenín dinucleótido fosfato; NADPH, nicotidamida adenín dinucleótido fosfato hidrogenado; MAO, monoamino oxidasa; SQ[•], radical semiquinona; DA, dopamina; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenil acético; NH₃, amoniaco.



6. Sistemas antioxidantes

El concepto de *antioxidante* fue introducido por primera vez en 1995 por Halliwell y Gutteridge, quienes lo describieron como “aquella sustancia que al estar presente en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de éste” [Halliwell & Gutteridge, 1995]. Sin embargo, esta definición es inadecuada en cierto sentido puesto que, algunas sustancias son consideradas en la actualidad como antioxidantes aunque no se encuentran en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, por lo que la definición correcta es “cualquier sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidante de una molécula diana [Veskoukis *et al.*, 2012; Halliwell & Gutteridge, 2007].

Las células están equipadas con sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que eliminan el exceso de ERO y ERN con el fin de mantener la homeostasis redox. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen: a) antioxidantes exógenos, tomados de la dieta, como el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides, entre otros y b) antioxidantes endógenos que son aquellos sintetizados en el organismo, como la bilirrubina y el glutatión reducido (GSH). El GSH es un tripéptido altamente abundante en el citosol y sintetizado por la γ -glutamyl-cisteinil ligasa (GCL). El papel protector del glutatión en contra del estrés oxidante consiste en que: a) es un cofactor de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx) o de detoxificantes como la glutatión-S-transferasa (GST); b) participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; c) atrapa especies reactivas como el $\text{OH}\cdot$ y el $^1\Delta\text{O}_2$ y d) regenera antioxidantes como la vitamina C y E [Valko *et al.*, 2007].

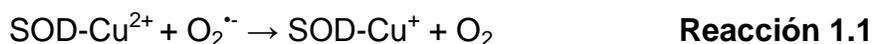
Por otro lado, el sistema antioxidante enzimático incluye proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Además la célula cuenta con enzimas que se encargan de detoxificar compuestos electrofílicos, conocidas como enzimas de fase II, como la familia de enzimas de la GST (**Fig. 3**).



7. Enzimas antioxidantes y de fase II

7.1. Superóxido Dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

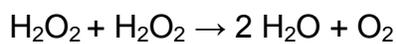
Las SODs son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ para producir H_2O_2 y O_2 . La reacción enzimática consiste en dos semirreacciones, una reacción oxidativa en la que el sustrato, $O_2^{\cdot-}$ se oxida a O_2 y una reductiva en la que O_2 se convierte en H_2O_2 (reacción 1.1 y 1.2).



Las SODs tienen una variedad de grupos prostéticos y se clasifican en función de éstos. La forma isoenzimática principal de las SOD es la CuZnSOD o SOD1 (codificada por el gen *SOD1* en la región 21q22.11), proteína homodimérica de 32 KDa que ha sido encontrada en el citosol de casi todas las células eucarióticas aunque también, puede encontrarse en el núcleo. El átomo de cobre es necesario para la actividad catalítica de la enzima mientras que el átomo de zinc la estabiliza. La SOD1 representa la primera línea de defensa en contra de las ERO. La alteración de la SOD1 ha sido asociada con diferentes patologías en particular con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica [Giroto *et al.*, 2014].

La MnSOD (codificada por el gen *SOD2* en la región 6q25.3) es una proteína tetramérica localizada principalmente en la mitocondria que protege este organelo del $O_2^{\cdot-}$ producido durante el transporte electrónico mitocondrial [Zelko *et al.*, 2002; Trachootham *et al.*, 2008].

Un exceso de SOD no acompañado por la actividad de la CAT puede resultar perjudicial para el organismo, puesto que el peróxido de hidrógeno se acumularía [Gil, 2010]. Por otra parte, se ha reportado que el gen *SOD1* cuenta con el elemento regulador ARE, de forma que su transcripción es inducida por el factor de



Reacción 2

En esta reacción ocurre la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno, funcionando una como donador y otra como aceptor de electrones. La reacción catalizada por esta enzima ocurre en dos pasos:

- 1) La catalasa se oxida por una molécula de peróxido de hidrógeno formando un intermediario llamado compuesto I, el cual se caracteriza por tener un grupo ferroxilo con Fe^{IV} y un radical catiónico de porfirina. En este paso del mecanismo de reacción se produce una molécula de agua (reacción 3.1).
- 2) El compuesto I es reducido por otra molécula de H_2O_2 de tal forma que la catalasa regresa a su estado inicial produciendo agua y una molécula de O_2 (reacción 3.2).



Cuando el H_2O_2 se encuentra en bajas concentraciones, la CAT actúa como peroxidasa, de manera que el compuesto I puede oxidar el metanol, el etanol, el formato o el nitrato utilizando una molécula de H_2O_2 como oxidante [Díaz, 2003].

El gen *CAT* que codifica para la catalasa se localiza en la región 13 del brazo corto del cromosoma 11 (11p13) en humanos. Estudios recientes han demostrado que la transcripción de la CAT está mediada por factores de transcripción de homeostasis redox como son Nrf2 y NfκB [Sadi *et al.*, 2014]. La regulación por Nrf2 se debe a que, como se ha reportado en la literatura, el gen *CAT* contiene la secuencia ARE (Antioxidant Response Element), elemento al que se une Nrf2 para inducir la transcripción de la CAT [Lee *et al.*, 2003].

7.3. Glutati6n Peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)

La GPx es una enzima importante en el sistema de defensa antioxidante que funciona en la detoxificaci6n de per6xidos e hidroper6xidos org6nicos. La mayoría de las GPx's son enzimas tetraméricas y cada uno de sus mon6meros idénticos



tiene una masa de 22 KDa [Arthur, 2000]. Un residuo de selenocisteína se encuentra en el sitio catalítico de la enzima y la disponibilidad de selenio regula, en parte, la actividad de la misma [Baker *et al.*, 1993]. La GPx cataliza la reducción del H₂O₂ a H₂O (reacción 4). La selenocisteína participa directamente en la donación del electrón al sustrato de peróxido oxidándose en el proceso. La enzima luego utiliza el grupo sulfhidrilo del GSH como un donador de hidrógeno para regenerar la selenocisteína de la enzima [Mugesh *et al.*, 2001].



Desde la identificación de la GPx en 1957, se han tipificado 5 isoformas en mamíferos: la GPx-1 citosólica (codificado por el gen *GPX* en la posición 3p21.3) que puede metabolizar H₂O₂ y algunos peróxidos orgánicos, incluyendo colesterol e hidroperóxidos de ácidos grasos; la GPx-2 (codificado por el gen *GPX* en la posición 14q24.1) o gastrointestinal (GPxGi) que tiene sustratos similares a la GPx-1 y es citosólica; la GPx-3 (codificado por el gen *GPX* en la posición 5q23) o extracelular que se encuentra principalmente en el plasma; la GPx-4 (codificado por el gen *GPX* en la posición 19p13.3) que es una enzima monomérica que previene la oxidación de los fosfolípidos de membrana y se encuentra en citosol, mitocondria y núcleo; y la GPx-5 (codificado por el gen *GPX* en la posición 6p22.1) específica del epidídimo cuya actividad es menor a 0.1% de la GPx-1 [Mézes *et al.*, 2003; Arthur, 2000; Trachootham, 2008].

La GPx se encuentra dentro de las enzimas reguladas por la activación del factor de transcripción Nrf2 [Thimmulappa *et al.*, 2002], aunque se ha propuesto que el factor NFκB, también puede regular su transcripción dependiendo del ambiente redox [Sadi *et al.*, 2014]. Se encuentra reportado que la GPx-4 cuenta con el elemento enhancer ARE [Lee *et al.*, 2003].

7.4. Glutación Reductasa (GR) (EC 1.6.4.2)

La GR es una flavoenzima dependiente de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del GSSG a GSH (reacción 5). La GR



es una enzima dimérica cuyos monómeros idénticos se encuentran unidos entre sí por un puente disulfuro y tienen una masa de 51 KDa cada uno. Cada una de las subunidades de la GR tiene FAD en su centro activo. Su localización es citosólica y mitocondrial [Pai & Schulz, 1983].

Es la principal enzima encargada de mantener elevada la relación GSH/GSSG.



El gen *GSR* (localizado en la posición 8p21.1) codifica para la GR. Estudios en fibroblastos cardíacos indican que la expresión de este gen se encuentra regulada por el factor Nrf2 [Zhu *et al.*, 2005].

7.5. Glutación S-Transferasa (GST) (EC 2.5.1.18)

Las GSTs son una gran familia de enzimas diméricas esenciales para la detoxificación de compuestos electrofílicos, ya sean de origen endógeno o exógeno. Estas enzimas catalizan la conjugación de los compuestos electrofílicos con GSH a través de la formación de un enlace tioéter entre el átomo de azufre del GSH y el sustrato, generando compuestos menos reactivos y más solubles. Basado en la secuencia aminoacídica y especificidad por los sustratos, se han identificado 8 clases de GSTs citosólicas o solubles (GST alpha, mu, pi, theta, sigma, zeta, kappa y omega) en mamíferos [Sherratt *et al.*, 2001; Kitteringham *et al.*, 2003]. De estas isoformas de la GST, hay reportes que indican que los genes que codifican para la GST mu, pi y omega cuentan con el elemento regulador ARE en su promotor [Lee *et al.*, 2003].

8. Enfermedades neurodegenerativas

Las investigaciones realizadas durante las últimas décadas han puesto de manifiesto la amplia participación del estrés oxidante en diversos estados patológicos, sobre todo en aquellos cuya incidencia incrementa con la edad, como es el caso de algunas enfermedades neurodegenerativas [Sayre *et al.*, 2008].



Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de padecimientos crónicos del sistema nervioso, caracterizadas por una severa, lenta e irreversible pérdida de células en áreas discretas del cerebro, además de metabolismo energético alterado y eventos inflamatorios. Los trastornos neurodegenerativos muestran creciente prevalencia e incidencia a nivel mundial por lo que significan un reto a la sociedad científica considerando que, estas enfermedades no solo merman la calidad de vida del paciente y de los familiares, sino que también tienen repercusiones socioeconómicas importantes [Singh *et al.*, 2004].

Hay cuatro procesos clave que, en general, acompañan a las enfermedades neurodegenerativas y que se encuentran interrelacionados entre sí. Entre ellos se encuentran: a) el estrés oxidante y nitrosativo, vía la formación de ERO y ERN [Santamaría & Jiménez, 2005], que fungen como factores desencadenantes de la iniciación de las cascadas de muerte celular responsables de la degeneración de células del sistema nervioso en las enfermedades neurodegenerativas y eventos neurotóxicos [Nunoruma *et al.*, 2007]; b) acumulación de proteínas mal plegadas o no plegadas que puede inducir un incremento de ERO y ERN; c) pérdida de la homeostasis de metales de transición como hierro y cobre, que participan en la formación de ERO, por lo que se sugiere que un exceso de estos metales es responsable del daño oxidante y d) disfunción mitocondrial. Dado que la fosforilación oxidativa en la mitocondria es la mayor fuente de ERO, existe una relación directa entre las anomalías mitocondriales de las enfermedades neurodegenerativas y el estrés oxidante [Sayre *et al.*, 2008].

De estos procesos clave presentes en los eventos neurodegenerativos, el estrés oxidante tiene un papel ubicuo en la neurodegeneración puesto que el cerebro es particularmente vulnerable a sus efectos deletéreos considerando: a) su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados fácilmente peroxidables; b) su alta tasa de consumo de O₂ considerando que, el cerebro representa tan sólo 2% de la masa corporal total y utiliza aproximadamente 20% del O₂ total consumido por el organismo; c) su alta concentración de metales de transición que favorece la formación de ERO vía las reacciones de Fenton y Haber-Weiss; d) su escasez



relativa de enzimas antioxidantes en comparación con otros órganos; e) el papel limitante de la barrera hematoencefálica (BHE) para la difusión de antioxidantes como la vitamina E en el cerebro [Shukla *et al.*, 2011; Nunoruma *et al.*, 2007]; y f) las regiones cerebrales con alto contenido en catecolaminas son excepcionalmente vulnerables al daño oxidante, puesto que la adrenalina, noradrenalina y dopamina pueden auto-oxidarse espontáneamente a radicales libres o pueden ser metabolizados a radicales por enzimas endógenas como la MAO. Todas estas características crean un efecto acumulativo, de tal manera que las neuronas y las células gliales son altamente susceptibles a la destrucción por ERO/ERN [Shukla *et al.*, 2011]. Es por lo anterior que el uso de antioxidantes que penetren eficientemente la barrera hematoencefálica se encuentra justificado.

Además de la alta susceptibilidad al daño que por sus características tiene el cerebro, el proceso de envejecimiento, pieza clave de algunas enfermedades neurodegenerativas, perjudica a los sistemas de defensa antioxidante endógenos. Por ejemplo, durante el proceso normal de senescencia, los organismos muestran una reducción en la síntesis de GSH. Además, en los humanos los grupos carbonilo, que funcionan como marcadores de oxidación de las proteínas, incrementan con la edad en todos los tejidos, incluyendo el cerebro. También por el proceso de envejecimiento, el daño al ADN mitocondrial incrementa 15 veces si se compara con el daño al ADN nuclear [Lotharius & Brundin, 2002].

Las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington son trastornos neurodegenerativos que representan un serio problema de salud en la actualidad. La *enfermedad de Alzheimer (EA)* es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas y la acumulación de depósitos extracelulares de β -amiloide (A β) en el cerebro anterior basal, el hipocampo y la corteza, así como marañas neurofibrilares compuestas por agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada; esta enfermedad afecta principalmente a la población adulta de edad avanzada. La *enfermedad de Huntington (EH)* es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por la progresiva pérdida de neuronas, predominantemente en el



cuerpo estriado y que afecta la corteza cerebral en la etapa tardía de la enfermedad. La *enfermedad de Parkinson (EP)* es un desorden neurodegenerativo, gradual de curso prolongado que se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta, con la formación concomitante de inclusiones de proteínas intraneuronales (cuerpos de Lewy). Esta enfermedad también se caracteriza por el agotamiento de noradrenalina y serotonina en ciertos núcleos del tronco cerebral y la homeostasis alterada del hierro. Además se ha reportado que la incidencia de la EP incrementa en más del 90% de los casos después de los 60 años de edad [Van Den Eeden *et al.*, 2004]. La evidencia de estrés oxidante en estas enfermedades es altamente persuasiva [Singh *et al.*, 2004].

9. Enfermedades neurodegenerativas y su relación con el estrés oxidante

Diversos estudios no sólo han evidenciado el amplio espectro de daño por estrés oxidante en las biomoléculas de las células cerebrales en la EA, sino que también han mostrado que el estrés oxidante ocurre en etapas muy tempranas del curso de la enfermedad (deterioro cognitivo leve). Otra de las características prominentes de la EA es la disfunción mitocondrial, de forma que la mitocondria deja de ser eficiente en la producción de ATP pero genera ERO [Singh *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013]. Adicionalmente, se ha reportado que en la EA ocurre una disminución significativa de la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT, la GPx y la hemo-oxigenasa 1 (OH-1) en corteza frontal y parietal [Wang *et al.*, 2013].

Desde 1924, el metabolismo alterado del hierro ha sido implicado en la fisiopatología de la EP puesto que, se han encontrado niveles incrementados de hierro en la sustancia nigra, región anatómica más vulnerable a degenerarse en esta enfermedad. El Fe^{2+} media el daño oxidante a través de la transferencia de un electrón mediante la reacción de Fenton que lleva a la producción del radical hidroxilo ($OH\bullet$), el cual puede oxidar a los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos que se encuentren en la cercanía. Adicionalmente, se ha reportado que en la EP ocurre un funcionamiento anormal del complejo I de la cadena respiratoria de electrones, lo que posiblemente incrementa la producción de $O_2^{\bullet-}$ al alterar el flujo de



electrones del NADH a la ubiquinona [Friedlich *et al.*, 2009]. Además, las neuronas de la sustancia nigra están particularmente más expuestas al daño por estrés oxidante debido a que la dopamina puede auto-oxidarse a pH fisiológico a especies como la quinona de dopamina (SQ•), $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . De manera alternativa, la dopamina puede ser metabolizada a ácido 3,4-dihidroxiacético (DOPAC) y H_2O_2 al ser desaminada por la monoamino-oxidasa (MAO) [Lotharius & Brundin, 2002]. Además, se ha reportado que los pacientes con Parkinson tienen un nivel reducido de GSH [Singh *et al.*, 2004].

Por otra parte, en la EH los parámetros de daño oxidante se han observado tanto en muestras de pacientes (suero y plasma) como en modelos animales. En tejidos post-mortem de individuos con EH, los niveles de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OH-dG), un marcador de daño oxidante del ADN y de malondialdehído, marcador de lipoperoxidación, se encuentran incrementados tanto en corteza como en estriado [Ribeiro *et al.*, 2012]. Adicionalmente, evidencias recientes indican que la disfunción mitocondrial es parte de la patogenia de la EH puesto que el complejo II y III de la cadena respiratoria tienen menor actividad en las células del estriado, lo cual sugiere un posible incremento de radicales libres que dañen el ADN mitocondrial [Shukla *et al.*, 2011]. Aunque el estrés oxidante no tiene un efecto tan profundo en la EH como en otras enfermedades como la EA y la EP, es evidente que las ERO y las ERN juegan un papel importante aunque no sean parte de la etiología de la enfermedad [Sayre *et al.*, 2008].

Dada la deletérea acción evocada por las ERO y ERN en las enfermedades neurodegenerativas y la falta de terapias efectivas para su prevención o tratamiento, el uso de un amplio espectro de antioxidantes como herramienta terapéutica ha ganado atención en la comunidad neurocientífica. Notablemente, las moléculas antioxidantes que exhiben propiedades de protección prominentes han sido encontradas en productos naturales como los alimentos y recientemente se les ha denominado nutraceuticos [García *et al.*, 2014].



10. La S-alilcisteína (SAC) y el extracto de ajo envejecido (EAE)

La S-alilcisteína (SAC) es un compuesto derivado de la planta *Allium sativum* perteneciente a la Familia Alliaceae, a la que se denomina popularmente como *ajo*. Originario de las estepas de Asia Central, esta especie ha sido cultivada por siglos con propósitos culinarios y medicinales. Al ajo se le cultiva principalmente en China, Egipto, Europa y México [Mikaili *et al.*, 2013]. Su histórico consumo en la medicina tradicional le atribuye efectos benéficos en el tratamiento de infecciones, resfriado, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Además el uso del ajo se ha correlacionado inversamente con riesgo de cáncer de diferentes tejidos en humanos y su efecto protector también ha mostrado la inhibición de carcinogénesis en diferentes modelos animales de cáncer [Borek, 2001; Omar & Al-Wabel, 2010; Chia-Wen *et al.*, 2012]. Adicionalmente, el ajo ha mostrado actividad biológica como agente antibiótico, antiviral, antimicótico, antiparasitario, antitrombótico, antiaterosclerótico, inmunomodulador, antioxidante, antihipertensivo, antiproliferativo, hipoglucemiante e hipolipemiante, además de que previene el envejecimiento [Omar & Al-Wabel, 2010; Weber *et al.*, 1992; Mikaili *et al.*, 2013; Imai *et al.*, 1994]. Estudios realizados sobre la composición química del bulbo de esta planta muestran que sus constituyentes más importantes son compuestos organosulfurados (COS) [Mikaili *et al.*, 2013]. La potente actividad biológica del ajo, así como su aroma y sabor característicos son conferidos por esta fuente particularmente rica de COS, la cual contempla aproximadamente 33 de ellos [Chia-Wen, 2012; Omar & Al-Wabel, 2010]. Las variaciones en los métodos de procesamiento del ajo pueden producir diversas preparaciones o suplementos dada su compleja composición química [Lawson, 1998]; cada una de las preparaciones provee beneficios específicos a la salud dependiendo de la cantidad de componentes activos, principalmente de COS, que contengan. Además del diente de ajo fresco, los ejemplos más comunes de preparaciones de ajo son el aceite de ajo, el polvo de ajo y el extracto de ajo envejecido (EAE) [Arnault *et al.*, 2005].

El EAE es un suplemento del ajo sin olor, que cuenta con gran cantidad de compuestos que han sido estudiados extensivamente por su amplia actividad



antioxidante y potencial protección a la salud; entre ellos se encuentran la SAC (0.62 mg/g de producto), su componente mayoritario y la *S-trans*-1-propenilcisteína (SPC) (0.37 mg/g de producto), que constituyen los compuestos organosulfurados más abundantes del EAE [Borek, 2001] (**Fig. 4**).

Además de SAC y SPC, este suplemento también contiene S-alilmercaptocisteína (SAMC) (0.14 mg/g de producto), alina (0.32 mg/g de producto), cicloalina (0.34 mg/g de producto), γ -glutamyl-S-alilcisteína (0.25 mg/g de producto), γ -glutamyl-S-trans-1-propenilcisteína (0.09 mg/g de producto) y cistina (0.01 mg/g de producto); así como algunos compuestos sin azufre incluyendo el ácido glutámico (1.2 mg/g de producto) y la arginina (2.2 mg/g de producto) [Lawson, 1996].

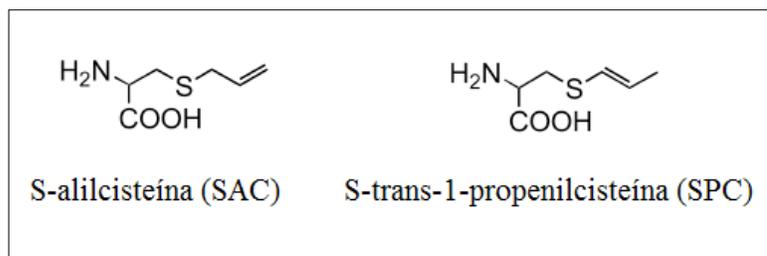


FIGURA 4. Estructuras de los componentes más abundantes del EAE con actividad antioxidante

El EAE surge de un proceso de extracción prolongado creado por la compañía Wakunaga of America que optó por diseñar un proceso de envejecimiento del ajo con el fin de evitar el fuerte e irritante olor del ajo fresco, así como efectos secundarios que generan tanto el ajo crudo como el aceite de ajo, como son la destrucción y retardo del crecimiento de la microflora del tracto digestivo [Borek, 2001].

El proceso de envejecimiento consiste en introducir dientes de ajo completos o en pequeñas piezas (2x2x1 cm) en tanques de acero inoxidable con una mezcla de extracción etanol-agua 1:4 y después de 20 meses, esta mezcla es filtrada y concentrada a temperatura ambiente [Colín *et al.*, 2012; Omar & Al-Wabel, 2010]. Durante este proceso algunos compuestos inestables y con olor intenso son



convertidos, a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en compuestos más estables, menos olorosos y con beneficios únicos. El cambio que ocurre durante el envejecimiento del ajo para la obtención de SAC y SPC consiste en la hidrólisis completa de las γ -glutamilcisteínas (**Fig. 5**). Durante los primeros 3 meses de envejecimiento, incrementa la cantidad de SAC y SPC sin embargo, durante los 17 meses restantes del proceso de envejecimiento, la cantidad de SAC en el EAE permanece constante, mientras que la SPC disminuye [Colín *et al.*, 2012].

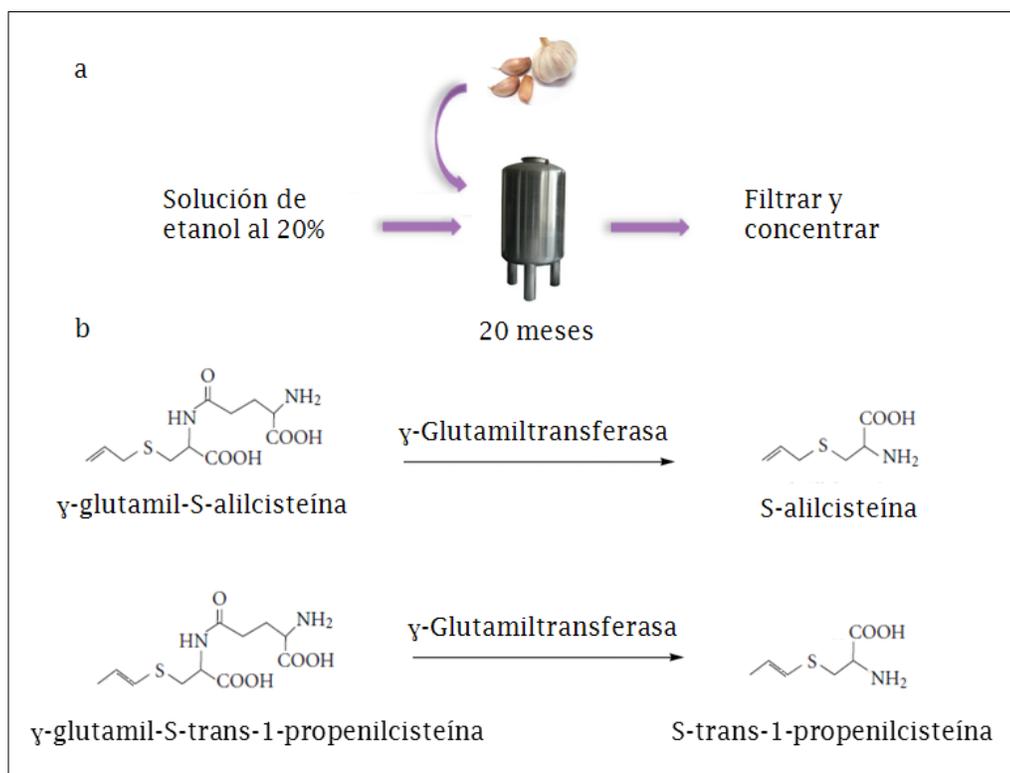


FIGURA 5. A) Condiciones del proceso de envejecimiento del ajo. B) Reacción de formación de los compuestos organosulfurados mayoritarios del EAE.

La SAC es un compuesto organosulfurado soluble en agua (1 g de SAC/14.7 mL de H₂O a 20°C) que se caracteriza por ser un polvo blanco cristalino con olor característico, no higroscópico y cuyo punto de fusión es de 223.3-223.7 °C. Su almacenamiento a 105°C por 24 h genera un ligero cambio de color en los cristales, de blanco a amarillo claro, sin embargo no ocurre ninguna transformación o descomposición, por lo que se le considera como un compuesto muy estable



[Maldonado *et al.*, 2011]. Dada esta estabilidad, la SAC ha sido utilizada para estandarizar los suplementos comerciales de EAE [Borek, 2001; Maldonado *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2007]. Además, bajo condiciones ácidas (HCl 6 N a 50°C por 5 días) no hay evidencia de ruptura del enlace C-S de la SAC de tal manera que, al pH del tracto gastrointestinal ésta puede ser absorbida sin cambios o productos de descomposición. Esto es diferente en condiciones básicas (NaOH 2 N a 50°C por 5 días), ya que la presencia de alilmercaptano y alilsulfuro como productos de descomposición indican la ruptura del enlace C-S [Kodera *et al.*, 2002].

A la SAC no solo se le encuentra en el EAE (7.8 μ moles/g en peso seco después de corregir con 40% de excipientes), sino también como un constituyente minoritario del ajo intacto (no más de 30 μ g/g en peso fresco) [Colín *et al.*, 2012; Kodera *et al.*, 2002], el ajo triturado [Chang-Kai & Fan-Dian, 2005] y la cebolla [Hsu *et al.*, 2004]. Además de la formación de la SAC por la hidrólisis mediada por la γ -glutamyltransferasa que ocurre durante el envejecimiento del ajo, este compuesto puede ser obtenido mediante síntesis química [Maldonado *et al.*, 2003b] (**Fig. 6**).



FIGURA 6. Síntesis de la S-alilcisteína a partir de la L-cisteína y el bromuro de alilo.

La SAC es considerada como uno de los componentes más importantes no tóxicos biológicamente activos del ajo [Chang-Kai & Fan-Dian, 2005]. En ratones, su toxicidad aguda es 30 veces menor que la de otros compuestos derivados del ajo como la alicina y el dialildisulfuro. La DL50 de la SAC es ≥ 8.8 g/Kg en diferentes mamíferos. Kodera y colaboradores [2002] llevaron a cabo un estudio de toxicidad subcrónica en ratas al administrar dosis desde 250 hasta 2000 mg/Kg por vía oral durante un mes. En este estudio algunos efectos negativos se observaron a dosis altas de SAC (≥ 500 mg/Kg). Por lo anterior, este estudio sugiere que la SAC administrada de manera crónica por vía oral podría ser segura a dosis ≤ 250 mg/Kg.



Estudios de farmacocinética en humanos demostraron que, al administrar un suplemento de ajo (500 mg de EAE conteniendo 0.67 mg de SAC) de manera aguda, el T_{max} de la SAC es de aproximadamente 1 h. A este tiempo, el contenido total de SAC alcanza 450 µg en suero, lo cual sugiere una alta biodisponibilidad. El tiempo de vida media encontrado para la SAC en humanos es mayor a 10 h y el de depuración mayor a 30 h. Además, la estabilidad de la SAC en la sangre es alta, puesto que su recuperación de la fracción plasmática es casi del 100% [Kodera *et al.*, 2002].

Chang-Kai y Fan-Dian [2005] realizaron un estudio farmacocinético de la SAC en ratas al administrar de manera aguda una dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg por vía oral y encontraron que la SAC alcanza su pico máximo de concentración en suero a los 30 min en todas las dosis estudiadas. Después de la administración oral, la farmacocinética de la SAC mostró un perfil de tres fases en el que la absorción y la distribución ocurren de manera muy rápida seguida de una fase de eliminación lenta. La biodisponibilidad absoluta de la SAC a las dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg por vía oral fue de 96.8, 95.6 y 91%, respectivamente, lo que muestra una rápida absorción y amplia distribución del compuesto.

Después de la administración aguda por vía oral de SAC (50 mg/kg), la C_{max} del compuesto se alcanza hasta los 30 min en diferentes tejidos, incluyendo el cerebro (C_{max} = 26.7 mg/Kg a los 30 min por vía *i.v.* y 24.2 mg/Kg por vía *i.g.*). El tiempo de vida media de eliminación varía entre tejidos. Luego de la administración oral, el hígado presenta el mayor tiempo de eliminación de 2.2 h, seguido por el corazón, pulmón y cerebro con 1.2 h [Yan & Zeng, 2005; Chang-Kai & Fan-Dian, 2005].

La N-acetil-S-alilcisteína (N-acetil-SAC) se ha identificado como el metabolito de la SAC en la orina de diferentes mamíferos, aunque también se han encontrado trazas de SAC (menos de 1%). Lo anterior indica que la SAC absorbida es metabolizada a N-acetil-SAC en hígado y riñón, regiones en donde se encuentra mayoritariamente la enzima N-acetiltransferasa. Se ha propuesto que cuando la SAC ha sido casi completamente eliminada del hígado, una alta concentración de N-acetil-SAC es



rápidamente retenida en el riñón y luego, una porción de ésta es deacilada por las acilasas de este órgano, siguiendo a esto un proceso de reabsorción de la SAC [Nagae *et al.*, 1994].

11. Actividad biológica de la SAC

La SAC ha recibido mucha atención por un gran número de investigadores quienes han estudiado sus efectos farmacológicos para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades. Se ha reportado un amplio espectro de propiedades antioxidantes evidenciadas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Estas propiedades se han asociado con su efecto benéfico como agente cardioprotector [Mostafa *et al.*, 2000; Padmanabhan & Mainzen-Prince, 2006], renoprotector [Maldonado *et al.*, 2003b; Cruz *et al.*, 2007], hepatoprotector [Mostafa *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2006], quimiopreventivo [Milner, 1996; Balasenthil & Nagini, 2000], anti-inflamatorio [Geng *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001], antihipertensivo [Cruz *et al.*, 2007], antihiperglucemiante [Saravanan *et al.*, 2009] y modulador de lípidos [Borek, 2001; Saravanan & Ponmurugan, 2010].

Parte de la capacidad antioxidante de la SAC puede explicarse por el grupo tiol en su estructura molecular, el cual tiene la característica de ser nucleofílico, es decir que puede donar fácilmente su protón a especies electrofílicas, neutralizándolas o haciéndolas menos reactivas. Por lo tanto, la SAC puede disminuir la reactividad de algunas ERO y ERN [Herrera-Mundo *et al.*, 2009]. Esta consideración fue apoyada por observaciones de Numagami y Ohnishi [2001], quienes demostraron que aquellos compuestos con grupos tioalilo, principalmente la SAC, exhibieron capacidad antioxidante en un modelo de isquemia cerebral en ratas a través de la inhibición de la lipoperoxidación y el estrés oxidante. Otros modelos de isquemia mostraron disminución de la disfunción mitocondrial y del estrés oxidante en el hipocampo tras la administración de SAC [Atif *et al.*, 2009], así como reducción del área de infarto y prevención de la muerte celular [Chun *et al.*, 2008] al inhibir la actividad de cinasas [Kim *et al.*, 2006].



Moriguchi y colaboradores [1996] encontraron que el grupo tioalilo de la SAC, no solo previene el daño por pérdida celular en un modelo de senescencia acelerada, sino que también, este nutraceutico tiene actividad neurotrófica al incrementar el número de conexiones axonales en neuronas de un cultivo hipocampal. Además, Nishiyama y colaboradores [2001] encontraron que la SAC fue capaz de restaurar el déficit de aprendizaje en un modelo de senescencia acelerada en ratones.

En modelos de Huntington, se encontró que la SAC atenúa la neurotoxicidad provocada por la administración de ácido quinolínico, un agente excitotóxico y prooxidante, en estriado en ratas [Pérez-Severiano *et al.*, 2004]; disminuye la lipoperoxidación y la disfunción mitocondrial mediada por la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico [Herrera-Mundo *et al.*, 2009; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2006], y reduce la lipoperoxidación evocada por el ácido quinolínico + ácido 3-nitropropiónico en sinaptosomas del cerebro en ratas [Pérez-De La Cruz *et al.*, 2006; Elinos-Calderón *et al.*, 2010].

La SAC también fue capaz de prevenir la progresión de la EA a través de su actividad como agente antioxidante [Javed *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011], antiamiloidogénico [Peng *et al.*, 2002; Chauhan & Neelima, 2006; Gupta & Rao, 2007; Tsai *et al.*, 2011], anti-inflamatorio [Chauhan & Neelima, 2006; Ray *et al.*, 2011] y antiglicativo [Tsai *et al.*, 2011].

Por otra parte, recientemente García y colaboradores [2014] encontraron que la SAC fue capaz de disminuir la pérdida de dopamina en estriado y sustancia nigra en un modelo de Parkinson al inducir daño con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP) en ratones. La SAC previno la disminución de los niveles del factor de transcripción Nrf2 y de las enzimas Mn-SOD y HO-1 en animales tratados con MPTP, así como la respuesta inflamatoria provocada por esta toxina. En los animales control, la SAC *per se* incrementa los niveles de estas dos enzimas [García *et al.*, 2014]. En apoyo a este concepto, se ha demostrado un aumento de gliosis y degeneración dopaminérgica en ratones Nrf2 *-/-*, lo que demuestra un importante papel del factor Nrf2 en el daño inducido por el MPTP en el modelo de



Parkinson [Innamorato *et al.*, 2010]. Otros modelos de Parkinson han demostrado que la administración de SAC disminuye la lipoperoxidación y la producción de ERO mediada por la neurotoxina MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinio) en ratones [Rojas *et al.*, 2011].

La amplia gama de propiedades antioxidantes de la SAC se han atribuido a su capacidad para: a) actuar como antioxidante directo al atrapar ERO y ERN incluyendo: radical $O_2^{\cdot-}$ [Kim *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2003b; Medina-Campos *et al.*, 2007], H_2O_2 [Ide *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 2003b; Medina-Campos *et al.*, 2007; Ide & Lau, 1999; Ho *et al.*, 2001], radical OH^{\cdot} [Kim *et al.*, 2001; Numagami & Ohnishi, 2001; Chung, 2006; Medina-Campos *et al.*, 2007, Maldonado *et al.*, 2011], anión $ONOO^-$ [Kim *et al.*, 2006; Medina-Campos *et al.*, 2007], $HClO$, $^1\Delta O_2$ y radical ROO^{\cdot} [Medina -Campos *et al.*, 2007] previniendo así la lipoperoxidación [Ide & Lau, 2001; Imai *et al.*, 1994] y la oxidación y nitración de proteínas [Ho *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006]; b) quelar iones metálicos implicados en la formación de ERO y ERN, como Fe^{2+} y Cu^{2+} [Dairam *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2004], c) incrementar los niveles de defensa antioxidante no enzimática (GSH) [Pinto *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2004], d) inhibir enzimas pro-oxidantes como la NADPH oxidasa [Cruz *et al.*, 2007; Gill & Wilcox, 2006; Colín *et al.*, 2012] y la óxido nítrico sintasa [Kim *et al.*, 2001] y e) inhibir la vía NFkB importante en procesos de inflamación [Geng *et al.*, 1997; Ide & Lau, 2001].

Sin embargo, también se ha propuesto que, para combatir el estrés oxidante, la SAC podría estar ejecutando un mecanismo como antioxidante indirecto, actuando como un inductor del factor de transcripción Nrf2 [Kalayarasan *et al.*, 2008; Colín *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014], regulador principal de la homeostasis redox de las células.

12. Vía Nrf2/Keap1

Dada la frecuente exposición de las células a insultos oxidantes tanto provenientes de fuentes intrínsecas como extrínsecas, las células poseen diversos sistemas de defensa altamente regulados que permiten la detoxificación y remoción del agente



oxidante con el fin de mantener condiciones óptimas de funcionamiento. La elegancia del sistema de defensa celular consiste en su capacidad para ajustarse a niveles crecientes de estrés a través de la regulación de la expresión de sus componentes. Esta respuesta adaptativa, en parte la lleva a cabo un conjunto de factores de transcripción, y hay evidencia creciente que indica que Nrf2 (factor de transcripción nuclear relacionada con NF-E2) es el regulador primario de este mecanismo de defensa celular inducible en respuesta al estrés celular [Copple, 2012]. Numerosas investigaciones se han encargado de demostrar que este factor está involucrado en la prevención y patogénesis de enfermedades complejas como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas [Lau *et al.*, 2012].

Nrf2 es un miembro de una subfamilia de proteínas básicas que posee un “zipper” característico o cierre de leucinas (bZip) en la región terminal. Posee una región homóloga a las proteínas cap ‘n’ collar (CNC) de *Drosophila*, altamente conservada entre las Nrf2 [Königsberg *et al.*, 2007]. Este factor de transcripción se expresa principalmente en hígado, riñón, piel, pulmón y tracto gastrointestinal [Copple, 2012] y poco en cerebro [Colín *et al.*, 2012].

La proteína Nrf2 (95-110 KDa) comprende 6 dominios Neh (Nrf2-ECH homology) altamente conservados. Dado que Nrf2 es un factor constitutivo en la mayoría de las células, su actividad se mantiene estrictamente regulada. Es por ello que el dominio Neh2 localizado en su posición N-terminal facilita la interacción con el regulador negativo Keap1 (Kelch-like erythroid cell derived protein with CNC homology (ECH)-associated protein 1) que secuestra a Nrf2 en el citoplasma bajo condiciones normales en la célula. En el dominio Neh2 también se encuentran 7 residuos de lisina (K) que son importantes para la ubiquitinación y degradación de Nrf2 (K44, K50, K52, K53, K56, K64, K68). Dado que la célula sintetiza y degrada Nrf2 de forma sistemática (tiempo de vida media de Nrf2 \approx 20 min), su control primario radica principalmente en su distribución subcelular más que en su síntesis de novo [Königsberg *et al.*, 2007]. El dominio Neh1 media la heterodimerización de Nrf2 a través del zipper de leucinas, así como la unión al ADN, mientras que los dominios



Neh4 y Neh5 permiten la transactivación de los genes diana de este factor [Copple, 2012]. Neh6 es un degrón no sensible al ambiente redox esencial para su degradación independiente de Keap1. Por otra parte, el dominio Neh3 se encarga de la activación transcripcional de Nrf2 [Silva-Islas *et al.*, 2012] (**Fig. 7**).

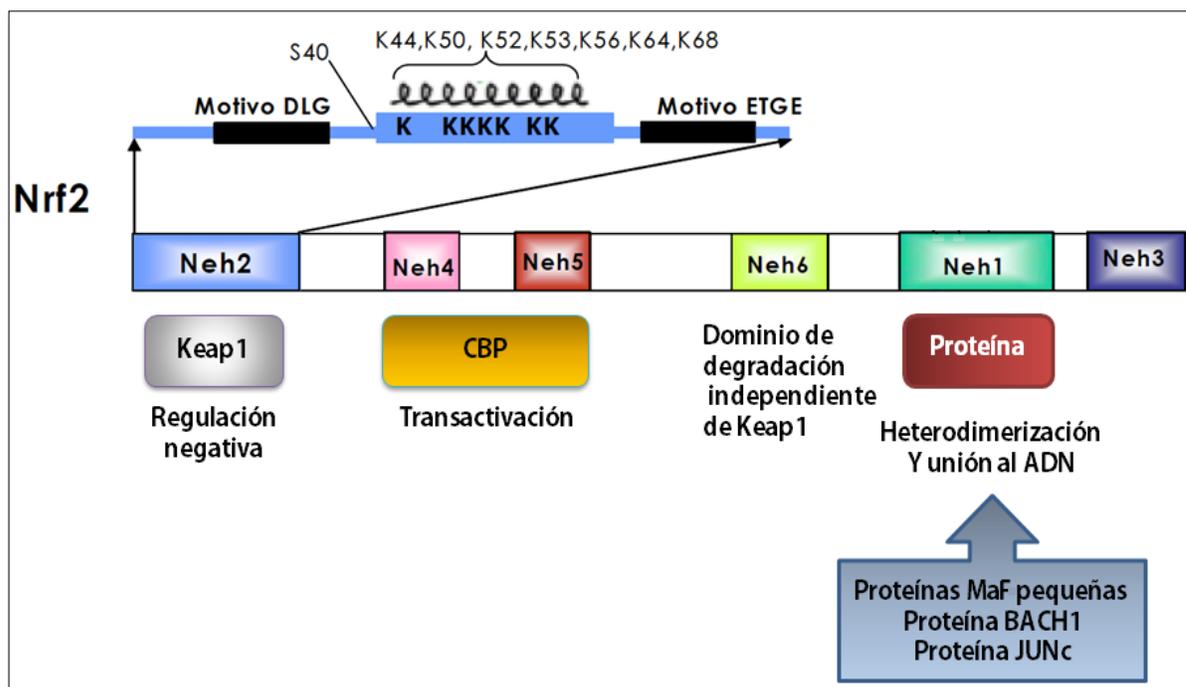


FIGURA 7. Dominios del factor de transcripción Nrf2. El dominio Neh2 es el sitio de unión a Keap1 mediante los motivos DLG y ETG. Este dominio cuenta con 7 residuos de lisina, los cuales son importantes para su ubiquitinación y degradación (K44, K50, K52, K53, K56, K64 y K68). Se ha propuesto que los dominios Neh4 y Neh5 se unen a la proteína CBP activando la transcripción. El dominio Neh6 permite la degradación de Nrf2 de manera independiente a la mediada por Keap1. El dominio Neh1 al contar con una región rica en leucinas permite la heterodimerización de Nrf2 con proteínas pertenecientes a la familia Maf pequeñas, BACH1 y JUNc, entre otras. Este dominio permite además la unión de Nrf2 a la secuencia de ADN consenso conocida como ARE (Elemento de respuesta antioxidante) para inducir la transcripción de genes regulados por esta secuencia regulatoria. Abreviaturas: DLG, dominio del baja afinidad; ETGE, dominio de alta afinidad; Nrf2, factor relacionado al factor nuclear eritroide-2; Neh1-6, dominios de homología Nrf2-ECH 1-6.

Por otro lado, la proteína Keap1 es un homodímero (80 KDa) que consta de cinco dominios, de los cuales dos son muy conservados; el primero de ellos es el dominio BTB/POZ (Bric-abrac, tramtrack, broad-complex/poxovirus zinc finger) que se



encuentra presente en proteínas que se unen a actina y el segundo es el dominio Kelch o DGR (double glycine repeat), a través del cual se une el dominio Neh2 a Keap1. Los otros dominios son NTR (región N-terminal), CTR (región C-terminal) y la región de intervención (IVR), la cual tiene residuos de cisteína, algunos de las cuales tienen mayor capacidad de reaccionar al encontrarse en una vecindad de aminoácidos básicos, de manera que, disminuye su pKa y aumenta su reactividad relativa. Keap1 se une a Nrf2 en una relación 2:1 a través de los sitios de reconocimiento de Nrf2: el motivo DLG (baja afinidad) y el motivo ETGE (alta afinidad) conocidos como pestillo y bisagra, respectivamente. Keap1 no sólo se encuentra compartiendo sus láminas- β con Nrf2 y la F-actina del citoesqueleto en la periferia del núcleo [Königsberg *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2004], sino que también funge como un adaptador de la ligasa Culina-3 (Cul-3) para dirigir la ubiquitinación y degradación de Nrf2 por proteosoma 26S (**Fig. 8**).

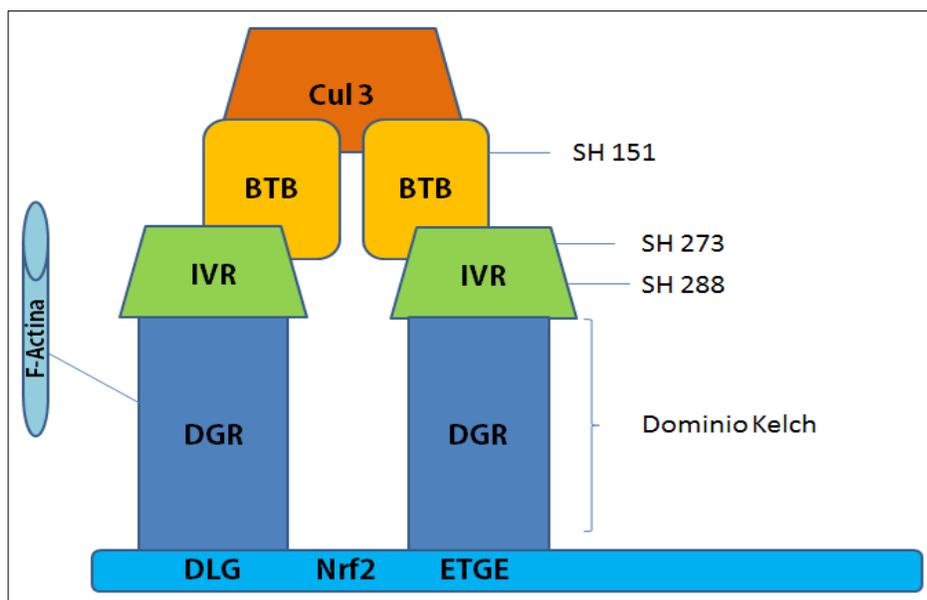


FIGURA 8. Dominios de la proteína Keap1. La proteína Keap1 se une a Nrf2 en forma de homodímero. Su dominio DGR es el sitio de unión a Nrf2 y a la F-actina. El dominio IVR contiene los residuos de cisteína -SH273 y -SH288 que pueden oxidarse y de ese modo censar el estado oxidante de la célula. Cul3 es la ligasa E3 que funge como adaptador de unión al proteosoma. Abreviaturas: Cul3, culina-3; BTB, dominio bric-abrac tramtrack; IVR, región de intervención; DGR, dominio de doble repetición de glicinas; DLG, dominio de baja afinidad; ETGE, dominio de alta afinidad; Nrf2, factor relacionado al factor nuclear eritroide-2.



Para ello, Keap1 actúa como sustrato adaptador del complejo Culina-3 dependiente de la ubiquitin-ligasa E3, uniendo Nrf2 a la proteína ring-box protein (ROC1/RBX1). Esta última recluta a la proteína E1 cargada con la ubiquitina, que es luego conjugada en una de las siete lisinas localizadas en el dominio Neh2 de Nrf2. La mutación de las lisinas del dominio Neh2 lleva a la estabilización de Nrf2 al inhibir la ubiquitinación dependiente de Keap1. La poli-ubiquitinación marca a Nrf2 para la degradación por el proteosoma 26S. Lo anterior puede en parte explicar el tiempo de vida media (20 min) de Nrf2 en condiciones basales y puede asociarse a las dificultades relacionadas a su detección bajo éstas condiciones en ciertos tipos celulares [Copple, 2012]. Se ha propuesto que la estabilización de Nrf2 puede estar dada por la disociación de Keap1 de la Cul3 y la promoción de degradación de Keap1 al inducir su ubiquitinación (K-298) (**Fig. 9**).

Se sabe que, la proteína Keap1 murina tiene 25 residuos de cisteína y la humana 27. Bajo condiciones de estrés o de inducción por moléculas electrófilas, las cisteínas esenciales de Keap1 actúan como sensores que, al modificarse resultan en la estabilización de Nrf2. Este factor de transcripción es fosforilado por cinasas como la PKC y subsecuentemente se transloca al núcleo, donde se heterodimeriza con una proteína de la familia Maf pequeña para posteriormente unirse a la secuencia ARE (Antioxidant Response Element) e inducir la transcripción de genes blanco que codifican para enzimas de fase II, proteínas antioxidantes y transportadores. ARE es una región reguladora amplificadora, o “enhancer” tipo cis, cuya secuencia consenso es 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (en donde los nucleótidos esenciales se encuentran designados con letras mayúsculas). Una vez que el heterodímero Nrf2-Maf se une a ARE, recluta co-activadores transcripcionales que promueven la transcripción vía la actividad intrínseca de histonas acetiltransferasas y la unión de componentes de la maquinaria transcripcional [Copple, 2012]. Por esta razón, este factor de transcripción es considerado como el guardián redox de la célula puesto que proporciona el nivel requerido de protección para las actividades celulares normales al regular la expresión constitutiva e inducible de numerosos genes que codifican para proteínas



antioxidantes y detoxificantes [Kawai *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2004], tales como la CAT, la GR, la SOD, la GPx y la GST [Zhu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Kim & Vaziri, 2010; Vaziri, 2012], entre otras.

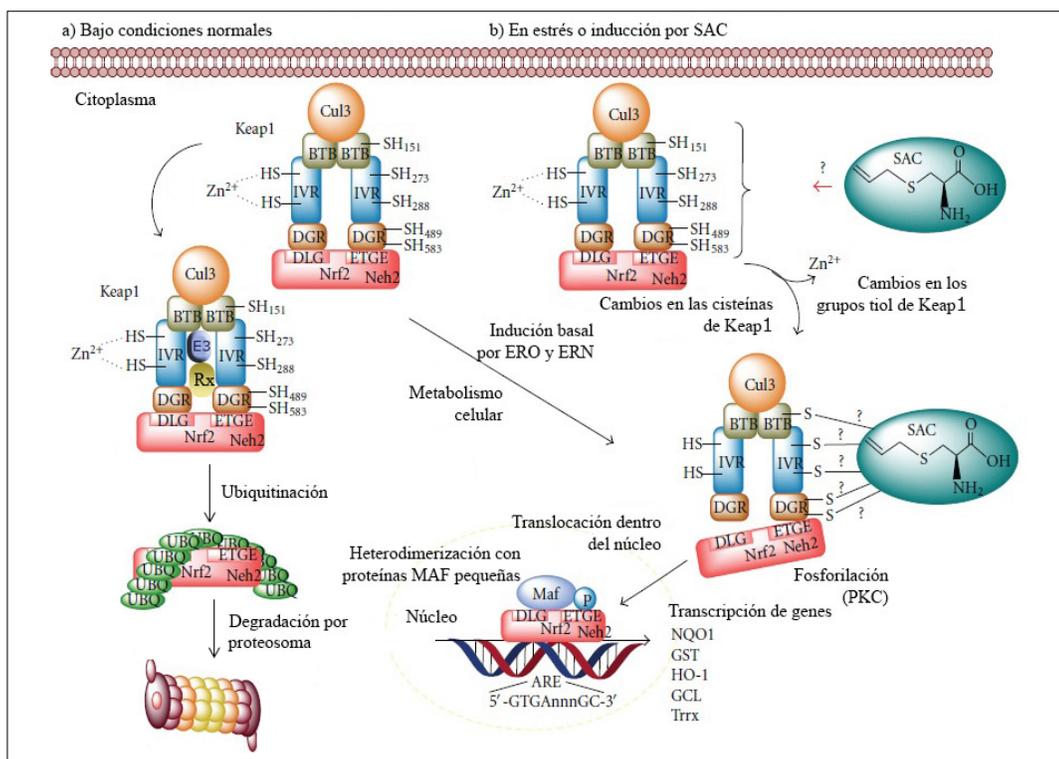


FIGURA 9. Regulación del factor de transcripción Nrf2 en condiciones basales y por efecto de especies reactivas e inductores (S-alilcisteína). En el panel izquierdo se observa que en condiciones basales el complejo Culina-3 dependiente de la ubiquitin-ligasa E3 se une a la proteína RING-box (Rx), la cual recluta a la ubiquitina que es luego conjugada en las lisinas localizadas en el dominio Neh2 de Nrf2 favoreciendo su degradación por proteosoma 26S. En el panel derecho se muestra que, bajo condiciones de estrés o inducción por moléculas como la SAC, las cisteínas de Keap1 sufren modificaciones que generan cambios conformacionales en Keap1, de manera que Nrf2, tras ser fosforilada, puede translocarse al núcleo. En el núcleo se heterodimeriza con proteínas Maf pequeñas y se une a la región reguladora ARE induciendo la transcripción de genes que codifican para enzimas de fase II y antioxidantes. Abreviaturas: Cul3, culina 3; BTB, Dominio bric-abrac tramtrack; IVR, región de intervención; DGR, dominio de doble repetición de glicinas; DLG, dominio de baja afinidad; ETGE, dominio de alta afinidad; Nrf2, factor relacionado al factor nuclear eritroide-2; E3, ubiquitina ligasa E3; RX, proteína RING-box; UBQ, ubiquitina; ARE, elemento de respuesta antioxidante; Maf, proteínas de la familia Maf (fibrosarcoma músculo aponeurótico) pequeñas; PKC, proteínica; NQO1, NADP(H) quinona oxidorreductasa 1; GST, glutatión S-transferasa; HO-1, hemoxigenasa 1; GCL, glutatión cisteíniligasa; Trrx, tiorredoxina reductasa.



En la década pasada, los mecanismos de regulación de la vía de Nrf2 han sido dilucidados. Considerando que, la proteína adaptadora de sustratos Keap1 no sólo restringe a Nrf2 a su localización en el citoplasma, sino que también media su ubiquitinación [Coople, 2012], Keap1 funge como un mecanismo de regulación negativa de Nrf2. Este mecanismo de regulación de Nrf2 se conoce como dependiente de Keap1. Sin embargo, su regulación también contempla mecanismos alternativos independientes de Keap1, entre los que se encuentran: regulación de Nrf2 por componentes de la vía NFκB, regulación de Nrf2 por componentes epigenéticos, entre otros.



III. JUSTIFICACIÓN

En años recientes se ha visto un aumento alarmante en la incidencia de enfermedades complejas, entre las que se encuentran los padecimientos neurodegenerativos y, se espera un considerable incremento de éstas en las décadas siguientes. Uno de los componentes ubicuos de las enfermedades neurodegenerativas es el estrés oxidante mediado por las ERO y ERN. Por otra parte se sabe que, estas enfermedades son graduales y de curso prolongado, caracterizándose por la degeneración progresiva de las neuronas. Dada la deletérea acción evocada por las especies reactivas en los eventos neurodegenerativos y la falta de agentes preventivos y de tratamiento para estas enfermedades, el estudio de la capacidad antioxidante de compuestos de origen natural y/o sintético para incrementar y mantener los niveles de respuesta antioxidante se encuentra justificado puesto que, se esperaría que de haber un incremento en esta respuesta, la administración del compuesto sería útil para atenuar el daño oxidante presente en la neurodegeneración, además de que, el compuesto podría utilizarse como posible herramienta preventiva de daño oxidante.

Notablemente, las moléculas antioxidantes que exhiben marcadas propiedades de protección han sido encontradas en productos naturales como los alimentos. La SAC es el compuesto organosulfurado mayoritario del extracto de ajo envejecido y ha mostrado tener un amplio abanico de propiedades antioxidantes. Además, la SAC es un compuesto estable, no tóxico, altamente biodisponible y capaz de cruzar de manera efectiva la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado la acción neuroprotectora de la SAC en diferentes paradigmas neurotóxicos, sin embargo a la fecha no se han realizado estudios que determinen el efecto de la SAC *per se* en cerebro de animales sanos tras un esquema de administración crónica. Considerando que las células están frecuentemente expuestas a insultos oxidantes intrínsecos o extrínsecos y, aunado a que el cerebro es particularmente susceptible al daño por estrés oxidante, el uso crónico de la SAC podría brindar un efecto protector que inhiba el daño oxidante implicado en el envejecimiento y la neurodegeneración al fungir no solo como un antioxidante directo sino también,



como un inductor de la activación del factor de transcripción Nrf2, regulador maestro de la homeostasis redox que al activarse induce la transcripción de genes que codifican para enzimas antioxidantes y de fase II. De esta forma, la SAC podría fortalecer o reforzar la defensa antioxidante endógena generando un estado de protección que le permita al cerebro resistir los insultos oxidantes a los que es altamente susceptible previniendo el daño implicado en el envejecimiento y la neurodegeneración.



IV. HIPÓTESIS

Si la SAC es capaz de activar el factor de transcripción Nrf2 tras un esquema de administración crónica, en estriado, hipocampo y corteza frontal cerebral, entonces es probable que la respuesta antioxidante se vea incrementada.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la SAC como antioxidante indirecto en el estriado, el hipocampo y la corteza frontal cerebral de animales sanos tras un esquema de administración crónica.

2. Objetivos particulares

- 2.1 Evaluar la activación del factor de transcripción Nrf2 tras la administración crónica de la SAC.
- 2.2 Evaluar el efecto de la administración crónica de la SAC sobre la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GR, CAT y SOD.
- 2.3 Evaluar el efecto de la SAC sobre la enzima de fase II GST.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

El clorhidrato de L-cisteína monohidratada, el bromuro de alilo, el H_2O_2 , el glutatión oxidado (GSSG), la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), el nitroazul de tetrazolio (NBT), la albúmina de suero bovino, la xantina, la xantina oxidasa, el glutatión reducido (GSH) y el 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) se obtuvieron de la casa comercial Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EE.UU.). La SAC fue sintetizada utilizando un método desarrollado en nuestro laboratorio [Maldonado *et al.*, 2003b], el cual se explica a continuación. El kit de ELISA TransAM para Nrf2 se adquirió de Active Motive Inc (Carlsbad, CA, EE.UU.). Los demás reactivos fueron de grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

1.1 Síntesis de la SAC

En un matraz de bola con 90 mL de etanol absoluto se colocaron 5.25 g (30 mmol) de clorhidrato de L-cisteína monohidratada, bajo condiciones de agitación constante. Después de 5 min, se añadió 2.76 g (120 mmol) de Na metálico en varias porciones y la suspensión se mantuvo en agitación vigorosa por 30 min a T_{amb} a partir del momento en que el Na se disolvió por completo. A continuación, se añadieron 2.7 mL (31 mmol) de bromuro de alilo. La mezcla se agitó durante 1 h a T_{amb} , y posteriormente se añadió agua fría (30 mL) para obtener una solución incolora que se dejó en agitación durante 1 h a T_{amb} . El etanol fue evaporado por destilación a presión reducida y posteriormente, fueron añadidos 2.5 mL de ácido acético (pH final = 5.6). El precipitado blanco generado fue filtrado a vacío y se dejó secar. Al compuesto obtenido se le determinó el punto de fusión en un aparato Fisher-Johns y se comparó con el de un producto estándar [Maldonado *et al.*, 2003b].



2. *Animales*

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 90-120 g de peso corporal, que se alimentaron con dieta estándar comercial (Laboratory rodent diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN, EE.UU) y agua *ad libitum*. Se alojaron en cajas de acrílico (5 animales por caja dispuestos al azar) bajo condiciones de temperatura 25 ± 3 °C y humedad ($50 \pm 10\%$) constantes. Un total de 25 ratas fueron seleccionadas al azar y empleadas para los experimentos, durante los cuales se hizo todos los esfuerzos por minimizar el sufrimiento de los animales.

3. *Esquema de administración de la SAC*

Cinco grupos de ratas macho Wistar fueron administradas por 90 días con SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg) o con vehículo (CT, administradas con PBS, pH 7.4) por vía *i.g.* cada 24 horas.

Al término del periodo de administración se realizó el sacrificio de los animales mediante el uso de una guillotina. Inmediatamente se extrajo el cerebro y de cada hemisferio cerebral se disectó el hipocampo, el estriado y la corteza frontal que se guardaron a -70°C hasta su uso.

4. *Método experimental*

4.1 *Preparación de extractos nucleares a partir del tejido*

Los tejidos estriatales, corticales e hipocampales del hemisferio izquierdo fueron colocados en un homogenizador previamente enfriado que contenía 300 (para estriado e hipocampo) o 400 μL (para corteza frontal) de amortiguador HB frío (20 mM HEPES, 10 mM EDTA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de inhibidores de proteasas y fosfatasa, PMSF 1 mM y Nonidet P- 40 al 10%) y se incubaron en hielo durante 15 min. Los homogenados fueron centrifugados a $850 \times g$ por 10 min a 4°C . Los sobrenadantes (fracción citoplasmática) fueron colectados y guardados a -80°C . Los pellets fueron



resuspendidos en 300 (estriado e hipocampo) o 400 μL (corteza frontal) de amortiguador HB sin Nonidet P-40 10%, transferidos a tubos Eppendorf previamente enfriados e incubados en hielo durante 15 min. Posteriormente, se agregó Nonidet P-40 10% a cada muestra y se les incubó por 5 min. Luego del periodo de incubación las muestras fueron agitadas por 10 s a máxima intensidad y centrifugadas a 14000 x g por 30 s a 4°C. Los sobrenadantes fueron colectados y guardados a -80°C como parte de la fracción citoplasmática. Los pellets fueron resuspendidos en 75 μL de Complete Lysis Buffer (20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, glicerol 20%, 420 mM NaCl, 1 mM ditioneitol, 1 mM PMSF y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de inhibidores de proteasas y fosfatasa), agitados por 10 s a máxima intensidad e incubados por 30 min en el agitador orbital. Las suspensiones correspondientes fueron agitadas por 30 s a máxima intensidad y centrifugadas por 10 min a 14000 x g. Los sobrenadantes (fracción nuclear) fueron guardado en tubos Eppendorf y almacenados a -80°C hasta su uso.

4.1.1 Determinación de la activación de Nrf2

Utilizando los extractos nucleares, la unión de Nrf2 a su secuencia consenso ARE fue determinada utilizando el kit de ELISA TransAM Nrf2 de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

4.2 Preparación del tejido para la determinación de las actividades enzimáticas

Los tejidos estriatales, corticales e hipocampales del hemisferio derecho se homogenizaron en 500 μL de buffer de lisis, pH 7.9 (20 mM Tris HCl, 30 mM NaCl, 0.5 mM sacarosa, tritón al 0.1% y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 20,800 x g por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para determinar la actividad de la GPx, la GR, la CAT, la SOD y la GST.



4.2.1 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx fue determinada mediante un método espectrofotométrico basado en la desaparición del NADPH [Pedraza *et al.*, 2001]. La mezcla de reacción consistió en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio (inhibidor de la catalasa) 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 U/mL de glutatión reductasa y glutatión reducido 1 mM. Se adicionaron 100 μ L del homogenado a 0.8 mL de mezcla de reacción y se incubó por 5 min a T_{amb} antes del inicio de la reacción, la cual, después del tiempo de incubación, dio inicio al añadir 0.1 mL de H_2O_2 0.25 mM. La absorbancia se registró a 340 nm por 3 min cada 30 s y la actividad se calculó a partir de la pendiente (μ moles de NADPH oxidado por min) usando un coeficiente de extinción molar de $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$. El valor obtenido del blanco fue restado de cada ensayo. La actividad de la GPx se expresó como U/mg de proteína.

4.2.2 Actividad de la glutatión reductasa (GR)

La actividad de la GR se determinó mediante un método previamente reportado [Carlberg & Mannerviek, 1975]. La mezcla de reacción consistió en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, GSSG 1 mM y NADPH 1 mM. A 0.95 mL de mezcla de reacción se agregaron 50 μ L del homogenado. La absorbancia fue registrada por 3 min cada 15 s y la actividad fue calculada de la pendiente (μ moles de NADPH oxidado por min) utilizando un coeficiente de extinción molar de $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$. La actividad de la GR fue expresada como U/mg de proteína.

4.2.3 Actividad de la catalasa (CAT)

La actividad de la CAT fue determinada de acuerdo a un reporte previo [Pedraza *et al.*, 2001]. La mezcla de reacción consistió en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 y H_2O_2 30 mM. A 0.75 mL de la mezcla de reacción se añadieron 25 μ L del homogenado e inmediatamente se registraron los cambios en la absorbancia a 240



nm a Tamb. La actividad de la enzima fue determinada como $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ consumidos por min por mg de proteína. Los resultados se expresan como k/mg de proteína.

4.2.4 Actividad de la superóxido dismutasa total (SOD)

La actividad de la SOD total fue determinada por un método espectrofotométrico utilizando nitroazul de tetrazolio como agente indicador [Carmona-Ramírez *et al.*, 2013]. La mezcla de reacción consistió en xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μM , carbonato de sodio 49 mM y albúmina sérica bovina al 0.006%. A 0.815 mL de mezcla de reacción fueron añadidos 165 μL de homogenado (1:20) e incubados por 10 min a 27 °C antes de la iniciación de la reacción por la adición de 20 μl de xantina oxidasa 168 U/L. A los 10 min, la reacción fue detenida con 330 μL de cloruro de cobre 0.8 mM. La cantidad de proteína que inhibió en 50% la reducción del nitroazul de tetrazolio fue considerada como 1 U de actividad de la SOD. Los resultados fueron expresados como U/mg de proteína.

4.2.5 Actividad de la glutatión S-transferasa (GST)

La actividad de la GST fue determinada de acuerdo a un reporte previo [Habig *et al.*, 1974]. La mezcla de reacción contenía amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.0 y GSH 10 mM. A 0.87 mL de mezcla de reacción se agregaron 80 μL de homogenado antes de la iniciación de la reacción, que comenzó al agregar 50 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 10 mM. La aparición del complejo GSH- dinitrobenzeno fue medido espectrofotométricamente a 340 nm por 3 min. La actividad enzimática fue calculada utilizando un coeficiente de $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados fueron expresados como U/mg de proteína.



5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como (\pm) error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los tratamientos fueron determinados mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de Dunnet, utilizando el software Graph Pad Prism 5 (San Diego, CA, EE.UU.). Para todos los casos, un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.



VII. RESULTADOS

El peso de los animales administrados en este estudio no fue afectado por la ingesta crónica de la SAC al emplear las diferentes dosis propuestas en el esquema de administración. El peso de los animales por grupo antes del tratamiento con SAC (día 0) y de los animales después del tratamiento con SAC (día 90) se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Peso corporal de los animales del estudio

	D0	D90
CT	110 ± 16 g	400 ± 11 g
SAC 25	104 ± 8 g	383 ± 28 g
SAC 50	100 ± 9 g	416 ± 30 g
SAC 100	107 ± 10 g	379 ± 22 g
SAC 200	109 ± 5 g	405 ± 56 g

D0: día 0, D90: día 90

1. Efecto de la SAC sobre la inducción del factor de transcripción Nrf2

El tratamiento crónico con la SAC indujo un incremento significativo en la activación de Nrf2 en el hipocampo desde una dosis de 25 mg/kg, mostrando un pico máximo a 100 mg/kg, dosis a la cual la SAC indujo un incremento de la activación de Nrf2 de 1.6 veces. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el estriado ni en la corteza frontal, aunque la activación basal en los grupos control de estas regiones fue mayor que en el hipocampo (**Fig. 10**).

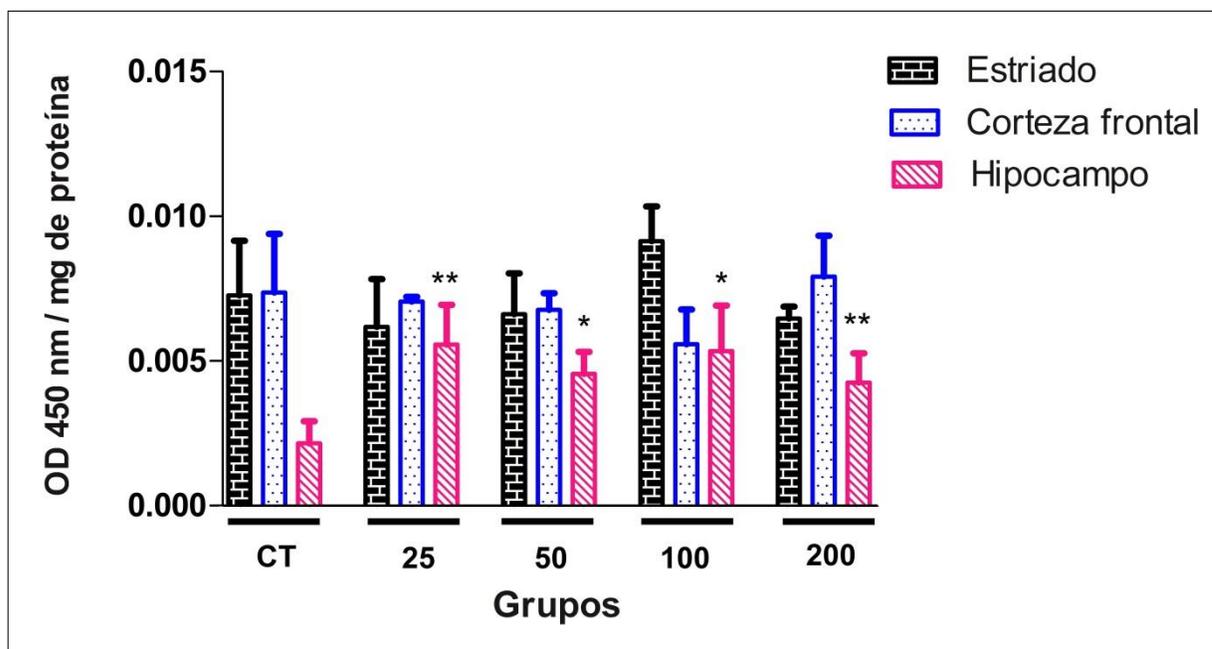


FIGURA 10. Efecto de la administración crónica de la SAC sobre la activación de Nrf2 en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo. La SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg, *i.g.*) fue administrada cada 24 h durante 90 días. El grupo control (CT) recibió PBS en las mismas condiciones. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 5$. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs grupo CT de cada región cerebral.

2. Efecto de la SAC en la actividad de enzimas antioxidantes

Como se observa en las figuras mostradas a continuación (**Figs. 11 - 14**), la SAC indujo un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx, GR y CAT en la corteza frontal, el hipocampo y el estriado, sin embargo se observan efectos diferentes en cada región cerebral. Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tres regiones cerebrales en estudio, los mayores incrementos en la actividad enzimática se presentan en el estriado y el hipocampo.

En la **figura 11** se observa que la SAC administrada de manera crónica indujo un incremento significativo en la actividad de la GPx; siendo el estriado la región que mostró mayores cambios. Sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas en las tres regiones cerebrales en estudio desde la dosis de 25 mg/kg.



El mayor cambio fue observado a 50 mg/kg en el estriado y 100 mg/kg en el hipocampo.

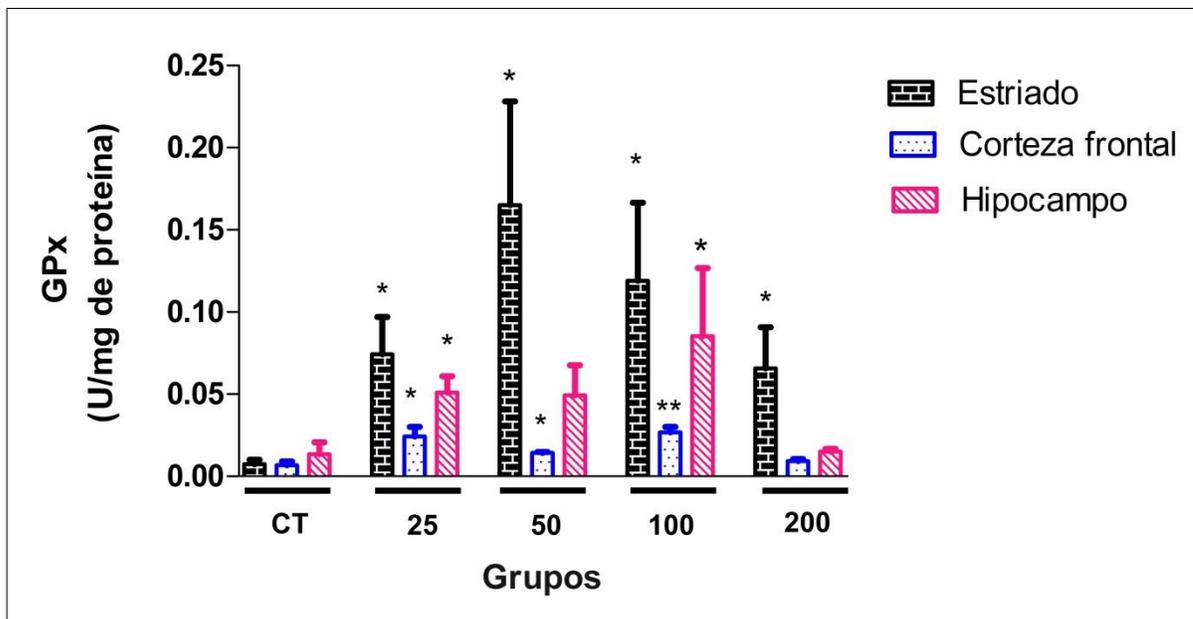


FIGURA 11. Efecto de la administración crónica de la SAC sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo. La SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg, *i.g.*) fue administrada cada 24 h durante 90 días. El grupo control (CT) recibió PBS en las mismas condiciones. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 5$. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs grupo CT de cada región cerebral.

La **figura 12** muestra que el tratamiento con la SAC también indujo un incremento de la actividad de la SOD total desde la dosis de 25 mg/kg. El pico máximo de actividad se encuentra, al igual que para la GPx, en 50 mg/kg en estriado y 100 mg/Kg en hipocampo y corteza frontal, aunque en ésta última no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El estriado e hipocampo son las regiones que muestran mayores incrementos en la actividad de la SOD total.

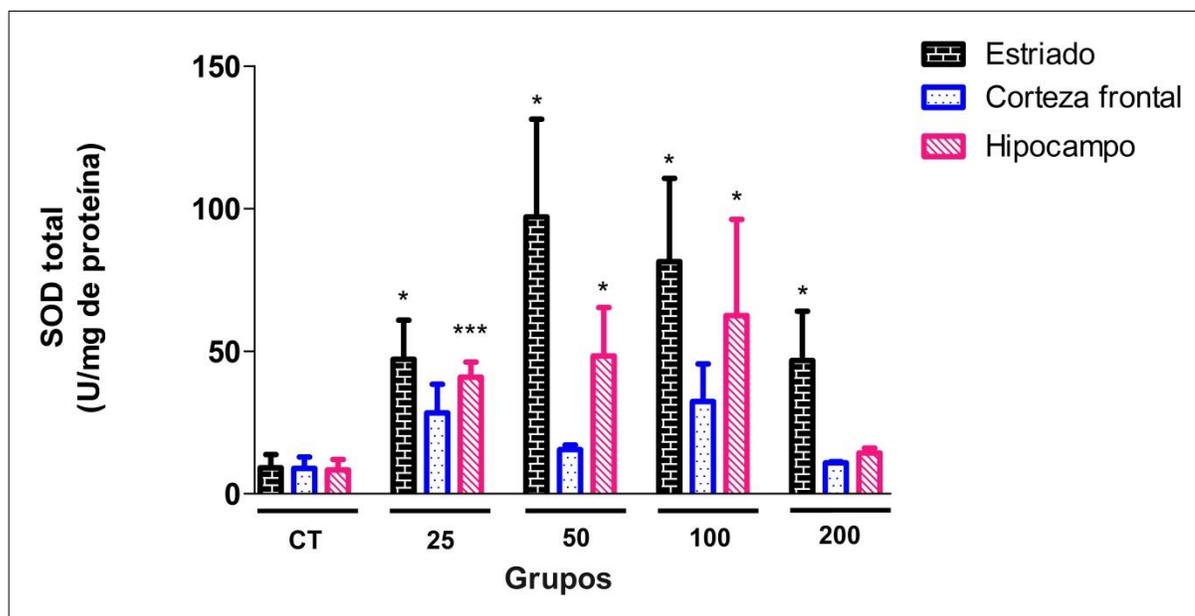


FIGURA 12. Efecto de la administración crónica de la SAC sobre la actividad de la superóxido dismutasa total (SOD) en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo. La SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg, *i.g.*) fue administrada cada 24 h durante 90 días. El grupo control (CT) recibió PBS en las mismas condiciones. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 5$. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ vs grupo CT de cada región cerebral.

La GR muestra (**Fig. 13**) incrementos mediados por la administración crónica de la SAC. Este incremento alcanza un pico máximo de actividad enzimática en la dosis de 50 mg/Kg en el estriado. La dosis de 25 mg/Kg indujo cambios significativos con respecto al control en hipocampo y corteza, sin embargo como puede observarse el cambio es pequeño.

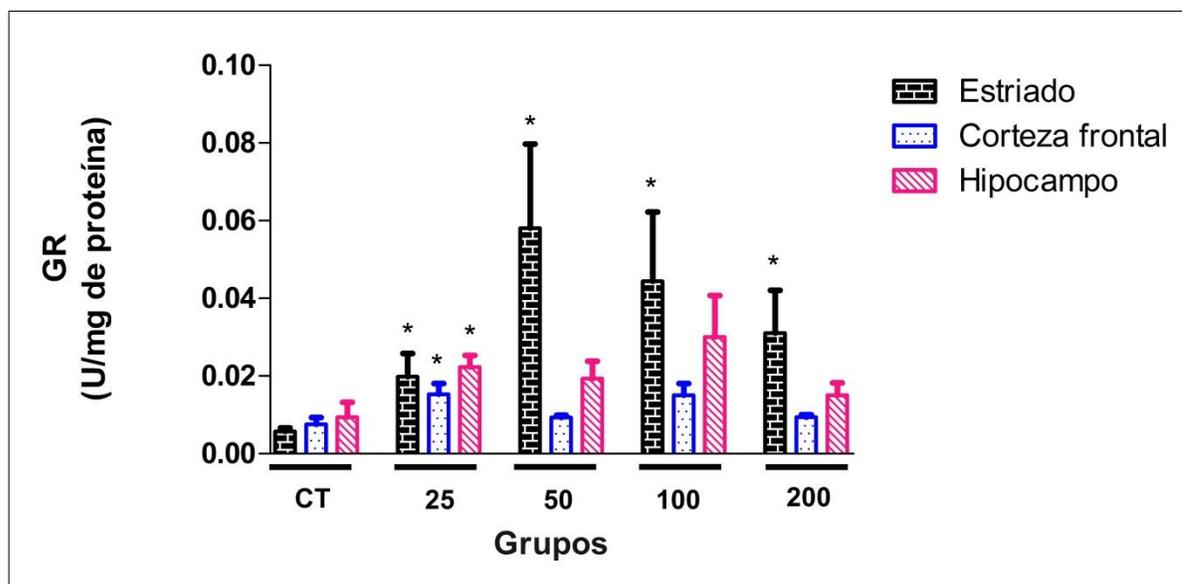


FIGURA 13. Efecto de la administración crónica de la SAC sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo. La SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg, *i.g.*) fue administrada cada 24 h durante 90 días. El grupo control (CT) recibió PBS en las mismas condiciones. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs grupo CT de cada región cerebral.

La SAC indujo un aumento estadísticamente significativo con respecto al control en la actividad de la CAT en las tres regiones en estudio como se observa en la **figura 14**. Dicho incremento alcanza un pico máximo de actividad en una dosis de 50 mg/kg en estriado, 100 mg/kg en corteza frontal y 25 mg/kg en hipocampo. El mayor incremento se observa en estriado e hipocampo.

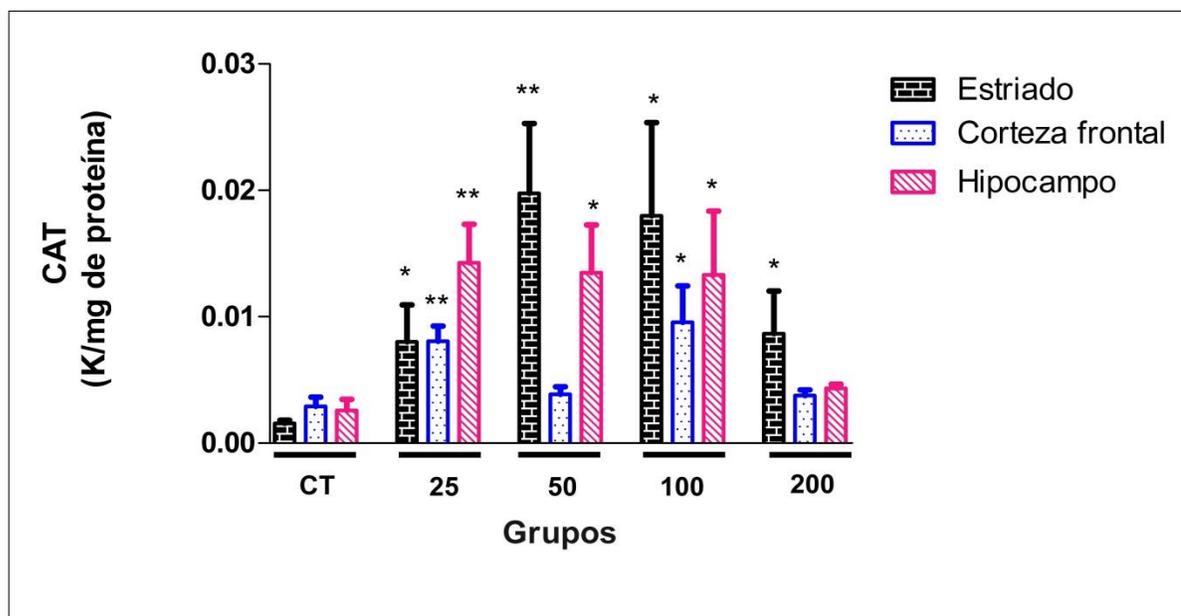


FIGURA 14. Efecto de la administración crónica de la SAC sobre la actividad de la catalasa (CAT) en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo. La SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg, *i.g.*) fue administrada cada 24 h durante 90 días. El grupo control (CT) recibió PBS en las mismas condiciones. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs grupo CT de cada región cerebral.

Efecto de la SAC en la enzima de fase II GST

Como muestra la **figura 15**, la actividad de la enzima detoxificante GST no muestra diferencias significativas con respecto al control tras la administración crónica de SAC, sin embargo se una tendencia de incremento en la actividad de la enzima en el hipocampo desde la dosis de 25 mg/kg mostrando un pico en esta región a la dosis de 100 mg/kg, aunque estos cambios no alcanzan a ser estadísticamente significativos.

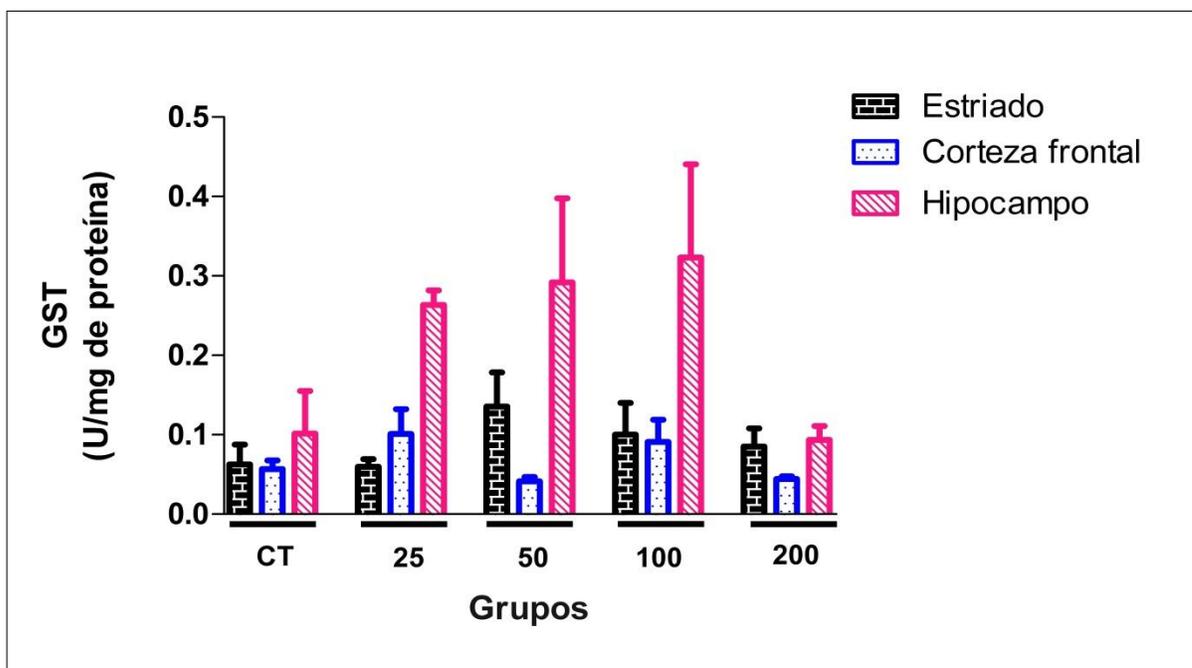


FIGURA 15. Efecto de la administración crónica de la SAC sobre la actividad de la glutatión S-transferasa (GST) en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo. La SAC (25, 50, 100 y 200 mg/kg, *i.g.*) fue administrada cada 24 h durante 90 días. El grupo control (CT) recibió PBS en las mismas condiciones. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs grupo CT de cada región cerebral.



VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el efecto *in vivo* de la administración crónica de la SAC en diferentes regiones cerebrales de ratas macho Wistar, con el fin de proporcionar información sobre la función de este compuesto como antioxidante indirecto considerando que, las propiedades neuroprotectoras de la SAC como antioxidante directo y antiinflamatorio han sido demostradas en diferentes modelos neurotóxicos. A la fecha, los trabajos que evidencian a la SAC como un antioxidante han utilizado esquemas de administración agudos, subagudos y subcrónicos por lo que a la fecha no hay información sobre los efectos antioxidantes de la SAC *per se* tras su administración crónica en el cerebro ni en otros tejidos [Numagami & Ohnishi, 2001; Atif *et al.*, 2009; Pérez-Severiano *et al.*, 2004; Herrera-Mundo *et al.*, 2009; Elinos-Calderón *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014; Javed *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2011].

Los resultados de este trabajo muestran un aumento en los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx y GR en las regiones cerebrales estudiadas tras la administración crónica de la SAC, lo cual podría sugerir un efecto neuroprotector que, alcanzaría a mantenerse durante tiempos prolongados en las enfermedades crónico-neurodegenerativas, incrementando y reforzando la defensa antioxidante en el cerebro. De acuerdo con estos resultados, en un reporte previo, Hsu y colaboradores [2004] evaluaron el efecto de la administración subcrónica de la SAC (1 g/L en el agua durante 4 semanas) sobre la actividad de la GPx y la CAT en ratones Balb/cA y encontraron un aumento en la actividad de ambas enzimas en hígado y riñón. Además, García y colaboradores [2014] recientemente reportaron que la SAC (120 mg/kg *i.p.* durante 5 días) *per se* fue capaz de incrementar la actividad de la Mn-SOD en un 45% por encima del control en sustancia nigra. Por otra parte, en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, la SAC (30 mg/kg *i.p.*) demostró tener un efecto antioxidante al administrarse como agente preventivo, siendo capaz de proteger en contra del daño al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro [Manikandaselvi *et al.*, 2012]. En este estudio, los animales a los que no se les indujo daño pero que recibieron SAC no mostraron



diferencias estadísticamente significativas en las actividades enzimáticas por la administración de SAC *per se*. Esta discrepancia con nuestros resultados podría explicarse debido a que el esquema de administración crónica propuesta en este trabajo no fue utilizado en la investigación citada. Lo anterior podría implicar que para observar un efecto antioxidante por parte de la SAC en animales sanos es necesaria una administración continua del compuesto.

Si bien, algunos reportes han mostrado que la SAC es capaz de restablecer la actividad de enzimas antioxidantes al utilizarse en forma de tratamiento en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas [García *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2011] y en otros han mostrado su efecto antioxidante como agente preventivo, el uso de nutraceuticos como la SAC que refuercen la defensa antioxidante endógena en el cerebro, podría fungir como una posible herramienta para prevenir algunas enfermedades neurodegenerativas y su deterioro, o en caso de utilizarse como tratamiento, la recuperación sería preservada por períodos largos de administración.

Por otra parte, se ha reportado que las especies reactivas son capaces de disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes [Maldonado *et al.*, 2003a]. El ONOO⁻ no sólo altera la actividad de la Mn-SOD [MacMillan-Crow *et al.*, 1999], sino también la de la GPx [Padmaja *et al.*, 1998], mientras que el O₂^{•-} es capaz de inactivar a la GPx [Blum & Fridovich, 1985; Rister *et al.*, 1976] y a la CAT [Rister *et al.*, 1976]. En este sentido, si la SAC al fungir como antioxidante directo no sólo es capaz de atrapar al ONOO⁻ [Medina-Campos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006] y al O₂^{•-} [Maldonado *et al.*, 2003b; Kim *et al.*, 2001; Medina-Campos *et al.*, 2007], sino también otras ERO/ERN, la posibilidad de que el incremento de la actividad de las enzimas observada en los resultados se deba a la disminución de inactivación por especies reactivas, puede ser en parte razonable. Adicionalmente, se ha encontrado que la administración de la SAC puede aumentar la síntesis del GSH [Pinto *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2004; Padmanabhan & Mainzen-Prince, 2006; Omar & Al-Wabel, 2010], el cual al fungir como cofactor de la enzima GPx en las células previene el daño por estrés oxidante [Hatono *et al.*, 1996]. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el aceite de ajo



puede estimular la actividad de la GPx a través del incremento de GSH en células de la epidermis tratadas con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato [Perchellet *et al.*, 1986].

Teniendo en cuenta que se ha reportado que algunos preparados de ajo como el EAE mejoran la actividad de las enzimas antioxidantes, la SAC al ser el compuesto más abundante en este suplemento [Maldonado *et al.*, 2003b; Colín *et al.*, 2012] podría ser uno de los nutraceuticos que genere o incremente este efecto.

En cuanto al rango de dosis utilizadas, la SAC aumentó con eficacia la actividad de las enzimas antioxidantes en una dosis de 50 mg/kg en el estriado, y 100 mg/kg en la corteza frontal y el hipocampo. El efecto de la SAC al inducir la respuesta antioxidante a dosis intermedias (50 mg/kg y 100 mg/kg) fue evidente en las actividades de la SOD, la CAT, la GPx y la GR principalmente en el estriado y el hipocampo. Sin embargo, la dosis más alta de SAC (200 mg/kg) no fue eficaz para inducir la actividad de estas enzimas. De hecho, los resultados de las actividades de las enzimas antioxidantes muestran una respuesta dosis independiente que se observa principalmente en el estriado, y en algunos casos en el hipocampo. Esta relación dosis-respuesta no lineal también fue encontrada en otro trabajo previamente reportado por nuestro grupo [Pérez-Severiano *et al.*, 2004], en el que la dosis más alta probada de SAC (450 mg/kg) no protegió al estriado de la acción oxidativa del ácido quinolínico en un modelo de la enfermedad de Huntington. D'Emilia y Lipton [1999] propusieron que si el contenido de grupos tioles en el cerebro alcanza cantidades excesivas, conduce a su propia inactivación o, si el óxido nítrico está disponible genera la formación de nitrosotioles volviéndose pro-oxidantes. En este caso la fuente de grupos tiol sería la SAC. El mismo hecho puede estar ocurriendo en otros trabajos en los que los efectos protectores de la SAC no se observan en dosis elevadas tales como en modelos de isquemia cerebral en ratas [Numagami *et al.*, 1996; Pérez-Severiano *et al.*, 2004].

En este trabajo también se demostró que la administración crónica de la SAC no es capaz de aumentar la actividad de la enzima detoxificante GST. Aunque, se ha



demostrado que compuestos orgánicos de azufre pueden modular la actividad de la GST [Omar & Al-Wabel, 2010], no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su actividad, en comparación con el control como se observa en la figura 15. De hecho, se ha reportado que inductores de Nrf2 como la terbutilhidroquinona que incrementan los niveles de GSH, no modifican la actividad de la GST en corteza ni estriado, sin embargo son capaces de incrementar la actividad de esta enzima en hígado, indicando un efecto robusto de Nrf2 sobre la inducción de la GST en este órgano [Villamena, 2013].

Con respecto a Nrf2, informes anteriores proponen la activación de este factor de transcripción mediado por la SAC *in vivo* en hepatocitos [Kalayarasan *et al.*, 2008], en tejido cortical [Colín-González *et al.*, 2012] y en la sustancia nigra [García *et al.*, 2014]. En el presente estudio, la administración de la SAC mostró un aumento en la activación de Nrf2 en el hipocampo pero no se observaron cambios estadísticamente significativos en el estriado ni la corteza frontal. Estos resultados son consistentes con un informe reciente de nuestro grupo, en el que no se encontró cambios estadísticamente significativos en la activación del Nrf2 estriatal producido por la SAC (120 mg/kg *i.p.* durante 5 días).

Por otra parte, Colín y colaboradores [2012] reportaron la activación de Nrf2 en la corteza frontal mediada por la SAC (100 mg kg *i.p.* durante 5 días). La diferencia entre el trabajo citado anteriormente y el nuestro radica tanto en la vía como en el tiempo de administración. No obstante, el motivo de este hallazgo sigue siendo poco claro.

En el caso del hipocampo, hasta ahora no se había evaluado el efecto de la SAC sobre el factor Nrf2, no obstante fue la región en la que en este estudio se observó su inducción. Considerando lo anterior, es posible que la SAC en el hipocampo haya activado al factor Nrf2 y que el efecto se conserve por periodos largos de administración. Además, dado que se ha reportado que durante la enfermedad de Alzheimer, el Nrf2 hipocampal se encuentra predominantemente en citoplasma al comparar con controles en los que el factor Nrf2 se encuentra tanto en núcleo como



citoplasma [Ramsey *et al.*, 2007], de acuerdo a los resultados de este trabajo, el uso de la SAC en esta enfermedad podría tener un efecto positivo por la inducción de Nrf2 observada en el hipocampo.

Sin embargo, parece evidente que las poblaciones celulares de las regiones cerebrales en estudio muestran un comportamiento diferencial con respecto a la activación del factor Nrf2 de manera basal como por inductores como la SAC, lo cual puede observarse tanto en los resultados obtenidos en este trabajo como en el comportamiento de este factor de transcripción durante las enfermedades neurodegenerativas.

Debido a que el modelo usado en este trabajo no causa ningún deterioro a los animales, se podría proponer que en el rango de las dosis empleadas, la SAC no es suficiente para inducir la vía de Nrf2 en el cuerpo estriado y la corteza frontal, hecho que sería diferente si se hubiera utilizado un modelo con lesión, en el que un efecto aditivo por el estrés oxidante junto con la inducción de Nrf2 mediada por la SAC podría haberse visto.

Con respecto a los resultados relacionados con la falta de activación de Nrf2 en el estriado y la corteza frontal y a pesar de ello el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes, se podría proponer que la activación de otras vías pudiese estar involucrada. Por ejemplo, el factor de transcripción NFkB, en los mamíferos está fuertemente involucrado en la inducción de la expresión de la CAT y la GPx en respuesta al estrés oxidante y posiblemente también a la inducción generada por compuestos orgánicos de azufre como la SAC. Las ERO actúan como moléculas de señalización y algunos factores de transcripción que regulan la expresión de los genes antioxidantes responden a las ERO, por ejemplo, el H₂O₂ es una molécula de señalización estable y difusible que se ha demostrado que activa las cascadas de señalización de la quinasa JunN-terminal (JNK) y de NF-kB. En *Drosophila*, la vía JNK activa el factor de transcripción activador de proteína-1 (AP-1) e induce la expresión de genes de respuesta al estrés [Jaramillo-Gutiérrez *et al.*, 2010]. Adicionalmente, no hay información disponible acerca de la regulación de los



antioxidantes y enzimas de fase II mediada por la SAC en animales Wild-type Nrf2 +/+ en comparación con los knock-out Nrf2-/-.

Además, la SAC es un compuesto altamente estable, biodisponible [Kodera *et al.*, 2002] y no tóxico [Chang-Kai *et al.*, 2005] que cruza la barrera hematoencefálica de manera rápida y eficaz [Numagami *et al.*, 1996], características que, junto con el efecto antioxidante indirecto encontrado en este estudio y los efectos neuroprotectores reportados en la literatura, sugieren que la SAC podría ser un antioxidante eficaz y seguro para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas.

Al menos, los datos de este trabajo demuestran la capacidad de la SAC para preservar la homeostasis redox a nivel basal, protegiendo las funciones fisiológicas mediante el refuerzo de la capacidad antioxidante endógena para resistir una posible agresión tóxica que podría manifestarse en el envejecimiento o en los trastornos neurodegenerativos. Bajo la luz de estos resultados en ratas, la SAC administrada de manera crónica podría fungir como un agente preventivo al utilizarse en un modelo de neurodegeneración.



IX. CONCLUSIÓN

La SAC incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo, lo cual sugiere que este compuesto podría mostrar un efecto antioxidante después de un esquema de administración crónica en ratas, capacidad que podría ser útil en las enfermedades crónico-neurodegenerativas al reforzar la respuesta antioxidante. Además, la SAC fue capaz de activar el factor Nrf2 en el hipocampo, pero no en el estriado y la corteza frontal, lo que sugiere una posible activación de otras vías mediadas por la SAC en estas regiones cerebrales.



X. PERSPECTIVAS

1. Determinar la expresión de la proteína Nrf2 en los núcleos de las regiones cerebrales en estudio.
2. Determinar la expresión de las enzimas antioxidantes y de fase II en las regiones en estudio.
3. Determinar la concentración de SAC que llega a cada una de las regiones cerebrales en estudio.
4. Utilizar a la SAC en modelos de neurodegeneración como agente preventivo y como tratamiento considerando un esquema de administración crónica.



XI. LITERATURA CITADA

Arnault I, Haffner T, Siess MH, Vollmar A, Kahane R, Auger J. 2005. Analytical method for appreciation of garlic therapeutic potential and for validation of a new formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37**: 963–970

Arthur JR. 2000. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 1825–1835

Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. 2009. S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Research* **1265**: 128-137

Baker RD, Baker SS, LaRosa K, Whitney C, Newburger PE. 1993. Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304**: 53-57

Balaseshil S, Nagini S. 2000. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *Oral Oncology* **36**: 382–386

Beal MF. 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology* **58**:495–505

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* **5**: 9–19

Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **240**: 500-508

Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition* **131**: 1010S–1015S

Carlberg I, Mannerviek B. 1975. Glutathione reductase levels in rat brain. *J Biol Chem* **250**:5475-80

Carmona-Ramírez I, Santamaría A, Tobón-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, González-Herrera IG, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD. 2013. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem* **24**: 14 – 24



Chang-Kai, Fan-Dian Z. 2005. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. **5**: 61-69

Chauhan & Neelima B. 2006. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *Journal of Ethnopharmacology* **108**:385-394

Chia-Wen T, Haw-Wen C, Le-Yen S, Chong-Kuei L. 2012. Garlic: Health benefits and actions. *Biomedicine* **2**: 17-29

Chun HS, Kim JM, Choi EH, Chang N. 2008. Neuroprotective effects of several Korean medicinal plants traditionally used for stroke remedy. *Journal of Medicinal Food* **11**: 246–251

Chung LY. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food* **9**: 205–213

Colín-González AL, Santana RA, Silva-Islas CA, Chánez-Cárdenas ME, Santamaría A, Maldonado PD. 2012. The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:907162. doi: 10.1155/2012/907162. Epub 2012 May 17

Copple IM. 2012. The Keap1–Nrf2 Cell Defense Pathway – A Promising Therapeutic Target? *Advances in Pharmacology* **63**: 43-79

Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González DJ, Hernández-Pando R, Maldonado PD, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Tapia E, Aguilar D, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. 2007. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **293**: F1691–F1698

Dairam A, Fogel R, Daya S, Limson JL. 2008. Antioxidant and iron-binding properties of curcumin, capsaicin, and S-allylcysteine reduce oxidative stress in rat brain homogenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 3350–3356



D'Emilia DM, Lipton SA. 1999. Ratio of S-nitrosohomocyst(e)ine to homocyst(e)ine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci Lett.* **265**:103-106

Díaz A. 2003. La estructura de las catalasas. *Revista de Educación Bioquímica-UNAM* **22**: 76-84

Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Pérez-De La Cruz, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverri J. 2010. Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine. *Journal of Neural Transmission* **117**: 35–44

Friedlich AL, Smith MA, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Moreira PI, Perry G. 2009. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *The Open Pathology Journal* **3**: 38-42

García E, Santana-Martínez R, Silva-Islas CA, Colín-González AL, Galván-Arzate S, Heras S, Maldonado PD, Sotelo J, Santamaría A. 2014. S-allyl cysteine protects against MPTP-induced striatal and nigral oxidative neurotoxicity in mice: Participation of Nrf2. *Free Radical Research* **48**: 159–167

Geng Z, Rong Y, Lau BH. 1997. S-Allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* **23**: 345–350

Gil HA. 2010. Tratado de nutrición. 2ª Ed. Madrid: Medica Panamericana. ISBN: 978-84-9835-346-4. 786 pp.

Gill PS, Wilcox CS. 2006. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxidants and Redox Signaling* **8**: 1597–1607

Giroto S, Cendron L, Bisaglia M, Tessari I, Mammi S, Zanotti G, Bubacco L. 2014. DJ-1 Is a Copper Chaperone Acting on SOD1 Activation. *Journal of Biological Chemistry* **289**:10887-10899



Gupta VB, Rao KS. 2007 Anti-amyloidogenic activity of S-allyl-L-cysteine and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neuroscience Letters* **429**: 75–80

Gutteridge J. 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry* **41**: 1819-1828

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. **249**: 7130-7139

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine* **18**: 125–126

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4th Ed. Oxford: Clarendon. ISBN: 978-0198568698. 888 pages

Hatono S, Jimenez A, Wargovich MJ. 1996. Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis* **17**: 1041-1044

Herrera-Mundo MN, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Andrés-Martínez L, Pérez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. 2009. S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res* **56**:39-44

Ho SE, Ide N, Lau B. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* **8**: 39–46

Hsu CC, Hsiu-fang Yen HF, Yin MC, Tsai CM, Hsieh CH. 2004. Five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/cA Mice. *J. Nutr* **134**: 3245–3249



Hsu CC, Lin CC, Liao TS, Yin MC. 2006. Protective effect of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* **44**: 393-397

Huang CN, Horng JS, Yin MC. 2004. Antioxidative and antiglycative effects of six organosulfur compounds in low density lipoprotein and plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 3674–3678

Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytotherapy Research* **10**: 340–341

Ide N, Lau BH. 1999. S-Allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **25**: 619–624

Ide N, Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *Journal of Nutrition* **131**: 1020S-1026S

Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* **60**: 417-420

Innamorato NG, Jazwa A, Rojo AI, García C, Fernández-Ruiz J, Grochot-Przeczek A. 2010. Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1. *PLoS One* **5**: e11838. doi:10.1371/journal.pone.0011838

Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biology & Medicine* **36**:1208-1213

Jacobson J & Duchen MR. 2002. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes – requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *Journal of Cell Science* **115**: 1175-1188



Jaramillo-Gutiérrez G, Molina-Cruz A, Kumar S, Barillas-Mury C. 2010. The Anopheles gambiae oxidation resistance 1 (OXR1) gene regulates expression of enzymes that detoxify reactive oxygen species. *PLoS ONE* **5**:e11168. doi:10.1371/journal.pone.0011168

Javed H, Khan MM, Khan A, Vaibhav K, Ahmad A, Khuwaja G, Ahmed ME, Raza SS, Ashafaq M, Tabassum R, Siddiqui MS, El-Agnaf OM, Safhi MM, Islam F. 2011. S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research* **1389**: 133–142

Kalayarasan S, Sriram N, Sureshkumar A, Sudhandiran G. 2008. Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of wistar rats. *Journal of Applied Toxicology* **28**: 908–919

Kehrer JP. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**: 43-50

Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology and Medicine* **30**:747–756

Kim JM, Lee JC, Chang N, Chun HS, Kim WK. 2006. S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Radical Research* **40**: 827–835

Kim HJ, Vaziri ND. 2010. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**: F662- F671

Kitteringham NR, Powell H, Jenkins RE, Hamlett J, Lovatt C, Elsby R, Henderson CJ, Wolf CR, Pennington SR, Park K. 2003. Protein expression profiling of glutathione S-



transferase pi null mice as a strategy to identify potential markers of resistance to paracetamol-induced toxicity in the liver. *Proteomics* **3**: 191–207

Klandorf H & Van-Dyke K. 2012. Oxidative and nitrosative stresses: their role in health and disease in man and birds, oxidative stress – In: Molecular mechanisms and biological effects. Lushchak V (Ed.). USA. InTech: 47-60

Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanezawa A, Taru N, Fujikawa M, Nagae H, Masamoto K, Maeshige K, Ono K. 2002. Physical, chemical, and biological properties of S-Allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 622-632

Kohen R, Niska A. 2002 Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* **30**: 620-650

Königsberg F. 2007. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidante *REB* **26**: 18-25

Lau A, Tian W, Whitham S, Zhang D. 2012. The Predicted Molecular Weight of Nrf2: It Is What It is Not. *Antioxidant Redox Signaling* **18**: 91–93

Lawson LD. 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. ACS Symposium Series 691. Lawson LD, Bauer R. (Eds). Washington, DC, USA. American Chemical Society: 176-209

Lawson LD, Gardner CD. 2005. Composition, stability, and bioavailability of garlic products being used in a clinical trial. *J Agric Food Chem* **53**: 6254–6261

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. 2003. Identification of the NFE2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 12029-12038



Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, Kong AN. 2008. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* **76**: 1485–1489

Ljubuncic P, Gochman E, Reznick AZ. 2010. Nitrosative stress in aging – Its importance and biological implications in NF-κB signaling. In: *Aging and Age-Related Disorders*. Bondy S, Maiese K, (Eds). New York. Human Press: 27-54

Lotharius J, Brundin P. 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α-synuclein. *Nature Reviews* **3**: 1-11

MacMillan-Crow LA, Thompson JA. 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **366**: 82-88

Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J. 2003a. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* **73**: 2543-2556

Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos O, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2003b. Antioxidant S-Allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radical Biology & Medicine* **35**: 317–324

Maldonado PD, Alvarez-Idaboy R, Aguilar-Gonzalez A, Lira-Rocha A, Jung-Cook H, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverrí J, Galano A. 2011. Role of allyl group in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of S-Allylcysteine. *The Journal of Physical Chemistry B* **115**: 13408–13417

Manikandaselvi S, MahalakshmiR, Thinagarbabu R, Angumeenal AR. 2012. Neuroprotective activity of S-allylcysteine on haloperidol induced Parkinson's disease in albino mice. *International Journal of Pharmacological Technology Research Res* **4**:669-75



Marín-García J. 2011. Mitochondria. In: Signaling in the heart. Marín-García (Ed.) New York: Springer –Verlag: 126-129

Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J. 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 2030–2039

Mézes M, Erdélyi M, Shaaban G, Virág G, Balogh K, Wéber M. 2003. Genetics of glutathione peroxidase. *Acta Biologica Szegediensis* **47**:135-138

Mikaili P, Maadirad S, Moloudizargari M, Aghajanshakeri Sh, Shadi Sarahroodi. 2013. Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. *Iran J Basic Med Sci* **16**: 1031-1048

Milner JA. 1996. Garlic: its anticarcinogenic and antitumorigenic properties. *Nutrition Reviews* **54**: S82–S86

Morgan MJ, Liu Z. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research* **21**:103-115

Moriguchi T, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 1996. Trophic effects of aged garlic extract (AGE) and its fractions on primary cultured hippocampal neurons from fetal rat brain. *Phytotherapy Research* **10**: 468–472

Mostafa MG, Mima T, Ohnishi ST, Mori K. 2000. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Medica* **66**: 148–151

Mugesh G, Panda A, Singh HB, Puneekar NS, Butcher RJ. 2001. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: A Mechanistic Study. *J Am Chem Soc* **123**: 839-850

Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y. 1994. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Medica* **60**:214-217



Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principios de bioquímica (Traducción Cuchillo F, Suau L y Vendrell R). 5ª Ed. Barcelona: Omega. 2009. ISBN 978-84-282-1486-5. 1296 pp.

Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. 2004. *Free Radic Biol Med* **37**:433-41

Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H. 2001. Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *Journal of Nutrition* **131(3s)**:1093S-1095S

Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochemistry International* **29**: 135–143

Numagami Y & Ohnishi ST. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *Journal of Nutrition* **131**: 1100S–1105S

Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. 2007. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* **6**: 411–423

Ogino K, Wang DH. 2007. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: An approach to disease prevention. *Acta Med Okayama* **61**:181-189

Omar SH, Al-Wabel NA. 2010. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal* **18**: 51–58

Padmaja S, Squadrito G, Pryor WA. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **349**:1-6



Padmanabhan M, Mainzen-Prince PS. 2006. Preventive effect of S-allylcysteine on lipid peroxides and antioxidants in normal and isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats: A histopathological study. *Toxicology* **224**: 128–137

Pai EF, Schulz GE. 1983. The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Derived from X-ray Diffraction Analyses of Reaction Intermediate. *J Biol Chem* **258**:1752-1757

Pedraza-Chaverri, J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio ME. 2001. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* **216**: 9–19

Peng Q, Buz'Zard AR, Lau BH. 2002 Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Medical Science Monitor* **8**: BR328–BR337

Perchellet JP, Perchellet EM, Abney NL, Zirnstein JA, Belman S. 1986. Effects of garlic and onion oils on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with tumor promoters. *Cancer Biochemistry Biophysics* **8**: 299-312

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Andrés-Martínez L, Santamaría A. 2006. Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Research Bulletin* **68**: 379–383

Pérez-Severiano F, Salvatierra-Sánchez R, Rodríguez-Pérez M, Cuevas-Martínez EY, Guevara J, Limón D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A. 2004. S-Allylcysteine prevents amyloid-b peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *European Journal of Pharmacology* **489**: 197–202

Pinto JT, Qiao C, Xing J, Rivlin R, Protomastro L, Weisler M, Tao Y, Thaler H, Heston W. 1997. Effects of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione



concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture. *American Journal of Clinical Nutrition* **66**: 398-405

Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL. 2007. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **66**:75-85

Ray B, Chauhan NB, Lahiri DK. 2011. The "aged garlic extract:" (AGE) and one of its active ingredients S-allyl-L-cysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agents for Alzheimer's disease (AD). *Current Medicinal Chemistry* **18**: 3306-3313

Ray B, Chauhan NB, Lahiri DK. 2011. Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by Aged Garlic Extract (AGE) and S-allyl-L-Cysteine (SAC) treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *Journal of Neurochemistry* **117**: 388–402

Rege SD, Kumar S, Wilson DN, Tamura L, Geetha T, Mathews ST, Huggins KV, Broderick TL, Babu JR. 2013. Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2013**: 419092.doi: 10.1155/2013/419092

Repetto M, Repetto G. 2009. Toxicología fundamental. 4ª Ed. Madrid. Díaz de Santos ISBN: 978-84-7978-898-8. 620 pp.

Ribeiro M, Rosenstock T, Cunha-Oliveira T, Ferreira IL, Oliveira CR, Rego C. 2012. Glutathione redox cycle dysregulation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radical Biology and Medicine* **53**: 1857-1867

Rister M, Baehner RL. 1976. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *Journal of Clinical Investigation* **58**:1174-84

Rojas P, Serrano-García N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Ruiz-Sánchez E. 2011. S-Allylcysteine, a garlic compound, protects against



oxidative stress in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* **22**:937-44

Sadi G, Bozan D, Yildiz HB. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Molecular Cellular Biochemistry* **393**: 111-122

Salamanca-Gómez F. 2004. Los genes y la enfermedad de Parkinson. *Gaceta Médica de México* **140**: 475-476

Santamaría A, Jiménez ME. 2005. Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview. *Current Topics of Neurochemistry* **4**:1–20

Saravanan G, Ponmurugan P. 2010. Ameliorative potential of S-allylcysteine: effect on lipid profile and changes in tissue fatty acid composition in experimental diabetes. *Experimental and Toxicologic Pathology* **64**: 639–644

Saravanan G, Ponmurugan P, Senthil GP, Rajarajan, T. 2009. Modulatory effect of S-allylcysteine on glucose metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Function Foods* **1**: 336–340

Sayre LM, Perry G, Smith MA. 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* **21**: 172-88

Sherratt PJ, Hayes JD. 2001. Glutathione S-transferases. In: Handbook of Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. Ioannides C (Eds). United Kingdom. John Wiley & Sons Ltd: 319-352

Shukla V, Mishra SK, Pant HC. 2011. Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Sciences*. **2011**: 572634. doi: 10.1155/2011/572634

Sierra V, Guzmán G, Olivares C, Torres R, Hicks G. 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México* **17**:135-145



Sies H. 1991. Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Wiener klinische Wochenschrift* **69**: 965-968

Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82**: 291-295

Silva-Islas C, Santana RA, Colín-González AL, Maldonado PD. 2012. Nrf2 Activation, an Innovative Therapeutic Alternative in Cerebral Ischemia. In: *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke*. Dr. Maurizio Balestrino (Ed.), Croacia. InTech: 347-378

Singh RP, Sharad S, Kapur S. 2004. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine* **5**: 218-225

Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**: L1005–L1028

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research* **62**:5196-5203

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-Del Valle N, Huang P. 2008. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**:1343-1374

Tsai SJ, Chiu CP, Yang HT, Yin MC. 2011. S-allylcysteine, S-ethyl cysteine, and S-propyl cysteine alleviate β -amyloid, glycation, and oxidative injury in brain of mice treated by D-galactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 6319–6326

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**:44-84



Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. 2004. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology* **157**: 1015-1022

Vaziri ND. 2012. Protective effect of Nrf2 and catalase in maternal diabetes-induced perinatal hypertension and kidney disease. *Diabetes* **61**:2400-2402

Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* **17**: 11–21

Villamena F. 2013. Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis. USA. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-57218-4. 446 pages.

Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhua X. 2013. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. **8**:1240-1247

Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG.1992. In vitro virucidal effects of allium sativum (garlic) extract and compounds. *Planta Med* **58**: 417-423

Yan CK & Zeng FD. 2005. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **5**: 61 – 69

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and exprssion. *Free Radical Biology & Medicine* **33**: 337–349

Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Letters* **6**: 3029-3036