



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA ADMINISTRACIÓN DE S-ALILCISTEÍNA
(SAC) DISMINUYE EL DAÑO INDUCIDO POR EL
ÁCIDO QUINOLÍNICO. EFECTO TERAPÉUTICO.**

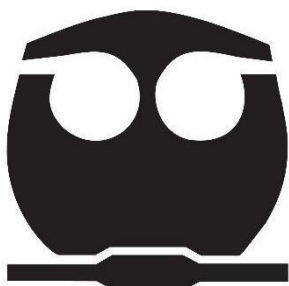
TESIS

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

PRESENTA

TANIA GUADALUPE CANO SANTOS

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

2017



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: JOSE PEDRAZA CHAVERRÍ**

VOCAL: **Profesor: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ**

SECRETARIO: **Profesora: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesora: AURORA LARA NUÑEZ**

2° SUPLENTE: **Profesora: ALEJANDRA QUIJANO MATEOS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

SE AGRADECE AL **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT-241655)** POR LA BECA OTORGADA A LA ALUMNA (**TANIA GUADALUPE CANO SANTOS NO. CUENTA 308026915**) DURANTE EL PERIODO DE AGOSTO A DICIEMBRE DE 2016.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR UN DONATIVO DE **CONACYT No. 241655.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B CARLOS ALFREDO SILVA ISLAS _____

SUSTENTANTE:

TANIA GUADALUPE CANO SANTOS _____



INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	2
1.2 EXCITOTOXICIDAD	4
1.3 ESTRÉS OXIDANTE	8
1.3.1. <i>Especies reactivas de oxígeno</i>	10
1.3.2. <i>Especies reactivas de nitrógeno</i>	14
1.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	15
1.5. ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y DE FASE II	17
1.5.1. <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	17
1.5.2. <i>Glutación peroxidasa (GPx)</i>	17
1.5.3. <i>Glutación S-Transferasa (GST)</i>	18
1.6. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2	19
1.6.1. <i>Factor de transcripción Nrf2 y la vía Keap1/Nrf2/ARE</i>	19
1.7. ÁCIDO QUINOLÍNICO	23
1.8. S-ALILCISTEÍNA	26
1.8.1. <i>Efecto biológico</i>	27
1.8.2. <i>Toxicidad</i>	28
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	31
4.1. OBJETIVO GENERAL	31
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	31
5. METODOLOGÍA Y MATERIAL	33
5.1. REACTIVOS	33
5.2. ANIMALES	33
5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
5.4. LESIÓN INTRAESTRIATAL	34
5.5. VALORACIÓN MOTORA	35
5.5.1. <i>Prueba de asimetría motora</i>	35
5.5.2. <i>Conducta de rotación</i>	36
5.6. PERFUSIÓN DE RATAS PARA OBTENCIÓN DE CEREBROS Y POSTERIOR INCLUSIÓN	36
5.7. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (HYE)	37
5.8. TINCIÓN DE VERDE DE FLUORO JADE B (FJ-B)	37
5.9. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE NRF2	37
5.10. OBTENCIÓN DE TEJIDO PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	38
5.11. ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL (SOD)	38
5.12. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)	39
5.13. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)	39
5.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
6. RESULTADOS	41
6.1. VALORACIÓN MOTORA	41
6.2 HISTOLOGÍA. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (HYE)	45
6.3 NEURODEGENERACIÓN. TINCIÓN CON FLUORO JADE B (FJ-B)	47
6.4 EXPRESIÓN DE NRF2 EN ESTRIADO DE RATA	49



6.5 ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y DE FASE II.....	50
7. DISCUSIÓN.	53
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS.....	59
10. REFERENCIAS.....	60



ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4 isoxazolpropiónico.
ARE	Elemento de respuesta antioxidante.
CAT	Catalasa.
ERN	Especies reactivas de nitrógeno.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FAD	Flavín adenín dinucleótido.
FMN	Flavín mononucleótido.
FJ-B	Fluoro-jade B.
GPx	Glutación peroxidasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación disulfuro.
GST	Glutación S-transferasa.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
HyE	Hematoxilina-eosina.
Keap 1	Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido.
NMDA	N-metil-D-aspartato.
\cdot NO	Óxido nítrico.
NOS	Sintasa de óxido nítrico.
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2.
O ₂ \cdot^-	Anion superóxido.
\cdot OH	Radical hidroxilo.
ONOO $^-$	Peroxinitrito.
QUIN	Ácido quinolínico.
SAC	S-alilcisteína.
SOD	Superóxido dismutasa.
SSI	Solución salina isotónica.



RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan una disfunción progresiva de la actividad cerebral, así como pérdida celular en distintas regiones del cerebro. Las causas son diversas, pero comparten aspectos fisiopatológicos como la excitotoxicidad, causada por la sobreactivación de los receptores de ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), que incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular e induce un estado oxidante que causa daño y muerte neuronal. El cerebro es vulnerable al daño oxidante y si la excitotoxicidad se mantiene por un periodo largo su capacidad antioxidante es ineficiente. Un modelo experimental para estudiar la neurodegeneración es mediante la administración intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN), un agonista de los receptores NMDA, que induce un estado de estrés oxidante/nitrosante en la célula. La búsqueda de alternativas médicas para contrarrestar los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas aún continua. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto post-lesión de la S-alilcisteína (SAC) un compuesto del ajo que ha mostrado actividad como: antioxidante directo e indirecto, antiapoptótico, antiinflamatorio y neurotrófico; sobre las alteraciones conductuales, morfológicas y bioquímicas que se inducen en el modelo con QUIN. La SAC (100 mg/kg) se administró 24 h después del QUIN (240 nmol) y cada 24 h durante 6 días. Se evaluó la simetría motora en los animales en los días -1, 2 y 6 de la administración con QUIN. El día 7 después de la administración del QUIN se evaluó la conducta de rotación, el daño histológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina (HyE) y la neurodegeneración mediante la tinción con fluoro jade B (FJ-B). Se midió la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD); así como la expresión del factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) por Western blot. La administración de SAC disminuyó significativamente la conducta de simetría motora y la conducta de rotación; así como los cambios morfológicos en el estriado, inducidos por el QUIN. El efecto protector de la SAC no estuvo relacionado con cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes y en los niveles del factor Nrf2. Sin embargo, el efecto protector de la SAC sugiere que podría ser utilizada como una alternativa terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas.



1. Introducción

1.1 *Enfermedades neurodegenerativas*

Las enfermedades neurodegenerativas representan un grupo de padecimientos crónicos que se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva, afectando a la población general teniendo importantes repercusiones sociales y económicas (Corona-Vázquez, 2002). Diversos factores genéticos y ambientales participan en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas produciendo alteraciones de los sistemas cognitivos, sensitivos y motores en diversas regiones del cerebro, lo cual influye en el tipo de padecimiento y a su vez se refleja en las características de la enfermedad. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer se ha observado una depleción en neuronas colinérgicas del hipocampo, amígdala y corteza; en la enfermedad de Parkinson son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y ganglios basales las afectadas; en enfermedades como la de Huntington son las neuronas espininosas medianas de los ganglios basales y del tálamo y en la esclerosis lateral amiotrófica se han descrito disminuciones en la población de motoneuronas (Jordán, 2003).

Sin embargo, estas enfermedades tienen en común varios mecanismos de daño, como lo son la generación de radicales libres y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), el aumento en la cantidad intracelular de Ca^{2+} , la excitotoxicidad, entre otros. Estos y otros mecanismos promueven la muerte celular y de esta manera provocan la neurodegeneración del tejido cerebral (Martínez et al., 2003).

En la actualidad el estudio de las enfermedades neurodegenerativas y las alternativas farmacológicas para estos padecimientos es de suma importancia, por esta razón hoy en día, la farmacología se encuentra en la búsqueda de nuevos principios activos que interfieran con los procesos neurodegenerativos, manteniendo abiertas dos grandes líneas de investigación. La primera intenta prevenir, retardar o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisores, presentando como objetivo principal su



mantenimiento. La segunda centra sus estudios en los procesos de muerte neuronal y en la búsqueda de fármacos que modulen las rutas moleculares y celulares implicadas en estos procesos (Segura et al., 2003).

En México según el INEGI 2014 las muertes ocasionadas por las enfermedades del sistema nervioso central representaron la décima causa de muerte con un total de 10,855 decesos (Figura 1), en esta categoría se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, las cuales en el mismo año contribuyeron con el 34% de las muertes (total de 3475 muertes).

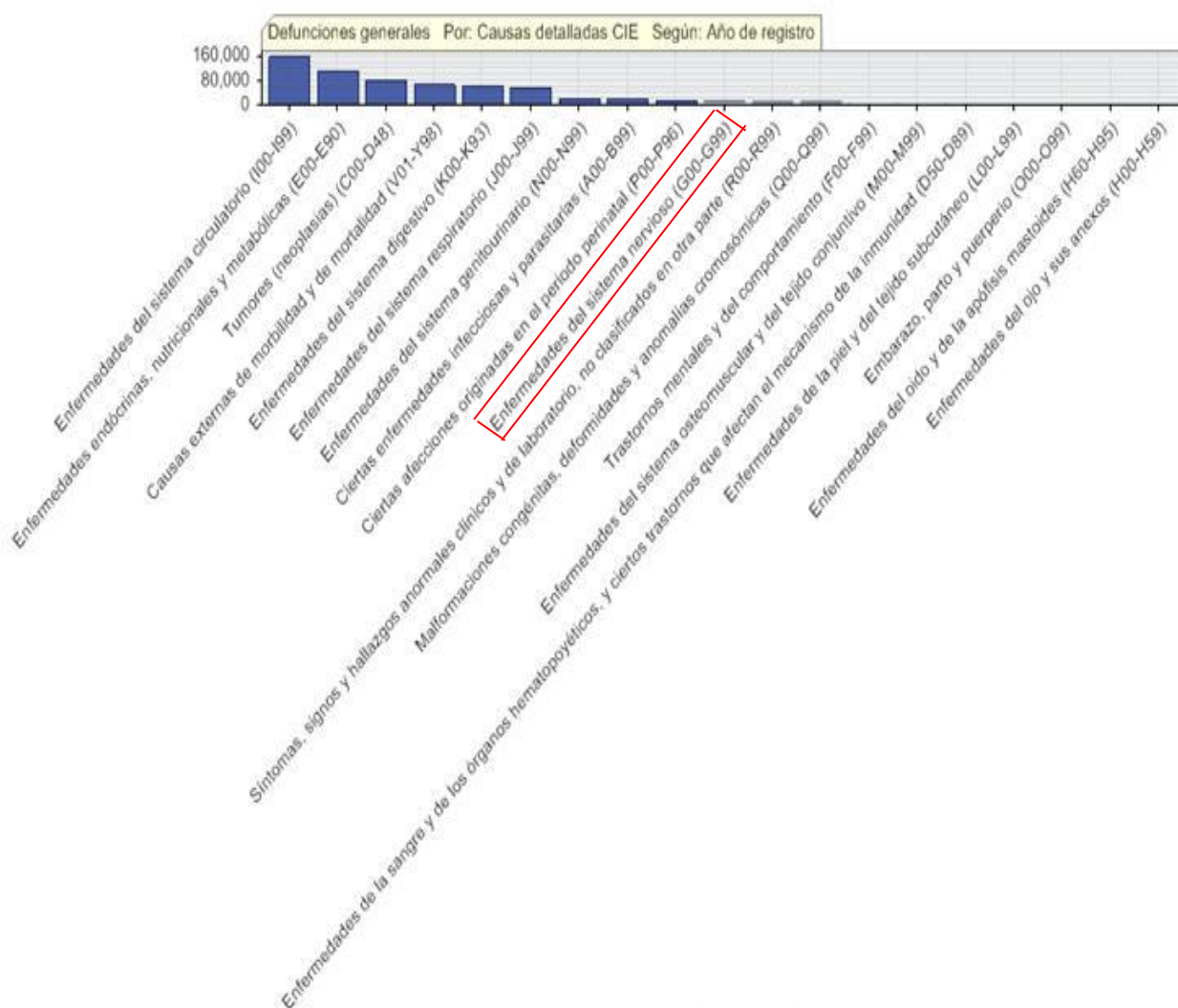


Figura 1. Causas de mortalidad en México. Se observan las principales causas de muerte, siendo la décima causa las enfermedades del sistema nervioso (INEGI, 2014).



Las muertes asociadas a las enfermedades neurodegenerativas han ido en incremento con los años (Figura 2) debido a que este tipo de enfermedades en la mayoría de los casos se presentan en la senectud y este tipo de población en México va aumentando con el paso de los años.

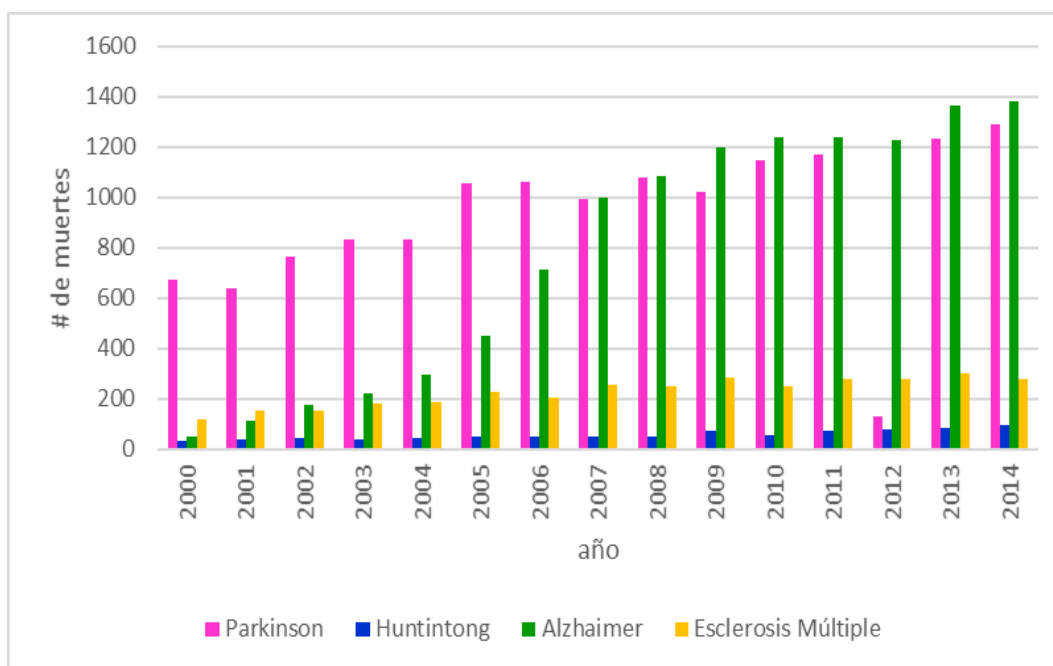


Figura 2. Mortalidad asociada a enfermedades neurodegenerativas. Se presenta el número de muertes asociadas a las principales enfermedades neurodegenerativas en los periodos comprendidos del año 2000 al 2014 (INEGI, 2014).

1.2 Excitotoxicidad

Uno de los mecanismos fundamentales en la muerte neuronal es la excitotoxicidad (Olney, 1986), que se refiere a la lesión y muerte de las neuronas derivadas de la exposición prolongada a glutamato debido a la afluencia excesiva de Ca^{2+} y producción de ERO que conduce a la activación de enzimas que degradan proteínas, membranas y ácidos nucleicos (Dong et al., 2009).

El aminoácido glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (Gazullaa & Cavero, 2006), se encuentra en concentraciones elevadas en las terminales nerviosas, así como en bajas concentraciones en el espacio extracelular ($< 1 \mu\text{M}$) (Ottersen & Storm, 1984). Las neuronas glutamatérgicas comprenden alrededor del 80% de la población total de neuronas



de la corteza cerebral (Somogyi et al., 1998), participa en varios procesos fisiológicos de importancia como el desarrollo de la plasticidad, la memoria y el aprendizaje, así como en varias patologías, como; epilepsia, isquemia cerebral, Parkinson, esquizofrenia, entre otras (Amara & Fontana, 2002; Shigeri et al., 2004). Las acciones fisiológicas del glutamato están mediadas a través de la activación de dos familias de receptores: los receptores metabotrópicos y los receptores ionotrópicos (Luján-Miras, 2005).

Los receptores metabotrópicos de glutamato comprenden una familia heterogénea de receptores que están vinculados a proteínas G, se han clonado y caracterizado ocho receptores metabotrópicos, mGluR1s al mGluR8s, que se dividen en 3 grupos de acuerdo a las vías de señalización que activan. A diferencia de los receptores ionotrópicos la unión de glutamato a estos receptores no activa la apertura de un canal de forma intrínseca, sino que regula indirectamente la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal a través de la activación o inhibición de las diversas vías de señalización. Por esta razón, la activación de éstos receptores es más lenta en el inicio y más duradera en comparación con los ionotrópicos (Simeone et al., 2004).

Los receptores ionotrópicos de glutamato se encuentran involucrados en la neurotransmisión rápida en el cerebro, son permeables a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ y se clasifican en tres tipos, en función del agonista que los activa: receptores ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores de ácido kaínico (kainato) (Lujan-Míras, 2005). Estos dos últimos receptores también se clasifican como receptores no NMDA (Nakanishi, 1992).

Los receptores NMDA (Figura 3) se componen de un conjunto de subunidades heterotetraméricas NR1 y NR2, estos receptores son permeables a la afluencia de Na^+ , Ca^{2+} y el eflujo de K^+ . El sitio de unión a glutamato se localiza en la subunidad NR2, mientras que el sitio de unión para la glicina se ubica en NR1. Una característica única del receptor NMDA es su sensibilidad al voltaje dependiente del Mg^{2+} , que los mantiene bloqueados. Además, el complejo receptor contiene sitios de unión para una variedad de reguladores endógenos,



como poliaminas, zinc y protones. Cada subunidad tiene un dominio NH₂ terminal-extracelular, cuatro dominios transmembranales (M1 a M4) de los cuales la subunidad M2 contribuye al revestimiento del poro del canal receptor (Nakanishi, 1992).

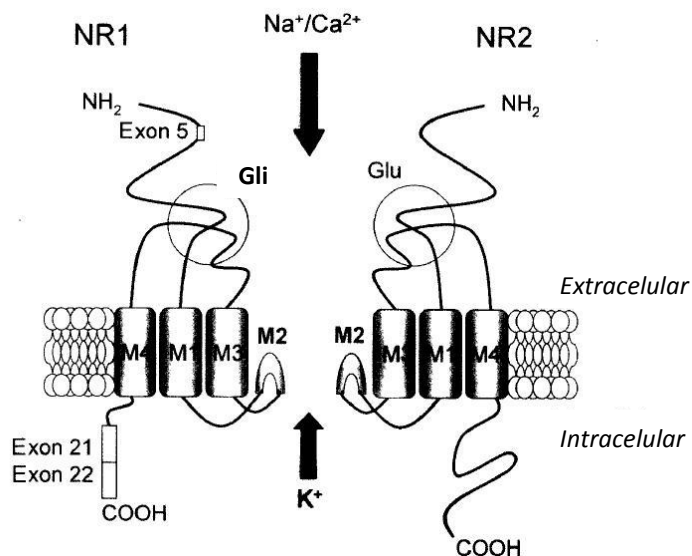


Figura 3. Esquema de la estructura del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Representación topológica de los tres segmentos transmembranales (M1, M3 y M4), el segmento y la horquilla modelo de bucle de las subunidades NR1 y NR2. El segmento M2 de cada subunidad contribuye al revestimiento del poro del canal receptor. Los sitios de unión para glutamato (Glu) y glicina (Gli) se observan rodeados por círculos y alternativamente empalmados en rectángulos (exones 5, 21 y 22). El canal es permeable a iones Ca²⁺, Na⁺ y K⁺ (Tomada de Kutsuwada et al., 1992).

La activación de los receptores no-NMDA induce la afluencia de iones Na⁺ y salida de K⁺ y la posterior despolarización de la membrana plasmática, la activación del ion Mg²⁺ bloquea el canal del receptor NMDA. En el momento que el Mg²⁺ es removido, la unión glutamato-glicina (co-agonista del glutamato) a sus sitios de unión activa los receptores NMDA, de esta manera hay una mayor entrada de Na⁺ y Ca²⁺ a la célula (Sánchez et al., 2008). En otras palabras, la presencia de ambos receptores al mismo tiempo en la misma neurona, tiene una función secuencial, iniciando por una rápida despolarización inicial que es mediada por los receptores no-NMDA, seguido de una despolarización prolongada consecuente a la activación de receptores NMDA.

Ya que el glutamato activa a sus receptores, este debe ser eliminado del espacio sináptico; por uno de los tres mecanismos de eliminación de neurotransmisores



conocidos; difusión, degradación enzimática y recaptura. Este último mecanismo es el más importante y cumple una doble función: por un lado, termina con la acción sináptica del glutamato y por el otro permite su recuperación para que esta molécula pueda ser eventualmente reutilizada. La recaptura del glutamato al interior de las células se lleva a cabo por proteínas específicas llamadas transportadores, las cuales utilizan los gradientes iónicos de sodio y potasio para transportar al glutamato desde el espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y las células gliales (Flores-Herrera et al., 2005).

El Ca^{2+} tiene diversas funciones en las neuronas, estas lo utilizan en el control del crecimiento celular y la diferenciación (Yuste & Katz, 1991), en mantener la estructura del citoesqueleto (Trifaro & Vitale, 1993), la excitabilidad de la membrana (Marty & Neher, 1985), la exocitosis, la actividad sináptica (Robitaille & Charlton, 1992) y regulación de la muerte celular (Buchholz et al., 2007). Debido a que juega un papel muy importante a nivel neuronal su homeostasis es clave para determinar la supervivencia o la degeneración neuronal.

La célula posee hasta 7 mecanismos diferentes para mantener la concentración citoplasmática de Ca^{2+} a nivel submicromolar (Carafoli, 1987). La concentración de Ca^{2+} intracelular se regula por proteínas de unión específica o secuestro a nivel de los organelos de almacenamiento, como el retículo endoplásmico y la mitocondria.

El retículo endoplásmico presenta una bomba de Ca^{2+} , pero tiene una baja capacidad de transporte de este, mientras que sucede lo contrario con la mitocondria ya que posee un canal uniporte energizado por el gradiente electroquímico de protones en la membrana interior mitocondrial, el cual tiene una alta capacidad de transporte, pero una muy baja afinidad por este catión (Carafoli, 1987). Ambos también poseen mecanismos de salida de Ca^{2+} . La mitocondria excluye al catión gracias a un intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (o en algunos casos $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$), el cual es electroneutro, mientras que la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico se logra a través de canales regulados: un canal de rianodina y un canal sensible a fosfatidilinositol-3-fosfato (Berridge, 1984), en el cual se induce



la liberación cuando se produce este mensajero por acción de las diferentes fosfolipasas C sobre el fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato, esto conlleva a la liberación del diacilglicerol, otro segundo mensajero fundamental, que a su vez estimula la proteína cinasa C, con importantes implicaciones en los mecanismos de señalización celular (Berridge, 1984).

Se ha identificado otra forma de regular el Ca^{2+} , la cual está presente en el aparato de Golgi y en vesículas secretoras de insulina en las células β del páncreas (Mitchell et al., 2004). Sin embargo, en estas últimas células su función parece estar más asociada a la secreción de la hormona que a la regulación intracelular del Ca^{2+} .

1.3 Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como el desequilibrio bioquímico producido por la formación excesiva de especies reactivas y radicales libres que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por las defensas antioxidantes, provocando un daño potencial en el organismo (Halliwell, 1992). El estado de estrés oxidativo tiene un papel crucial en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, tales como: Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Pérez & Arancibia, 2007).

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, que en su estructura atómica presentan uno o varios electrones desapareados en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera inestabilidad. Algunas de sus características es que son muy reactivos y tienen una vida media corta, por lo tanto, actúan cerca del sitio en que se formaron (Venereo, 2002).

Como producto del metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, como lo son: las especies ERO y ERN (Tabla 1). Estas se pueden clasificar en especies radicales y no radicales y cuya principal fuente son la mitocondria, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y el retículo endoplásmico. Aunque también son generados por diversos factores como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones, el tabaco, los



medicamentos y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Saavedra et al., 2010).

Cabe señalar que no todas las especies reactivas son radicales libres (Tabla 1), ya que algunas no presentan las características descritas anteriormente, pero su importancia se encuentra en que pueden difundir y transformarse fácilmente en radicales libres, lo que les da la capacidad de ser dañinas para la célula (Kohen & Nyska, 2002).

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN).

	ERO		ERN	
RADICALES	Anión superóxido	$O_2^{\cdot-}$		
	Hidroxilo	$\cdot OH$	Óxido nítrico	$\cdot NO$
	Peroxilo	$\cdot OOR$	Dióxido de nitrógeno	$NO_2^{\cdot-}$
	Perhidroxilo	$\cdot OOH$	Nitrato	NO_3^{\cdot}
	Alcoxilo	$\cdot OR$		
	Dióxido de carbono	$CO_2^{\cdot-}$		
	Oxígeno singulete	$^1\Sigma g^+ O_2$		
NO-RADICALES	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Ácido nitroso	HNO_2
	Ácido hipocloroso	$HOCl$	Catión nitrosilo	NO^+
	Ozono	O_3	Anión nitroxilo	NO^-
	Oxígeno singulete	$^1\Delta g O_2$	Tetróxido de dinitrógeno	N_2O_4
	Peróxidos orgánicos	$ROOH$	Trióxido de nitrógeno	N_2O_3
			Peroxinitrito	$ONOO^-$
			Peroxinitrato	O_2NOO^-
			Ácido peroxinitroso	$ONOOH$



1.3.1. Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, encontrándose en el 89% del peso del agua del mar y al menos en el 47% de la corteza terrestre (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2006). El oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, pero en altas concentraciones o bajo ciertas condiciones diferentes a las normales, este puede llegar a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las ERO (Hansberg, 2002).

Las ERO representan la clase más importante de especies oxidantes en los sistemas vivos (Miller et al., 1990), de las cuales hay tres con una mayor importancia fisiológica. Estas se forman como intermediarios en el proceso de reducción univalente de una molécula de O_2 a H_2O en el metabolismo celular, estos intermediarios son; radical anión súper oxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Figura 4) (Marín-García, 2012), estas moléculas tienen una gran capacidad de reacción debido a su alta inestabilidad química.

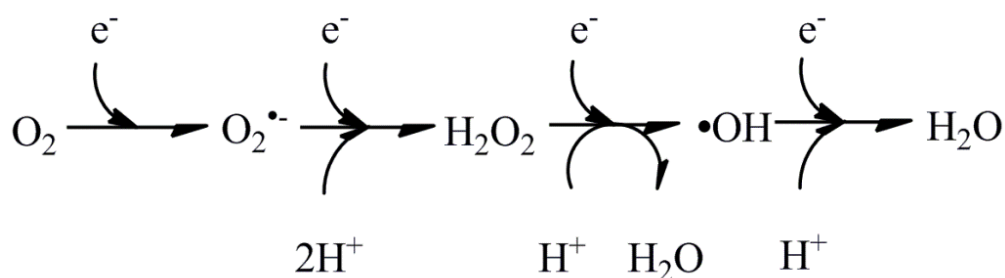


Figura 4. Vía de reducción univalente del O_2 .

La principal fuente endógena de ERO es la mitocondria debido a la fuga de electrones durante su transporte en la cadena respiratoria (Dasuri et al., 2013). La mitocondria es la fuente principal de generación de $O_2^{\bullet-}$ produciendo alrededor del 85% de este anión en la célula. Esta producción se presenta cuando la



mitocondria incrementa la actividad o hay inhibición de la cadena respiratoria, teniendo como resultado una producción crónica de este radical favoreciendo un estado oxidante en la célula (Maia et al., 2007).

La cadena transportadora de electrones (CTE) consta de cuatro complejos proteicos (I, II, III y IV) que a través de reacciones redox secuenciales transportan electrones de un complejo a otro hasta llegar al O_2 (Szewczyk & Wojtczak, 2002). Durante este transporte puede ocurrir la pérdida del 2-5% de los electrones que escapan para reaccionar directamente con el O_2 (Boveris & Chance, 1973) y generar ERO. Estas son producidas principalmente por los complejos mitocondriales I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo bc1) y han tomado importancia ya que se ha descrito que tienen participación en diferentes rutas celulares (diferenciación celular, apoptosis, envejecimiento, etc.). Cuando existe una sobreproducción de estas moléculas contribuyen a la patogenicidad de diferentes enfermedades (Hamanaka & Chandel, 2010).

Los complejos I y III de la CTE son los principales sitios de producción de $O_2^{\cdot-}$, esto genera una incapacidad de las mitocondrias para poder producir adenosín trifosfato (ATP) (Andreyen et al., 2005). La mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) que a partir del $O_2^{\cdot-}$, que se genera por la respiración mitocondrial y es liberado a la matriz mitocondrial, produce H_2O_2 . Si el $O_2^{\cdot-}$ es producido por el complejo III, este se libera al espacio intermembranal donde es convertido por la superóxido dismutasa dependiente de cobre zinc (Cu/Zn-SOD) en H_2O_2 (Wallace et al., 2010).

Si la concentración de O_2 rebasa los límites estimados, puede reaccionar en presencia de hierro dando lugar a la formación de radicales hidroxilo ($\cdot OH$) mediante la reacción de Fenton. Así mismo, el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar entre sí, en presencia de cationes metálicos, mediante la reacción de Haber-



Weiss, generando igualmente $\cdot\text{OH}$, una especie altamente reactiva y oxidante. Alternamente el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) para formar peroxinitrito (ONOO^-) (Figura 5) (Halliwell, 1992; Peuchen et al., 1997).

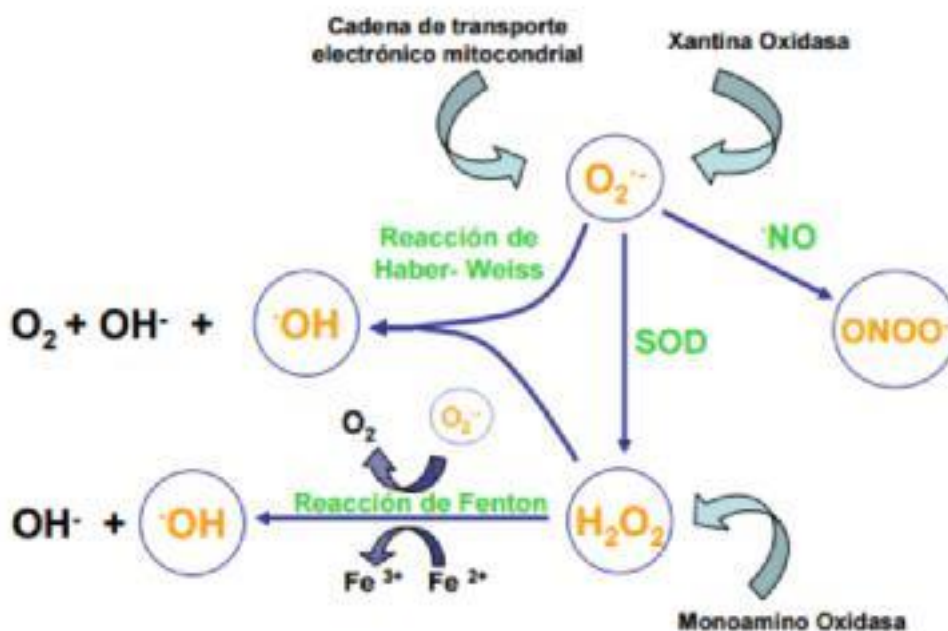


Figura 5. Esquema de generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Tomada de Rodríguez, 2009). $\text{O}_2^{\cdot-}$ anión superóxido, O_2 oxígeno molecular, $\cdot\text{NO}$ óxido nítrico, $\cdot\text{OH}$ radical hidroxilo, ONOO^- peroxinitrito, SOD superóxido dismutasa, H_2O_2 peróxido de hidrógeno.

La mitocondria y los peroxisomas son considerados como las máximas fuentes productoras de ERO; sin embargo, existen otras fuentes endoteliales que forman estas especies como lo son: 1) la NAD(P)H oxidasa localizada en la membrana plasmática de células de músculo liso vascular y células endoteliales. Estas enzimas utilizan NADH o NAD(P)H como donadores de electrones para generar $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Sumimoto et al., 2005); 2) la xantina oxidasa que utiliza xantina o hipoxantina para originar ácido úrico. Existe en dos formas, una deshidrogenasa que origina NADH y una oxidasa que genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Hammarström et al., 1999); 3) la sintasa de óxido nítrico (NOS) endotelial es un homodímero, cuyos monómeros se constituyen por un dominio de reductasa (con sitios de enlace para NADPH y nucleótidos de flavina (FAD y FMN)) y por un dominio oxigenasa (conteniendo Zn,



tetrahydrobiopterina, grupo hemo y L-arginina) que se encuentran unidas por la región a la que se enlaza la calmodulina. En ausencia de cofactores como la tetrahydrobiopterina, la NOS puede desacoplarse y reducir el O_2 para producir $O_2^{\cdot-}$ en lugar de transferir electrones a la arginina (Suzuki et al., 2006); 4) el citocromo P450 que oxida ácidos grasos insaturados y xenobióticos y reduciendo el O_2 a $O_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 (Figura 6).

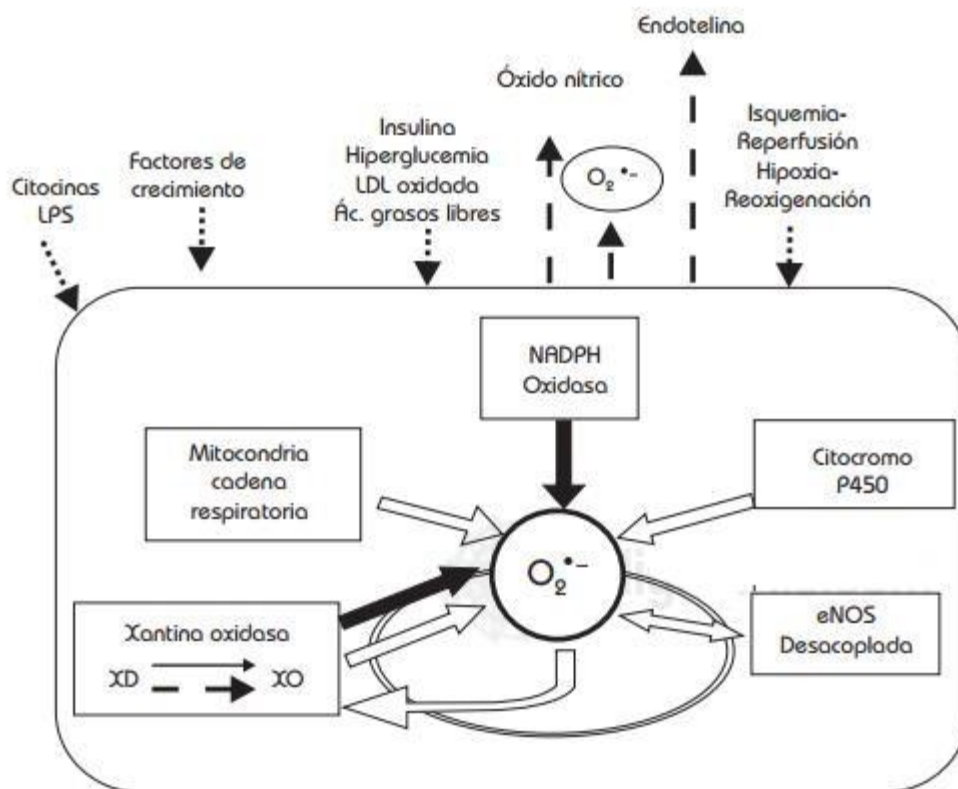


Figura 6. Fuentes productoras de radicales libres (Tomada de Reyes et al., 2006). $O_2^{\cdot-}$ anión superóxido, XD xantina deshidrogenasa, XO xantina oxidasa, eNOS sintasa de óxido nítrico endotelial, LPS lipopolisacarido, LDL lipoproteína de baja densidad.



1.3.2. Especies reactivas de nitrógeno

Las ERN incluyen especies derivadas del nitrógeno que pueden o no ser radicales libres. Entre las ERN se encuentran las especies radicales; óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$) así como los no radicales; catión nitronio (NO^{2+}) y peroxinitrito (ONOO^-), entre otros (Tabla 1). Dentro de las ERN, el $\cdot\text{NO}$, es de gran importancia debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos. Entre sus funciones se encuentran: 1) el control de la presión sanguínea, actuando como factor de relajación de vasos y músculo liso; 2) participación en el proceso de neurotransmisión; 3) componente del sistema inmune en la vía fagocítica; y 4) la regulación de caspasas, las cuales están involucradas en procesos apoptóticos (Chirino et al., 2006).

El $\cdot\text{NO}$ es generado en los tejidos biológicos por la familia de isoenzimas de la NOS, que lo sintetiza a partir de la L-arginina, O_2 y NADPH (Figura 7). Existen tres isoformas de esta enzima, producto de tres genes distintos: la tipo I o neuronal (nNOS) y la tipo III o endotelial (eNOS) son constitutivas y reguladas por concentraciones intracelulares del complejo Ca^{2+} -calmodulina. La isoforma tipo II o inducible (iNOS) es independiente de Ca^{2+} y es regulada transcripcionalmente por citocinas. En presencia de O_2 , estas isoenzimas catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina con la formación de $\cdot\text{NO}$ a través de una reacción oxidativa (Valko et al., 2007; Ljubuncic et al., 2010).

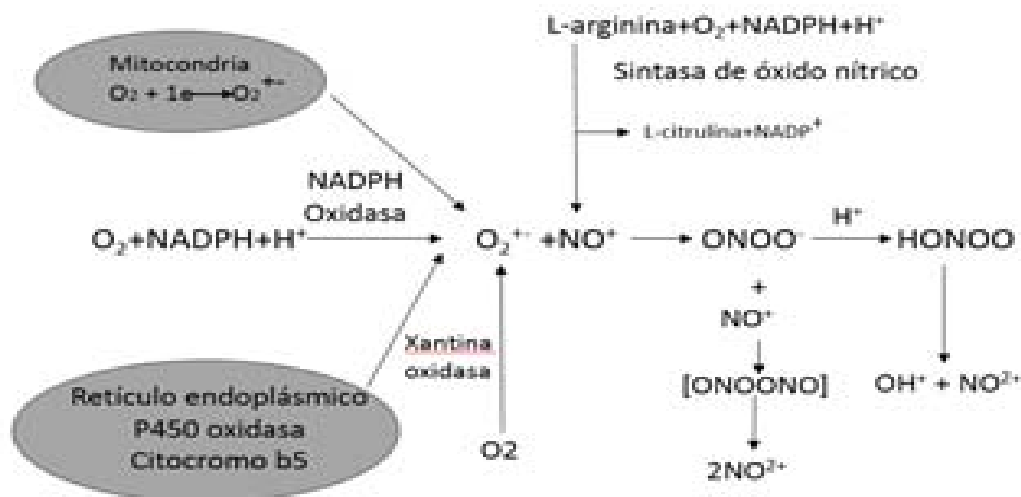


Figura 7. Esquema de generación de especies reactivas de nitrógeno. La reacción entre el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el óxido nítrico ($\cdot NO$) permite la formación de ($ONOO^-$), el cual a su vez es precursor de otras ERN como el ácido peroxinitroso (HONOO) y del radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}). El $O_2^{\bullet-}$ se forma de la reducción del oxígeno molecular por un electrón que puede provenir del transporte de electrones en la mitocondria o el retículo endoplásmico o de la acción enzimática de diversas enzimas como la NADPH oxidasa. El $\cdot NO$ proviene de la reacción enzimática de la NOS (Tomada de Chirino et al., 2006).

1.4 Sistemas antioxidantes

De acuerdo a la definición de Halliwell y Gutteridge un antioxidante con función biológica es cualquier sustancia que, retarda, previene o remueve significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2015). En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción (Ames et al., 1993). Los antioxidantes se han clasificado de diferentes maneras, de las cuales las más utilizadas establecen las diferencias de acuerdo a su estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos.

Las defensas antioxidantes evitan la reducción univalente del O_2 (Krinsky, 1992). Dentro de los antioxidantes enzimáticos se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos las ERO, como es el caso de las superóxido dismutasas (Cu-SOD y MnSOD), la catalasa (CAT)



y la glutatión peroxidasa (GPx), entre otras. Además, la célula cuenta con enzimas que se encargan de detoxificar compuestos electrofílicos, conocidas como enzimas de fase II, como la familia de las enzimas de la glutatión-S-transferasa (GST).

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como el selenio, el zinc, o vitaminas como la riboflavina, el ácido ascórbico (vitamina C) y el α -tocoferol (vitamina E). Estos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes (Krinsky, 1992) y en algunos casos, pueden atrapar algunas especies antioxidantes.

Los sistemas de defensa antioxidante pueden actuar de la siguiente manera (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006):

- a) Agentes que catalíticamente remueven los radicales libres y otras especies reactivas. Ejemplos: enzimas como SOD, CAT, GPx y antioxidantes específicos para el grupo tiol.

- b) Proteínas que abaten la disponibilidad de los pro-oxidantes como los iones de hierro o cobre, y el grupo hemo. Ejemplos: ferritina, transferrina, haptoglobinas, hemopexina, metalotioneína o la hemooxigenasa.

- c) Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño (incluyendo el estrés oxidativo) por otros mecanismos. Ejemplo: proteínas de choque térmico localizadas en el retículo endoplásmico, el periplasma y el citoplasma. Tienen como función la estabilización y cobertura de la estructura proteica parcialmente plegada.



d) Agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO y ERN. Ejemplos: el glutatión, la bilirrubina y el ácido úrico. Algunos agentes antioxidantes de bajo peso molecular que provienen de la dieta, la vitamina C y el α -tocoferol.

1.5. Enzimas antioxidantes y de fase II

1.5.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Los oligoelementos cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn) forman parte de la estructura proteica de la SOD que es una metaloenzima, estos oligoelementos dan lugar a tres tipos de SOD en mamíferos (Jaramillo et al., 2005) las cuales están localizadas en lugares específicos. La SOD 1 o Cu/Zn-SOD que contiene cobre y zinc se ubica en el citoplasma y en el espacio inter-membranoso mitocondrial, la SOD 2 o Mn-SOD contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial y la SOD 3 o Cu/Zn-SOD que al igual que la SOD 1 contiene cobre y zinc, pero está localizada en el fluido extracelular (Gómez-Quiroz & Cuevas-Bahia, 2008). Una de las funciones más importantes de la SOD es catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , para lo que no requiere de co-sustratos. Su principal función es la protección contra el $O_2^{\cdot -}$ (Reacción 3) (Venereo, 2002).



1.5.2. Glutatión peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa es una selenoenzima o enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (LOOH), utilizando como agente reductor el GSH. Los productos de reacción son el glutatión disulfuro (GSSG) y el agua (Reacción 1) (Maiorino et al., 1991). Se encuentra presente en varias isoformas, entre las que se encuentran la GPx citosólica, la GPx plasmática y la GPx de fosfolípidos. (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).



La GPx también cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de GSH. Los productos de la reacción son glutatión oxidado (GSSG) y agua (Reacción 2).



Esta enzima se encuentra dentro de las enzimas reguladas por la activación del factor de transcripción Nrf2 (Thimmulappa et al., 2002).

1.5.3. Glutatión S-Transferasa (GST)

Las GST son una familia de enzimas que poseen dos isoformas: las GST citosólicas y las GST microsomales, estas a su vez se encuentran subdivididas. Las primeras se encuentran constituidas por dos subunidades idénticas, mientras que las GST microsomales son trímeros (Sharma et al., 2004). Su función primaria es catalizar la conjugación del GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos (RX) (Reacción 4). Las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de GPx independiente de selenio; también pueden detoxificar al 4-hidroxinonenal un producto final de la peroxidación de lípidos.





1.6. Factor de transcripción Nrf2

Las ERO y ERN juegan papeles importantes en diversas vías metabólicas y de señalización, por lo que la presencia de estas especies es necesaria para el buen funcionamiento de las células. Las ERO y ERN deben encontrarse en un balance para preservar la homeostasis celular. En caso de un aumento en las especies oxidantes y disminución en las antioxidantes o viceversa las células han desarrollado programas dinámicos para contener el estrés causado por estas moléculas. Se han descrito mecanismos que disminuyen la cantidad de ERO y ERN o estimulan su detoxificación en la fase I y II en las cuales participan diversas enzimas. En total se han descrito más de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante. Entre los factores de transcripción que se activan por ERO y ERN destacan el factor nuclear κ B (NF κ B), la proteína activadora 1 (AP1) y el factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (NFE2L2) conocido como Nrf2 (Fainstein, 2007).

1.6.1. Factor de transcripción Nrf2 y la vía Keap1/Nrf2/ARE

La inducción de la respuesta de fase II protege a las células contra el daño generado por el estrés oxidativo. El análisis genómico de las secuencias de sus promotores ha revelado que coinciden en una secuencia específica de unión llamada elemento de respuesta antioxidante (ARE).

Los ARE son elementos reguladores que actúan en cis con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA- 3', de los genes que codifican enzimas de fase II, de desintoxicación y proteínas antioxidantes como la NAD(P)H: quinona óxidorreductasa (NQO1), la GST y la glutamato cisteína ligasa (γ GCL), entre otras. Este elemento está relacionado con Nrf2 que regula un amplio grupo de genes antioxidantes y detoxificantes en diversos tipos de células (Lee y Johnson 2004).



El Nrf2 pertenece a una familia de proteínas básicas con un característico "zipper" o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal. La región básica de Nrf2 es la responsable de la unión al DNA, mientras que la región ácida se requiere para su activación transcripcional. Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, de modo que su actividad se mantiene estrictamente regulada. El peso molecular biológicamente relevante de Nrf2 es 95-110 kDa (Lau et al., 2013).

Diversos estudios *in vitro* y en sistemas celulares de mamíferos llevaron a la identificación de la proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch (Keap1), que suprime hasta en un 80% la traslocación nuclear y actividad transcripcional de Nrf2 (Fainstein, 2007).

La proteína Keap1 murina está formada por 624 aminoácidos con un peso molecular de 69 kDa, y consta de cinco dominios, dos de los cuales se consideran como dominios canónicos (Fainstein, 2007).

El Nrf2 en condiciones basales se encuentra unido a la proteína Keap1 reprimiendo su actividad, esta interacción es insuficiente para mantener a Nrf2 en el citosol y se ha descrito que Keap1 se asocia al mismo tiempo con el citoesqueleto (Copple et al., 2008).

La degradación de Nrf2 es un evento constitutivo que no requiere ninguna modificación post-transcripcional del sustrato y se ha sugerido que esto puede deberse a que Keap1 funciona como un adaptador de sustratos para el proteosoma. En cuanto a este mecanismo es importante mencionar que su selectividad y especificidad están dadas por una proteína llamada ubiquitina que se une a las proteínas que se van a degradar. Estas proteínas ubiquitinadas son reconocidas por un complejo conocido como proteosoma 26S que desdobra y digiere a las proteínas. Este proceso de poliubiquitinación y reconocimiento del sustrato requiere de la participación de varias enzimas: las E1 que activan la ubiquitina, las E2 que conjugan la ubiquitina y las E3 que unen la ubiquitina.



Se ha demostrado que Keap1 es un adaptador que une a Nrf2 con Cul-3, una proteína adaptadora del complejo E3 ubiquitina ligasa (Cullinan et al., 2004). De esta manera la activación de Nrf2 y su translocación al núcleo dependen directamente de su disociación de Keap1, que debe ser fomentada por el estrés oxidativo.

Las cisteínas son las responsables directas de la transformación estructural de Keap1 y de la liberación de Nrf2, aunque aún no se ha determinado con certeza cuales son las cisteínas que se modifican como respuesta a los inductores de estrés y electrófilos. Se han sugerido como posibles candidatos a la cisteína 183, o bien las cisteínas 273 y 288. En general se han propuesto 7 residuos de cisteína cuyos tioles se oxidan o se modifican covalentemente permitiendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (Figura 8) (Fainstein, 2007).

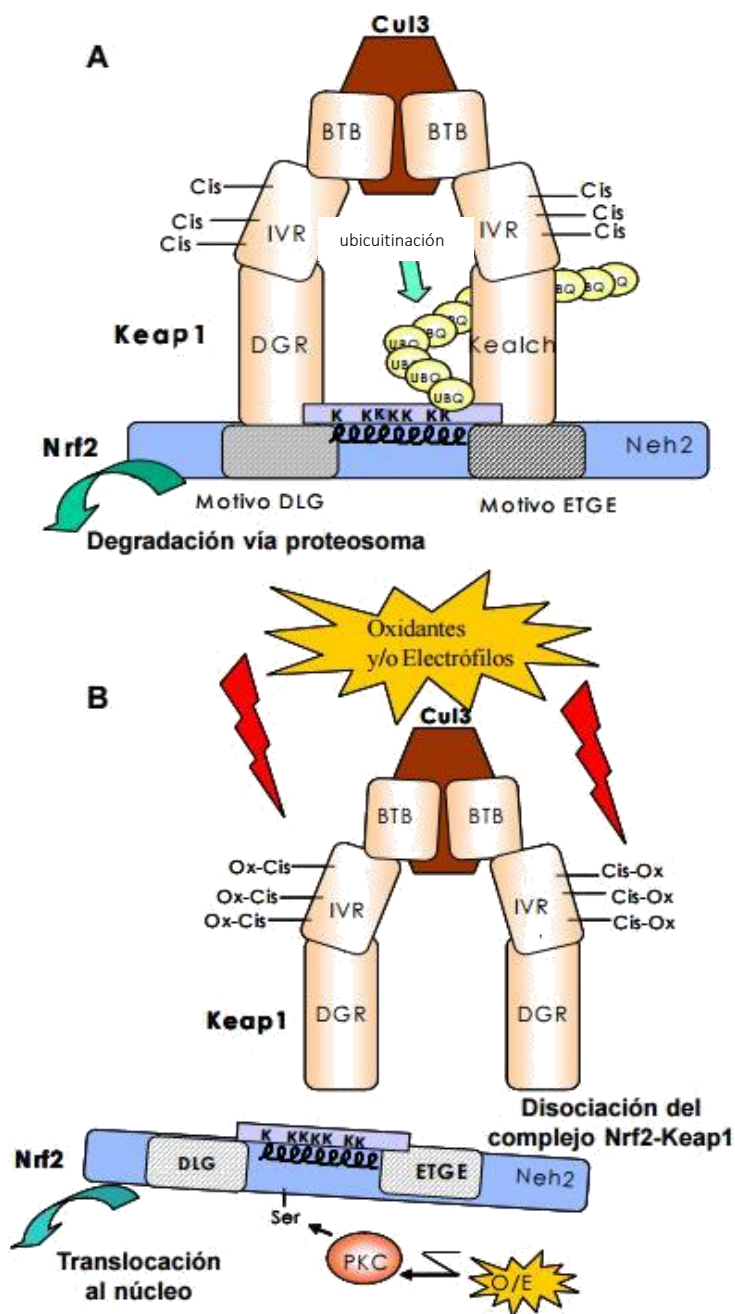


Figura 8. Modelo de activación de Nrf2.

- La homodimerización de Keap1 facilita la interacción de Cul3 con los dominios BTB e IVR, lo cual induce la ubiquitinación de los residuos de lisina de Nrf2 y promueve su degradación vía el proteosoma.
- La presencia de agentes oxidantes y/o electrófilos oxida los sulfhídridos de las cisteínas en el dominio IVR de Keap1, promoviendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1. Los oxidantes y/o electrófilos también inducen la fosforilación del residuo de serina 40 de Nrf2, y todos estos eventos culminan en la eventual translocación de Nrf2 al núcleo. (Tomada de Fainstein, 2007).



1.7. Ácido quinolínico

El ácido quinolínico (QUIN) es una endotoxina que normalmente se encuentra en el cerebro humano (Wolfensberger et al., 1983), es un metabolito endógeno del triptófano. Produce disminución en el número de axones en el cuerpo estriado; esta lesión es muy similar a la que se observa en las enfermedades de Huntington, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. Se produce a través de la vía de la kinurenina, que es la principal ruta del catabolismo del L-triptófano. Esta ruta metabólica es la principal encargada de la obtención del cofactor nicotínamida adeninucleótido (NAD^+) y la forma fosfatada (NADP^+) a partir del triptófano (Figura 9) (Braidy et al., 2010). Dentro de los metabolitos intermediarios se encuentra el QUIN que es la molécula de mayor importancia biológica para realizar este estudio (Zádori et al., 2009).

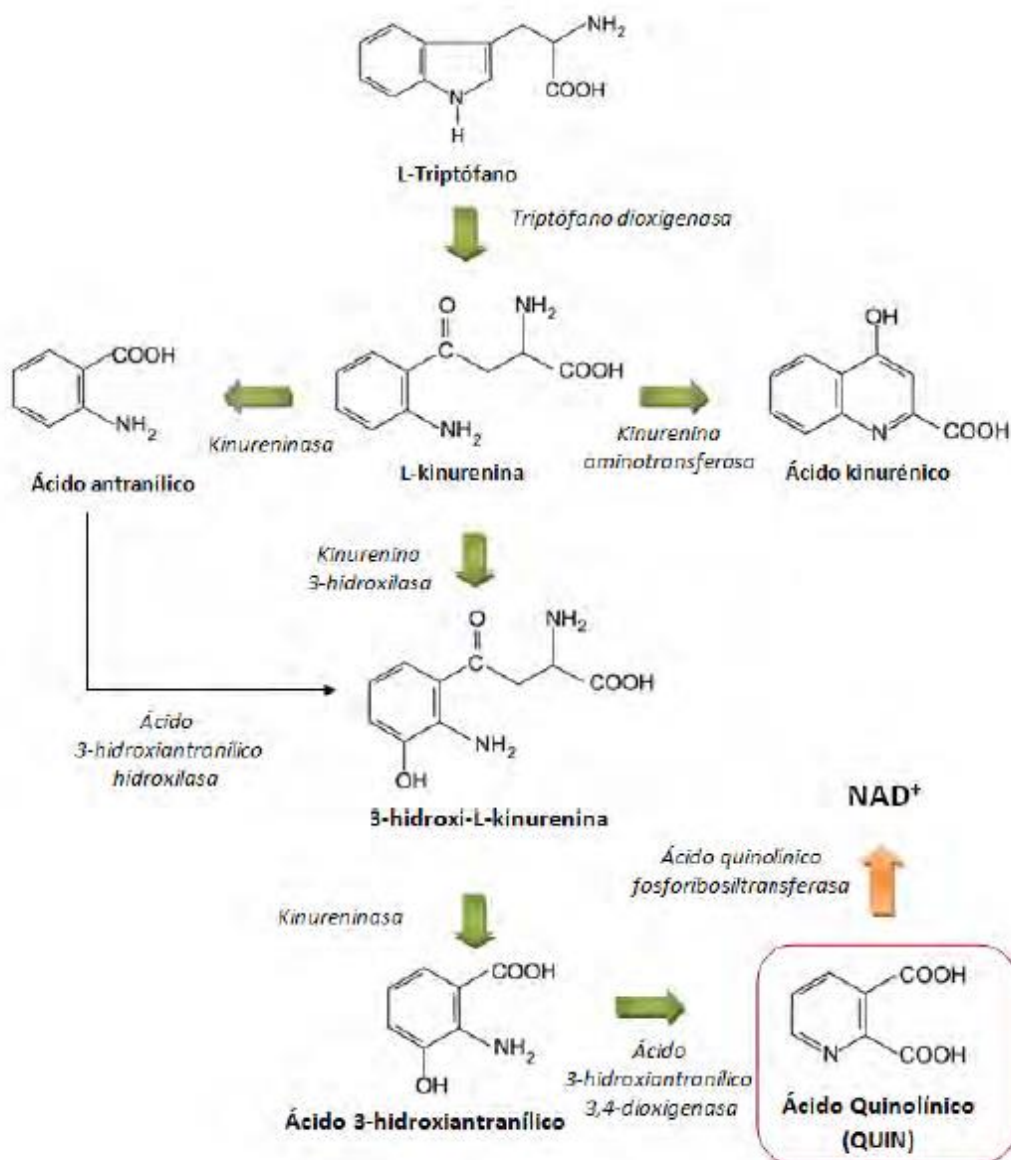


Figura 9. Principales reacciones y enzimas de la vía de la kinurenina en células de mamíferos, como una vía alterna para la síntesis de NAD⁺.



El uso del QUIN como modelo excitotóxico, se debe a su gran similitud con el glutamato y el NMDA (Figura 10). Su acción tóxica se lleva a cabo por la sobreactivación de los receptores NMDA, lo cual produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, provocando la activación de numerosas enzimas asociadas a la producción de ERO y enzimas relacionadas con el daño celular como proteasas, lipasas y endonucleasas, llevando así a la muerte celular (Aguilera et al., 2007; Maldonado et al., 2010; Pérez-Severiano et al., 2004; Santamaría et al., 2001). El QUIN actúa directamente sobre los receptores NMDA que contienen las subunidades NR2A y NR2B (Ting et al., 2009) en el cerebro, la región del estriado es en donde se encuentra un mayor número de neuronas con esta conformación de subunidades en el receptor NMDA (Li et al., 2003). Por esta razón su administración en el estriado se ha usado como un modelo excitotóxico/pro-oxidante (Schwarcz et al., 2010).

En diversos artículos se ha descrito que la administración intraestriatal de 240 nmol de QUIN incrementa el nivel de $\cdot\text{OH}$ a los 60 min (Santamaría et al., 2001), la lipoperoxidación a las 2 h (Santamaría & Rios, 1993), la actividad de la NOS dependiente de Ca^{2+} desde los 30 min (Aguilera et al., 2007) y la oxidación de proteínas a las 6 h (Colín-González et al., 2013; Santana-Martínez et al., 2014) posteriores a la lesión. También disminuye los niveles de glutatión a partir de las 4 h (Santana-Martínez et al., 2014; Santamaría et al., 2001; Cruz-Aguado et al., 2000).

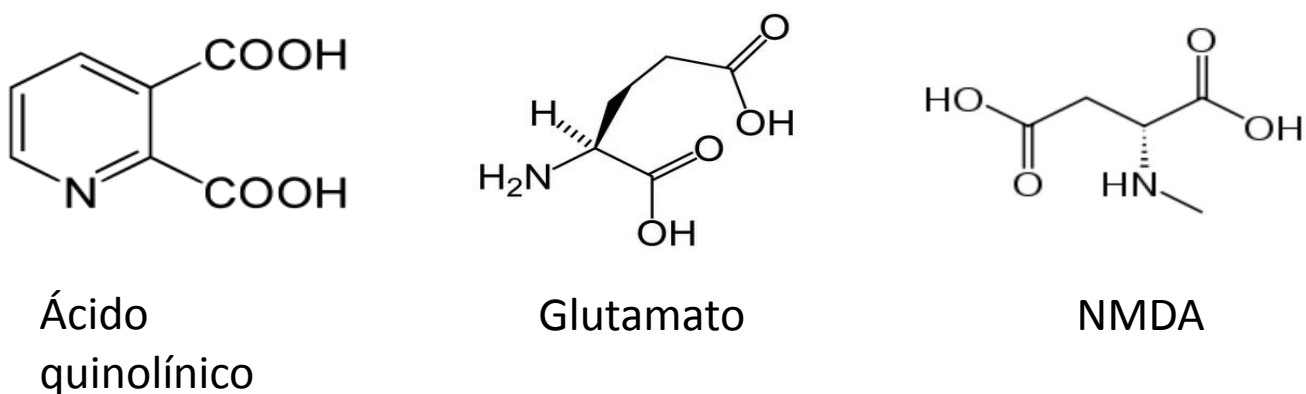


Figura 10. Estructura química del ácido quinolínico, el glutamato y el NMDA



1.8. S-alilcisteína

El *Allium sativum* conocido comúnmente como ajo está compuesto por alrededor de 30 sustancias principales que le confieren sus propiedades. Una de estas sustancias organosulfuradas se encuentra mayoritariamente en el extracto de ajo envejecido, la cual es llamada S-alilcisteína (SAC). Los efectos biológicos de este extracto son atribuidos a este compuesto, aunque la SAC también se puede encontrar en otras presentaciones del ajo como un constituyente minoritario en el ajo intacto (no más de 30 $\mu\text{g/g}$ en peso fresco) (Colín-González et al., 2012; Kodera et al., 2002), el ajo triturado (Yan & Zeng, 2005) y la cebolla (Hsu et al., 2006).

La SAC se puede formar por dos medios; por medio de una reacción enzimática a partir del catabolismo de la γ -glutamil-S-alilcisteína a SAC mediante la enzima γ -glutamilttransferasa (Figura 11A) (Kodera et al., 2002), o a partir de una síntesis química entre la L-cisteína y el bromuro de alilo (Figura 11B) (Maldonado et al., 2003; Nagae et al., 1994).

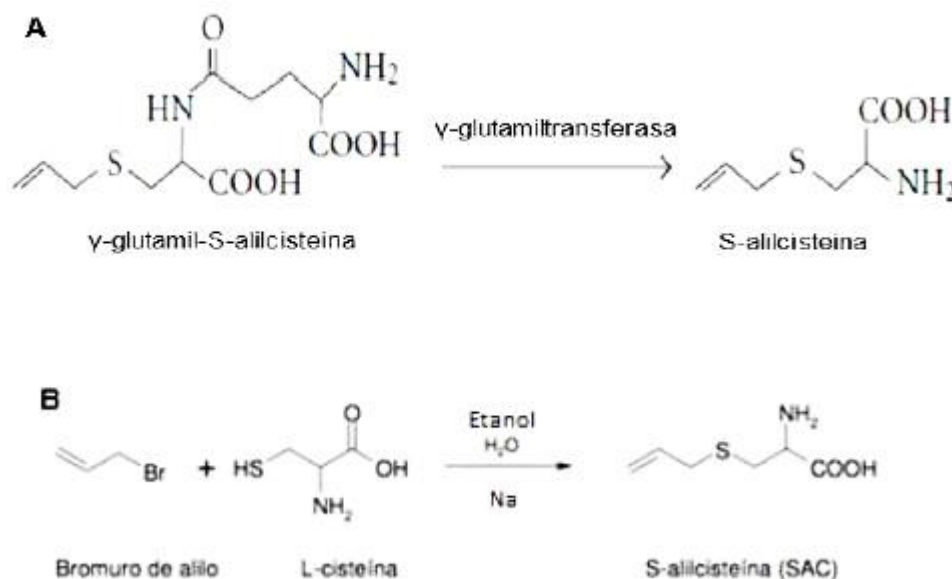


Figura 11. Síntesis enzimática (A) y química (B) de la SAC.



La SAC es un compuesto muy estable debido a sus propiedades fisicoquímicas, se sabe que permanece de forma inalterada en solución acuosa por 2 años. Es un polvo blanco cristalino, de olor característico, no higroscópico y con un punto de fusión de 223.3-223.7°C (Kodera et al., 2002; Lawson, 1998).

1.8.1. Efecto biológico

La SAC tiene un gran número de efectos farmacológicos en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades; es por ello que recientemente la han investigado a fondo ya que modula múltiples mecanismos y sitios de acción, siendo un candidato efectivo para el desarrollo de un nuevo fármaco (Ray et al., 2011). Se ha descrito que la SAC tiene un gran número de propiedades antioxidantes estudiadas en modelos *in vitro* e *in vivo*. Estas propiedades la incluyen como un agente cardioprotector, hepatoprotector, renoprotector, quimiopreventivo, neuroprotector, entre muchos otros (Mostafa et al., 2000; Maldonado et al., 2003; Cruz et al., 2007).

La SAC puede actuar como un antioxidante a través de diferentes mecanismos como (Colín-González et al., 2012):

- Atrapador de radicales libres (ERO y ERN), actuando como un antioxidante directo.
- Transactivador del factor Nrf2 y subsiguiente activación de la respuesta de fase II, actuando como un antioxidante indirecto.
- Inhibidor de algunas enzimas pro-oxidantes (xantina oxidasa, ciclooxigenas, y NADPH oxidasa).
- Quelante de metales como Fe^{2+} y Cu^{2+} , de esta manera se evita la reacción de Fenton.

Como se mencionó anteriormente el Nrf2 regula la expresión inducible de un gran número de genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, de esta manera ofrece un efecto protector en modelos de estrés oxidativo. La disminución de este



factor es prevenida por la SAC, ya que es capaz de activarlo en diferentes órganos como el cerebro, el hígado y el riñón (Gómez-Sierra et al., 2014).

El poder de la SAC abarca varias patologías, se ha informado que disminuye los déficits de aprendizaje en ratones con senescencia acelerada (Nishiyama et al., 2001) y en la enfermedad de Parkinson disminuye la pérdida de dopamina en estriado y sustancia nigra inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP) en ratones. En este mismo trabajo la SAC previno la disminución de los niveles del factor de transcripción Nrf2 y de las enzimas Mn-SOD y hemo-oxigenasa (HO-1) en animales tratados con MPTP; así como la respuesta inflamatoria provocada por esta toxina. En los animales control, la SAC incrementó los niveles de estas dos enzimas (García et al., 2014). En modelos experimentales de la enfermedad de Huntington se encontró que el tratamiento previo con SAC atenuó la neurotoxicidad provocada por la administración de QUIN en el estriado en ratas (Pérez-Severiano et al., 2004); disminuyó 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 redujó la lipoperoxidación evocada por el QUIN en sinaptosomas de cerebro de ratas (Pérez-De La Cruz et al., 2006; Elinos-Calderón et al., 2010). En la enfermedad de Alzheimer se ha observado que la SAC restringe la activación de varias cascadas patológicas relacionadas con la degeneración sináptica y la neuroinflamación asociadas con esta enfermedad (Ray et al., 2011),

1.8.2. Toxicidad

La SAC es considerada uno de los componentes biológicamente activos del ajo que no presenta toxicidad (Yan & Zeng, 2005). Su toxicidad es 30 veces menor que otros compuestos del ajo como la alicina o el dialildisulfuro (Colín-González et al., 2012). La DL₅₀ de la SAC en ratones (macho 8.89 g/kg) es mucho más alta que la que se observa para la alicina (0.309 g/kg) o el dialildisulfuro (0.145 g/kg) (Amagase et al., 2001). Otros estudios realizados han confirmado la baja toxicidad de la SAC en ratas macho (10.94 g/kg) después de su administración oral.



La DL₅₀ de la SAC después de su administración *i.p.* en ratas fue de 3.34 g/kg este resultado es muy similar al de otros L-aminoácidos como la metionina 4.32 g/kg (Kodera et al., 2002).

En la literatura solo existe un reporte sobre la toxicidad subcrónica de la SAC, en el que se evaluó el efecto de la administración oral diaria durante un mes con diferentes concentraciones de SAC que iban de los 250 a los 2000 mg/kg de peso. Se reportaron efectos negativos de la SAC a partir de las dosis mayores a 500 mg/kg de peso (Kodera et al., 2002).



2. Justificación

Las enfermedades neurodegenerativas representan un grupo de padecimientos que afectan a la población en general y de manera particular a los de edad avanzada lo que conlleva a importantes repercusiones sociales y económicas (Corona-Vázquez, 2002), debido a que estos padecimientos dañan gravemente las funciones motoras, sensoriales y cognitivas del paciente, principalmente la memoria, el aprendizaje, el lenguaje y la adaptación social.

Este tipo de padecimientos son multifactoriales, siendo la predisposición genética y los factores ambientales las causas más importantes (Manji et al., 2000; Payne et al., 2002). Dos de los mecanismos que se han asociado con la muerte neuronal en estos padecimientos es la excitotoxicidad y el estrés oxidante. En este sentido la administración intraestriatal de QUIN genera un modelo experimental que permite reproducir y estudiar ambos eventos. Además de evaluar la participación de los mecanismos de defensa antioxidante para contrarrestar el daño.

Por esta razón diferentes grupos de investigación han centrado su atención en la búsqueda de métodos preventivos y tratamientos que permitan contender contra los efectos producidos por la excitotoxicidad y el estrés oxidante en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, actualmente no existe una terapia que sea realmente eficaz para disminuir las secuelas que muestran los pacientes que sufren estos padecimientos; por ello, el desarrollo de protocolos que evalúen terapias que pudieran ser efectivas en este tipo de pacientes es importante.

De acuerdo con los antecedentes, se ha descrito en la literatura que el pretratamiento con SAC ejerce un papel neuroprotector en diferentes modelos. Este efecto se asoció con su capacidad de activar el factor de transcripción Nrf2 y con sus propiedades antioxidantes. Por ello, en este proyecto se evaluó el efecto terapéutico de la SAC sobre los sistemas antioxidantes como una alternativa para disminuir o contrarrestar el daño causado por el QUIN lo que sugiere así a la SAC como una posible herramienta terapéutica contra este tipo de enfermedades.



3. Hipótesis

Si el reto excitotóxico neuronal inducido por el QUIN, involucra una sobreactivación de los receptores NMDA y un estado de estrés oxidante, entonces disminuirá el daño y la muerte neuronal tras la administración post-lesión de la SAC, al actuar como un antioxidante.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto terapéutico de la SAC sobre las alteraciones conductuales, histológicas y bioquímicas que se inducen en animales que son tratados con QUIN.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la SAC sobre la conducta de rotación inducida con la administración de la apomorfina el día 6 después de la infusión intraestriatal con QUIN.
- Evaluar el efecto de la administración de SAC sobre los cambios en la ejecución motora (número de contactos con la pared del cilindro con ambas extremidades superiores y con la extremidad delantera ipsilateral al daño), los días -1, 2 y 6 anterior y posterior a la administración intraestriatal con QUIN.
- Evaluar el daño morfológico, mediante la tinción de hematoxilina y eosina, 7 días después de la administración intraestriatal con QUIN.
- Evaluar la neurodegeneración mediante la tinción con fluoro jade B, 7 días después de la administración intraestriatal con QUIN.



-
-
- Determinar el efecto de la SAC sobre la actividad de las enzimas GST, GPx y SOD en el estriado de rata 7 días después de la administración intraestriatal con QUIN.

 - Determinar el efecto de la SAC sobre la expresión del factor nuclear Nrf2 mediante Western blot 7 días después de la administración intraestriatal con QUIN.



5. Metodología y Material

5.1. Reactivos

El QUIN se obtuvo de Spectrum Chemical Mfg Corp (Gardena, CA, EEUU), la apomorfina, el glutatión reducido, la glutatión reductasa, el β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), el H_2O_2 , la albumina sérica bovina (BSA) y la glucosa 6-fosfato se obtuvieron de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EEUU). El fluoro jade B y la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se obtuvieron de Millipore (Bedford, MA, EEUU). Los anticuerpos anti-Nrf2 y anti- β tubulina se obtuvieron de Abcam (Cambridge, MA, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de conejo y ratón se obtuvieron de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, EEUU). El formaldehído se obtuvo de J.T. Baker (Ciudad de México, México). Todos los demás reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas. Se utilizó agua desionizada obtenida con un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU) para preparar las soluciones.

5.2. Animales

Se emplearon ratas macho Wistar de 2-3 meses de edad, con un peso entre 270-320 g. Todos los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($25.8 \pm 3^\circ C$) e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con suministro de dieta estándar (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feed Inc., Richmond, IN, EEUU) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los animales se llevaron a cabo de acuerdo a las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los 13 Institutos Nacionales de Salud. Durante los experimentos, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. El estudio realizado fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.



5.3. Diseño experimental

Los animales se dividieron en 4 grupos al azar (n=6) como se menciona a continuación:

- SHAM; se administró solución salina isotónica (SSI) (intraestriatal) y SSI (i.g.) a las ratas.
- SAC; se administró SSI (intraestriatal) y SAC (i.g.) a las ratas.
- QUIN; se administró QUIN (intraestriatal) y SSI (i.g.) a las ratas.
- QUIN+SAC; se administró QUIN (intraestriatal) y SAC (i.g.) a las ratas.

Los animales de los grupos QUIN y QUIN+SAC recibieron 1 μ L de QUIN (equivalente a 240 nmol). Los animales de los grupos SAC y QUIN+SAC recibieron 6 dosis de SAC (100 mg/kg), iniciando 24 h después de la infusión intraestriatal con QUIN o SSI según el caso. Veinticuatro horas después de la última dosis de SAC (día 7) se sacrificaron los animales y de acuerdo al análisis a realizar se obtuvo el estriado derecho o el cerebro total.

5.4. Lesión intraestriatal

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.). Se montaron en un equipo estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EEUU) para recibir una inyección unilateral con una micro-jeringa Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV, EEUU) en el estriado derecho, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y -4.5 mm



ventral a la dura. Se inyectaron 0.25 μL de QUIN (disuelto en SSI) cada 30 s, hasta completar 1 μL de QUIN (equivalente a 240 nmol) como volumen final. Posteriormente se esperaron 2 min para permitir la difusión del compuesto en el estriado y se retiró la jeringa cuidadosamente. Los animales de los grupos SHAM y SAC recibieron 1 μL de SSI, siguiendo el mismo procedimiento descrito.

5.5. Valoración motora

5.5.1. Prueba de asimetría motora

La prueba se realizó un día antes de la lesión intraestriatal; así como a los 2 y 6 días después ésta, siempre a las 08:00 pm. Las ratas se colocaron durante 5 min en un cilindro de acrílico transparente (30 cm de alto por 20 cm de diámetro). Durante ese tiempo, se cuantificó el número de toques con ambas extremidades superiores, los toques con la extremidad superior ipsilateral (del lado de la lesión) y los toques con la extremidad superior contralateral (lado opuesto de la lesión). El porcentaje de uso de ambas extremidades se obtuvo de multiplicar el número de toques con ambas extremidades por 100 y dividirlo entre el número de toques totales. El número total de toques corresponde a la suma del número de toques con ambas extremidades, más los de la extremidad derecha, más los de la izquierda (Woodlee et al., 2005). Los datos se expresan como el porcentaje de uso de ambas extremidades, el porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral y el porcentaje de uso de la extremidad contralateral a la lesión.

Utilizando los mismos datos se graficó la puntuación de asimetría. Este dato se calculó al sumar los contactos ipsilaterales + $\frac{1}{2}$ del número de contactos con ambas extremidades, entre el número de contactos totales (contactos ipsilaterales + contralaterales + contactos con ambas extremidades). Esta gráfica provee una puntuación de la asimetría total, donde un valor de 0.5 indica una exploración asimétrica con ambas extremidades, valores > 0.5 indican mayor dependencia en el uso de la extremidad ipsilesionada a lado de la lesión, y valores < 0.5 indican una mayor dependencia a utilizar la extremidad contralateral al sitio de la lesión.



5.5.2. Conducta de rotación

La conducta de rotación se evaluó 6 días después de la inyección intraestriatal con SSI o QUIN. Se realizó mediante el método descrito por Maldonado et al. (2010) en el modelo *in vivo* para determinar la relación que existe entre el daño en el tejido cerebral y el comportamiento de rotación inducido por la apomorfina. A cada animal se le administró apomorfina (1 mg/kg s.c.) disuelta en SSI e inmediatamente se colocaron en una caja de acrílico para su observación. Cinco minutos después de la inyección con apomorfina se registró el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h. Cada rotación se definió como un giro completo de 360°. Los datos se expresan como el número de giros ipsilaterales en 1 h.

5.6. Perfusión de ratas para obtención de cerebros y posterior inclusión

Seis días después de la inyección con QUIN o solución salina, los animales se anestesiaron con una solución inyectable de pentobarbital sódico (200 mg/kg, *i.p.*) y se perfundieron vía transcardíaca con solución salina que contenía heparina en una proporción de 1/500 (v/v), seguida de una solución de p-formaldehído 4% (v/v). Se extrajeron los cerebros y se fijaron en una solución de p-formaldehído 4% durante 48 h. Posteriormente, los cerebros se colocaron en casetes de inclusión de forma individual, se deshidrataron gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol y se embebieron en parafina Paraplast Plus (McCormick scientific, St. Louis, MO, EEUU). Se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor en un micrótomó Microm HM 325 (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, EEUU), cada 50 µm de corte cubriendo una distancia de 300 µm (100 µm anteriores y 100 µm posteriores a la lesión).



5.7. Tinción con hematoxilina y eosina (HyE).

Se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (HyE) y se visualizaron en un microscopio (Nikon Eclipse E200, TYO, Japón) con el objetivo 40X. Se obtuvieron imágenes de 4 campos por corte, mediante una cámara Evolution MP 5.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD EEUU) a nivel de la zona dorso-medial del estriado inyectado. El criterio seguido para la identificación de daño incluyó principalmente la presencia de núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática y pérdida de la basofilia (cariolisis). Los datos se expresan como porcentaje de células viables por campo.

5.8. Tinción de verde de fluoro jade B (FJ-B)

Como marcador de degeneración neuronal se realizó la tinción a FJ-B (Schmued & Hopkins, 2000). Se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor, los cuales se sumergieron en xilol durante 10 min, en etanol 100% por 2 min, seguidos de una solución de NaOH 1% - etanol 80% durante 5 min y finalmente 2 min en etanol 70% (Millipore, Billerica, MA, EEUU). Posteriormente, los cortes se sumergieron en una solución de KMnO_4 al 0.06% durante 10 min en agitación moderada, para luego enjuagar con agua destilada durante 2 min. Las muestras se tiñeron con una solución de FJ-B al 0.0004% durante 20 min y se realizaron 3 lavados con agua destilada. El exceso de agua fue removido colocando las laminillas en una estufa a 50°C durante 15 min. Finalmente, los cortes se colocaron en xilol y se cubrieron con medio de montaje no acuoso. Los resultados se expresan como el número de células positivas a FJ-B por campo.

5.9. Análisis por Western blot de Nrf2

Se prepararon cantidades iguales de proteína (100 μg) fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida 10% y se transfirieron a una membrana



de PVDF (Kurien & Scofield, 2003). Las membranas se bloquearon 2 h con una solución de albúmina 5% a temperatura ambiente en agitación. Después se incubaron con el anticuerpo policlonal primario anti-Nrf2 (1:1000) a temperatura ambiente durante toda la noche en agitación. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T al 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10000) por 2 h a temperatura ambiente en agitación lenta. Los valores de densidad óptica (D.O.) relativa para cada banda se analizaron con el programa ImageJ y se normalizaron con la densidad óptica de la banda correspondiente a tubulina. Los resultados se expresan como la D.O. relativa de Nrf2/ D.O. relativa de tubulina.

5.10. Obtención de tejido para la medición de la actividad enzimática

Siete días después de la inyección con QUIN o solución salina, los animales se decapitaron y los cerebros se removieron rápidamente. Se diseccionó en frío el cuerpo estriado inyectado y se congeló a -80°C hasta su uso. El tejido se homogenizó con un sonicador en 500 μL de amortiguador de lisis frío pH 7.9 que contiene Tris-Base 20 mM, NaCl 30 mM, sacarosa 0.5 mM y Triton al 0.1 %, enriquecido con inhibidores de proteasas (leupeptina 1 $\mu\text{L}/\text{ml}$, aprotinina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pepstatina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y PMSF 1 μM). Posteriormente los homogenados se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hauppauge, NY, EEUU) a $20,800 \times g$ durante 20 min a 4°C . El sobrenadante se utilizó para evaluar la actividad enzimática.

5.11. 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 (Maldonado et al., 2013). La mezcla de reacción consistió en xantina 0.250 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μM , carbonato de sodio 49 mM y albúmina sérica bovina al 0.006%. A 815 μL de la mezcla de la reacción se añadieron 165 μL de homogenado (1:20) y se incubaron por 15 min a 27°C , previo al inicio de la reacción por la adición de 17



μL de xantina oxidasa. Después de 10 min, la reacción fue detenida con 330 μL de cloruro de cobre 0.8 mM y la absorbancia se midió a 560 nm. La cantidad de proteína que inhibió un 50% de la reducción del nitroazul de tetrazolio se considero como 1 U de actividad de la SOD. Los resultados se expresarán como U/mg de proteína.

5.12. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx se determinó mediante un método espectrofotométrico basado en el consumo de NADPH previamente descrito por Carlberg & Mannervik, (1975). La mezcla de reacción consistió en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutatión reductasa 1 U/mL y glutatión reducido 1 mM. Cien μL de tejido homogenizado se adicionaron a 800 μL de la mezcla de reacción y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, para dar inicio a la reacción se adicionarán 0.1 mL de H_2O_2 30 mM, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 340 nm durante 3 min cada 30 s. La actividad enzimática se cuantificó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADPH ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad de GPx se expresó como U/mg de proteína.

5.13. Actividad de la glutatión S-transferasa (GST)

La actividad de la GST fue determinada de acuerdo a un estudio previo (Habig et al., 1974). La mezcla de reacción contenía amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y GSH 50 mM. La reacción se inició adicionando 50 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno 20 mM, la aparición del complejo GSH-dinitrobenzoceno se midió espectrofotométricamente a 340 nm cada 30 s durante 3 min. La actividad enzimática se calculó tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del conjugado GSH-DNB ($9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se normalizó por la cantidad de proteína presente en la muestra.



5.14. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA usando el software Prism 5.02 (GraphPad, San Diego, CA, EEUU). Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.



6. Resultados.

6.1. Valoración motora

El uso de ambas extremidades delanteras presentó una mejoría significativa a los 6 días de tratamiento con SAC (grupo QUIN+SAC) con respecto al grupo QUIN (Figura 12). El grupo QUIN disminuyó el uso de ambas extremidades respecto al grupo SHAM. No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos SHAM y SAC durante los días de la evaluación (Figura 12).

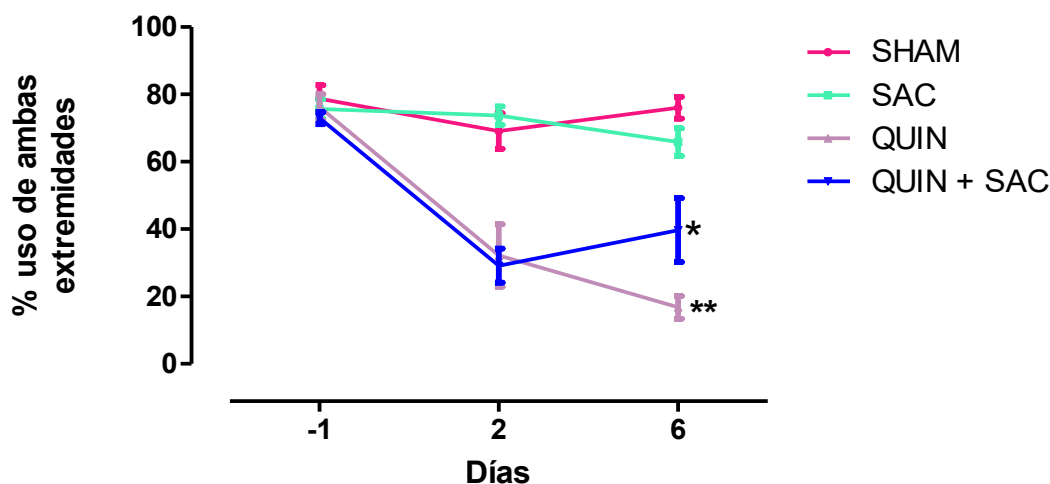


Figura 12. Porcentaje de uso de ambas extremidades delanteras en la prueba de simetría motora en ratas. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteina (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI o QUIN. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=10). *P<0.05 vs QUIN, **P<0.05 vs SHAM.

La infusión de QUIN (grupo QUIN) ocasionó un aumento en el uso de la extremidad ipsilateral a la lesión (controlada por el estriado dañado) con respecto a los grupos SHAM y SAC (el grupo SHAM presentó un ligero aumento al día 2 y disminución al día 6 y el grupo SAC se muestra un ligero aumento con el transcurso de los días, para ambos grupos el aumento no fue significativo con respecto al día -1). Los animales que recibieron SAC después del QUIN (grupo



QUIN+SAC) presentaron un comportamiento similar al día 2 y una ligera disminución en el porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral a la lesión al día 6 ambos días con respecto al grupo QUIN (Figura 13); sin embargo, tampoco existen cambios estadísticamente significativos entre ambos grupos.

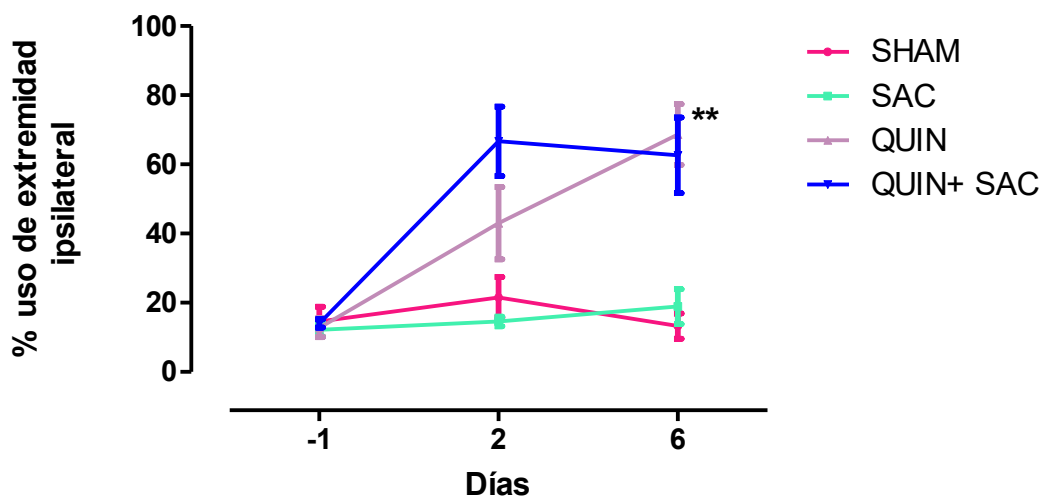


Figura 13. Porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral en la prueba de simetría motora en ratas. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=10). **P<0.05 vs SHAM.

El QUIN (grupo QUIN) provocó una disminución en el uso de la extremidad contralateral a la lesión que continuó disminuyendo hasta el día 6 con respecto a los grupos SHAM y SAC (Figura 14). En los animales tratados con QUIN+SAC se observó un aumento significativo en el uso de la extremidad delantera contralateral en el día 6 con respecto al grupo QUIN.

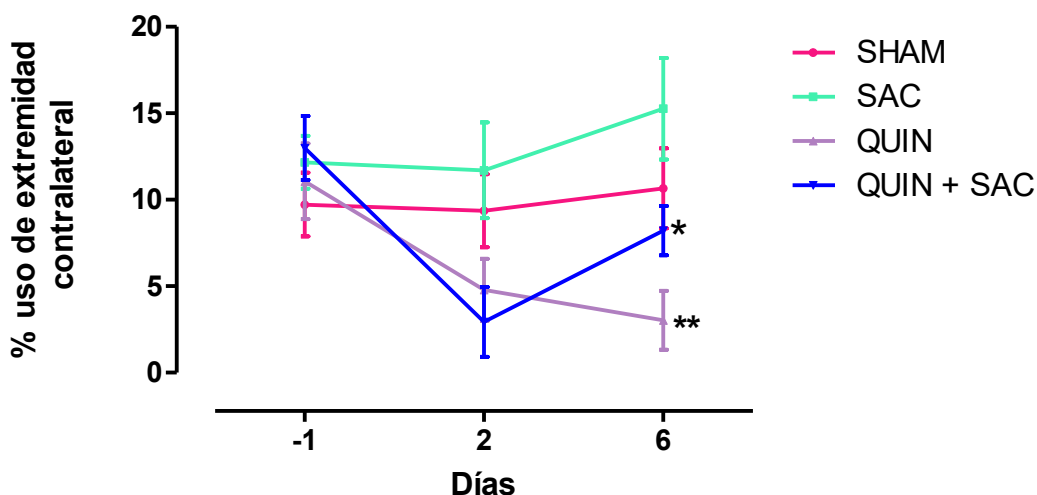


Figura 14. Porcentaje de uso de la extremidad contralateral en la prueba de simetría motora en ratas. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=10). *P<0.05 vs QUIN, **P<0.05 vs SHAM.

Se graficó la puntuación de asimetría (Figura 15), en la cual se observa que el día -1 todos los animales presentaron una exploración simétrica con ambas extremidades (valores cercanos a 0.5). Los grupos administrados con QUIN (QUIN y QUIN+SAC) presentaron un incremento en la puntuación al día 2 (0.82 y 0.78 respectivamente). Para el 6 día el puntaje del grupo QUIN + SAC disminuyó (0.72) respecto al grupo QUIN (0.84); sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Mientras tanto los valores para los grupos SHAM y SAC no fueron significativos a los 2 y 6 días de la prueba respecto al día -1.

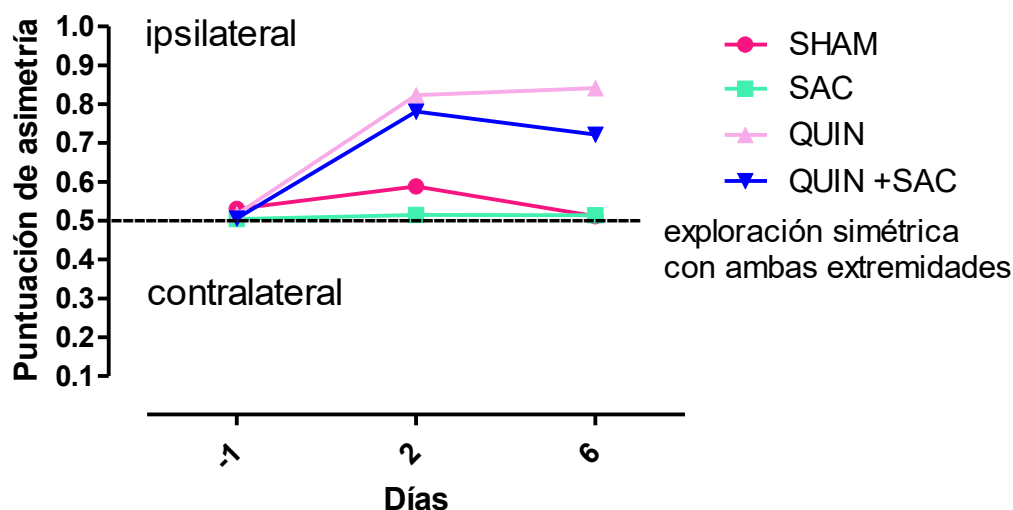


Figura 15. Prueba de asimetría motora en ratas. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. La evaluación se llevó a cabo en los días -1, 2 y 6 después de la inyección intraestriatal de SSI ó QUIN. Los valores se representan como la media \pm SEM (n=10).

El grupo QUIN presentó un aumento significativo en el número de giros, con respecto a los grupos SHAM y SAC. Se observó una mejoría significativa en la prueba de conducta de rotación, tras el tratamiento con SAC (grupo QUIN+SAC), ya que redujo de manera significativa el número de giros ipsilaterales con respecto a los observados en el grupo QUIN. Los grupos SHAM y SAC no mostraron una conducta de rotación (Figura 16).

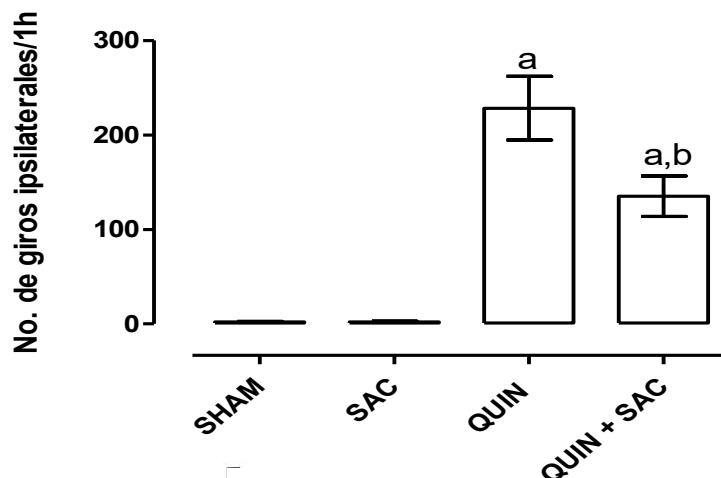


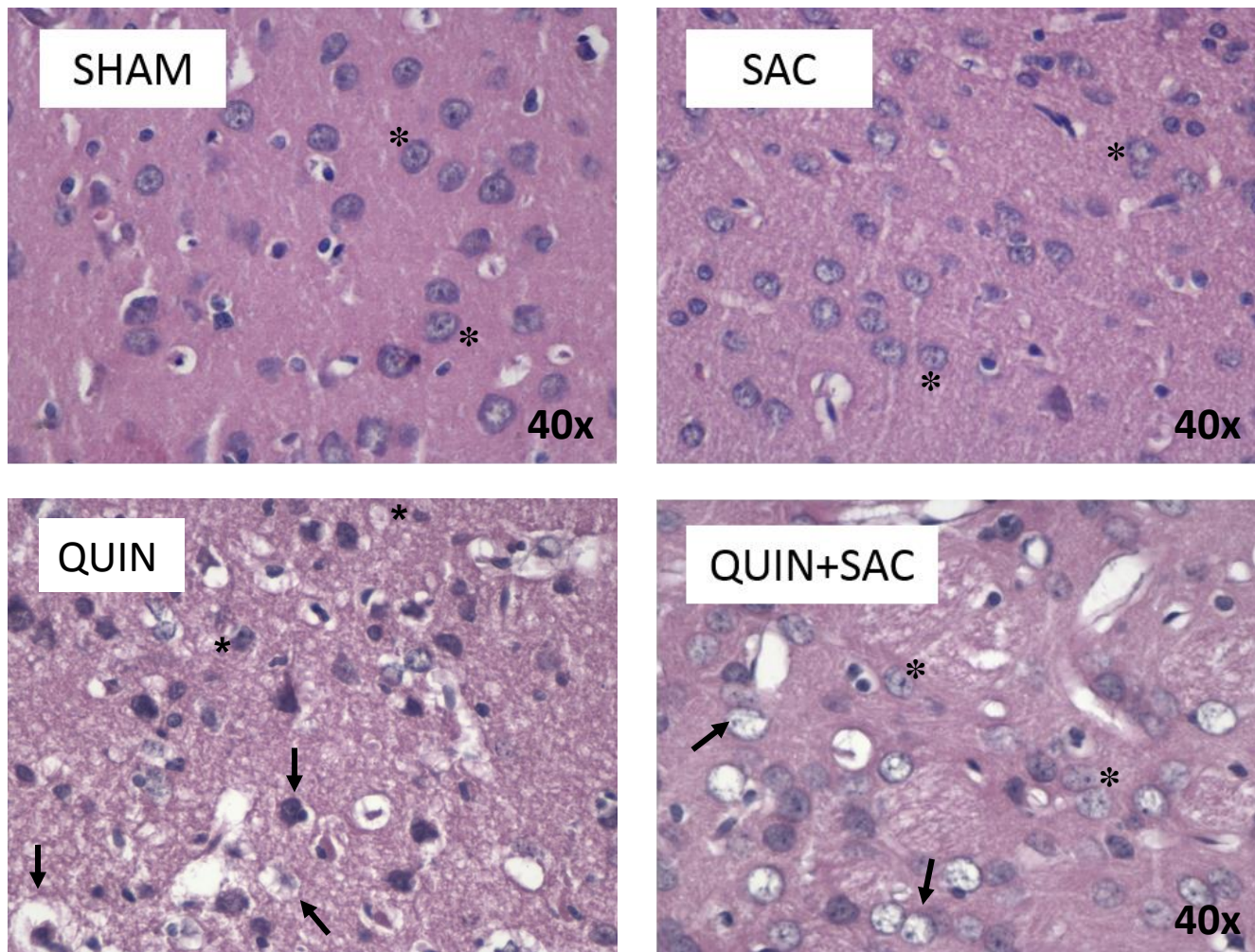
Figura 16. Prueba de conducta de rotación en ratas. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Se muestra el número de giros ipsilaterales en cada grupo durante 1 h, después de la administración de apomorfina (1 mg/kg, s.c.). La evaluación se llevó a cabo 6 días después de la inyección intraestriatal. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=10). ^aP<0.001 vs SHAM y SAC, ^bP<0.01 vs QUIN.

6.2 Histología. Tinción con hematoxilina y eosina (HyE)

Para visualizar el daño generado por el QUIN en el estriado y correlacionar lo observado en la evaluación conductual, se cuantificó el daño histológico mediante la tinción de HyE. En la figura 17 se observan imágenes representativas de cada grupo y el análisis de estas. La administración intraestriatal de QUIN provocó daño y muerte celular, observándose núcleos picnóticos, cariorexix y cariólisis (Figura 17). La cuantificación del daño histológico en el grupo QUIN+SAC, 6 días después de la administración con QUIN revela que el tratamiento con SAC redujo significativamente el número de células dañadas, con respecto al grupo QUIN (Figura 18). En el grupo SHAM se percibe un daño neuronal basal, similar al observado en el grupo SAC.



A



B

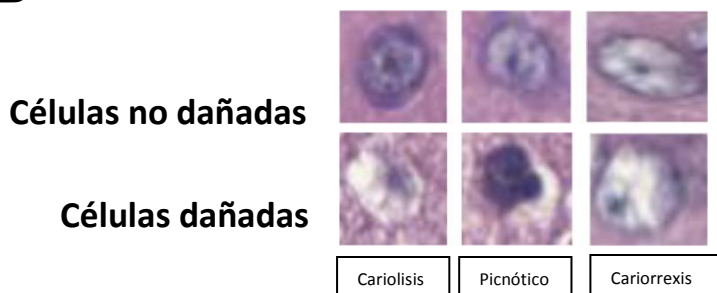


Figura 17. Alteraciones histológicas en estrado de rata. Se inyectó en el estrado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. En el panel A se muestra una imagen representativa de cada grupo con la tinción H y E (40x). Los asteriscos muestran las células no dañadas, mientras que las flechas indican las células dañadas. En el panel B se muestran los criterios utilizados para el análisis histológico y distinguir las células dañadas de las no dañadas.

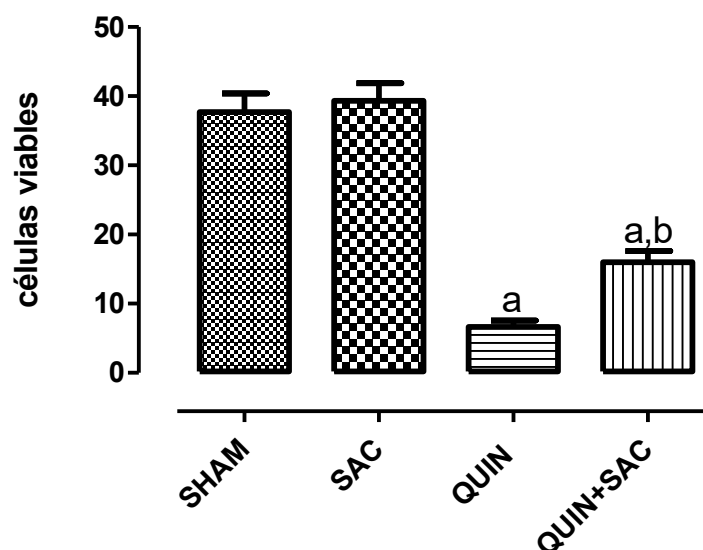


Figura 18. Cuantificación del daño histológico en el estriado de rata. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-allicisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Se realizó el conteo por campo del número de células dañadas y células totales en el tejido teñido con H&E contando 5 campos por rata y graficando el número de células viables por campo. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6). ^aP<0.001 vs SHAM y SAC, ^bP<0.01 vs QUIN.

6.3 Neurodegeneración. Tinción con fluoro jade B (FJ-B)

Adicionalmente para caracterizar el daño producido por el QUIN, se cuantificó el número de células positivas a fluoro jade B como marcador de neurodegeneración en el tejido estriatal. No se observaron células positivas a FJ-B en los campos contralaterales de ninguno de los cuatro grupos al igual que los campos ipsilaterales de los grupos SHAM y SAC. En el caso de los grupos QUIN y QUIN +SAC se observaron células positivas (Figura 19). La administración diaria de SAC (grupo QUIN+SAC) disminuyó en forma significativa la neurodegeneración observada en el grupo con QUIN (Figura 19 y 20).

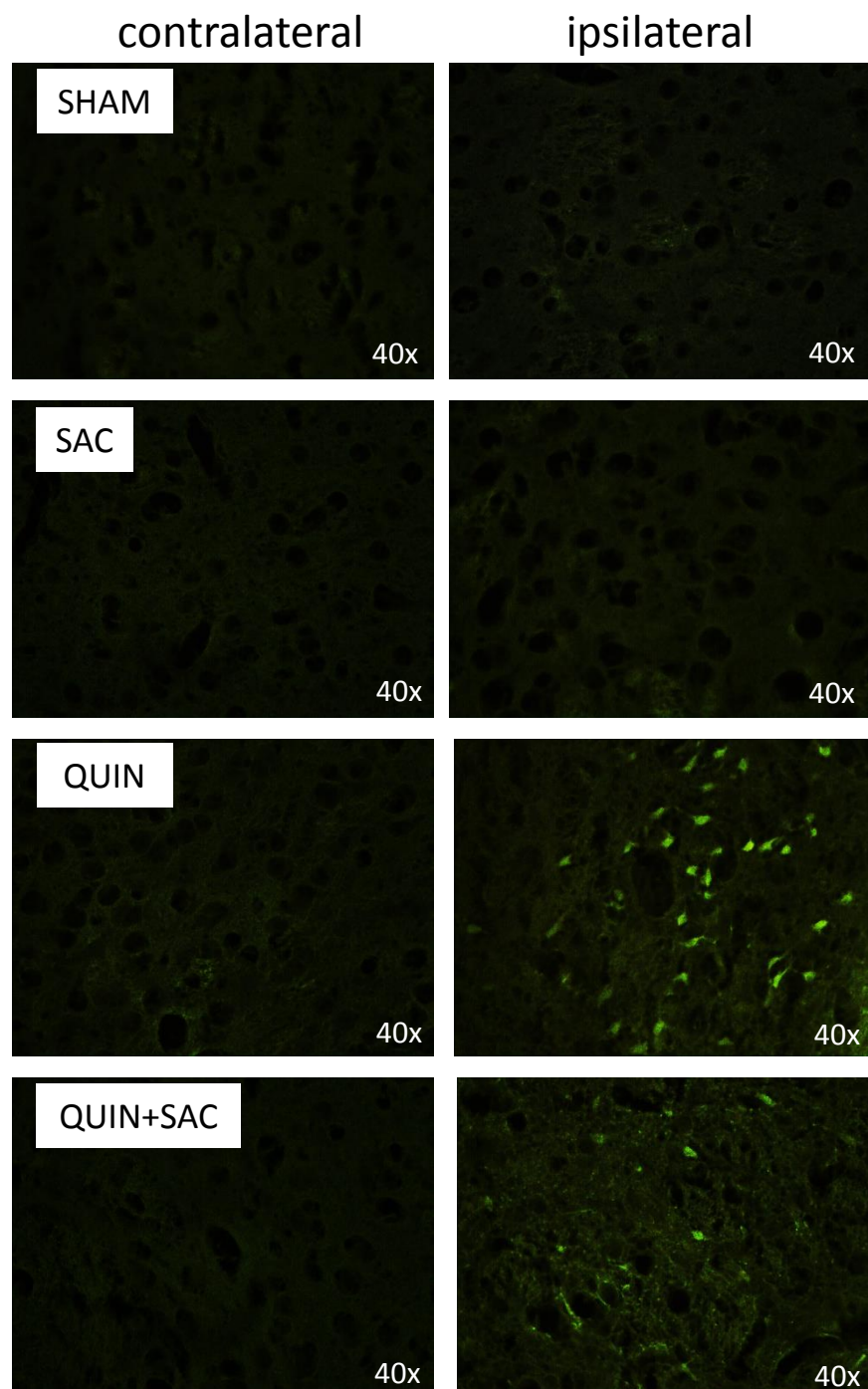


Figura 19. Células de estriado de rata en neurodegeneración. Se inyectó en el estriado derecho 1 μL de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Se muestran imágenes representativas (40x) de los lados ipsilateral y contralateral a la lesión de cada grupo. Los lados contralaterales a la lesión son tomados como controles. Las células que sufrieron neurodegeneración se observan de color verde.

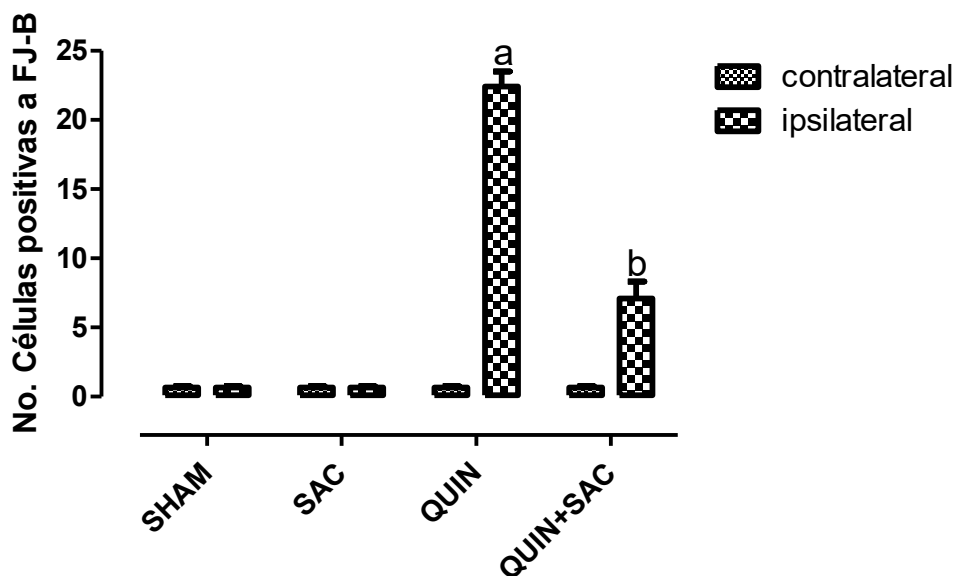


Figura 20. Cuantificación del número de células en neurodegeneración en estriado de rata. Se inyectó en el estriado derecho $1 \mu\text{L}$ de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Se muestra el conteo de las células positivas a FJ-B. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6). ^aP<0.001 vs SHAM y SAC, ^bP<0.01 vs QUIN.

6.4 Expresión de Nrf2 en estriado de rata.

Mediante el análisis por western blot se evaluó la expresión del factor Nrf2 a los 7 días posteriores a la lesión, observando que la administración con SAC tiende a aumentar el factor Nrf2 con respecto al grupo SHAM. La administración de QUIN presentó una tendencia a disminuir la expresión de Nrf2 en estriado y el tratamiento con SAC (grupo QUIN+SAC) presentó una tendencia a revertir la disminución inducida por el QUIN en la expresión de Nrf2 (Figura 21).

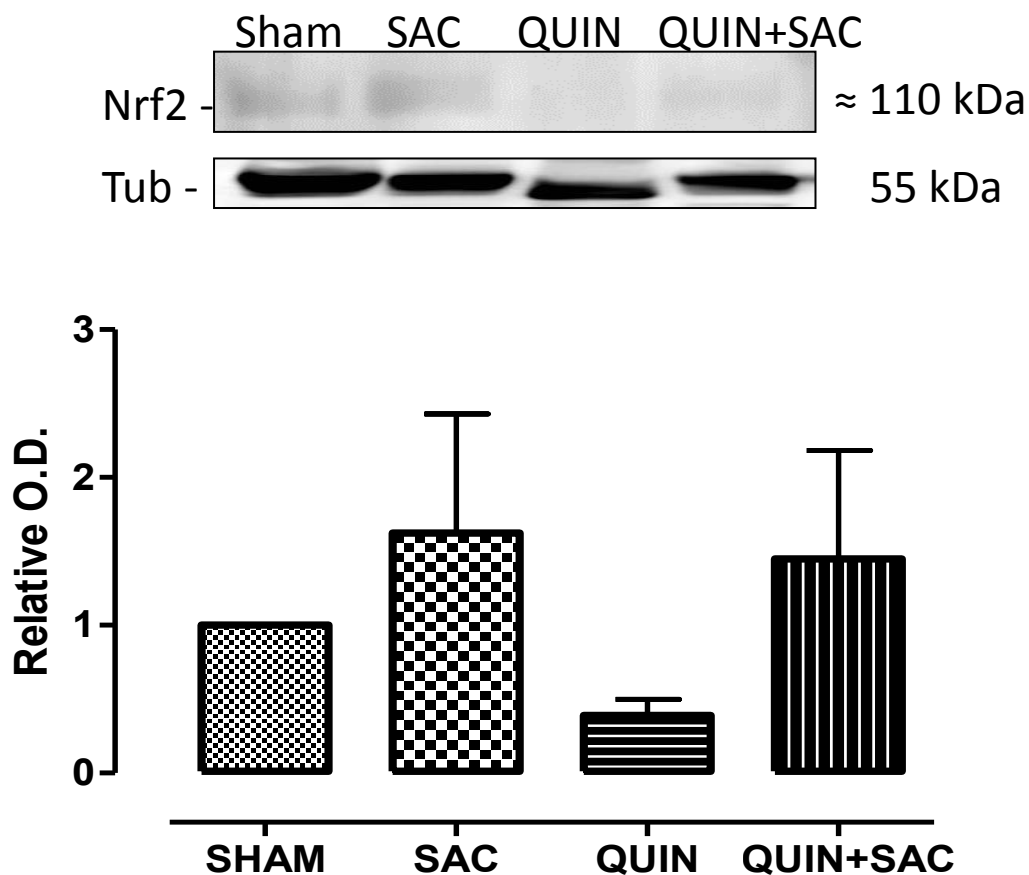


Figura 21. Expresión de Nrf2 en estriado de rata. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ L de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. En el panel superior se muestra un Western blot representativo de Nrf2 utilizando β -tubulina (Tub) como control de carga. La grafica muestra la cuantificación de la expresión de Nrf2 en las ratas valoradas. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=4).

6.5 Actividad de enzimas antioxidantes y de fase II

El tratamiento con QUIN presenta una tendencia a aumentar la actividad de GPx en estriado y corteza (Figura 22) y a disminuir la actividad de SOD (Figura 23). El tratamiento con SAC no modificó la actividad de GPx (Figura 22) y de SOD (Figura 23) en ninguna de las regiones.

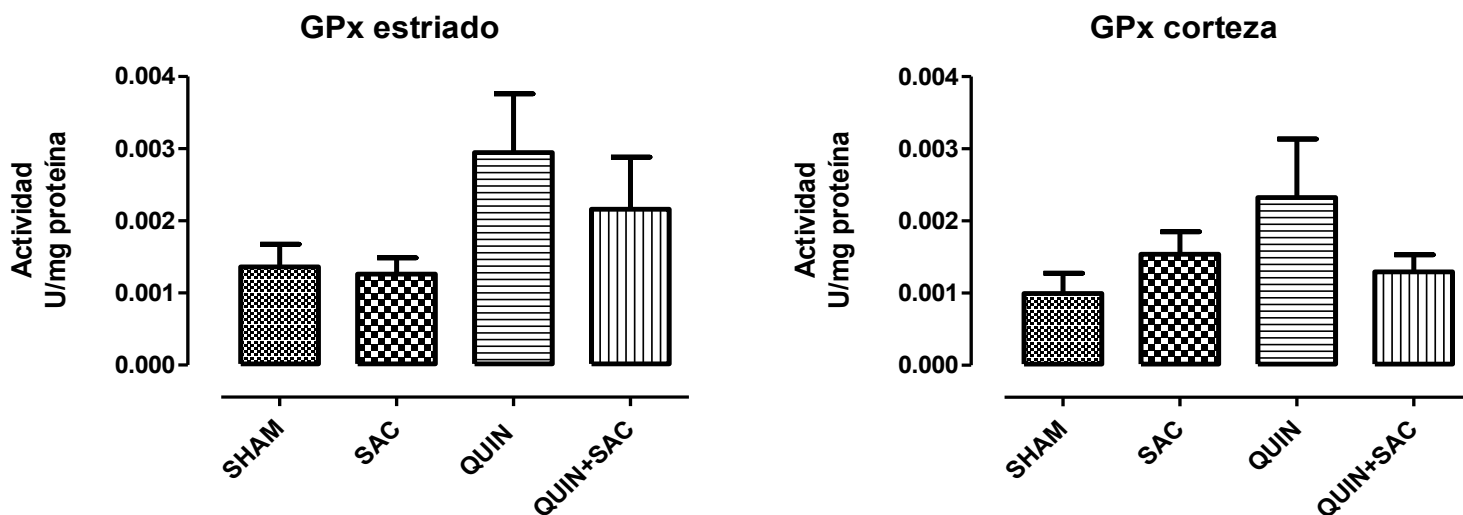


Figura 22. Actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) en estriado y corteza de rata. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6).

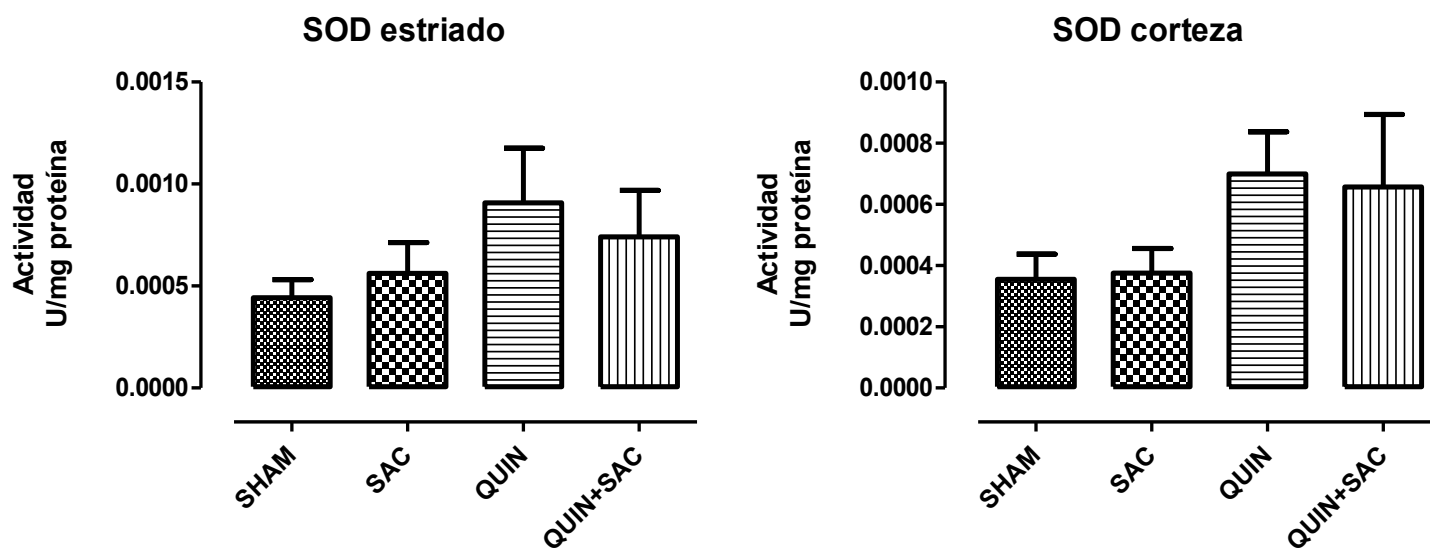


Figura 23. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) en estriado y corteza de rata. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6).



La actividad de la enzima de fase II GST al igual que las enzimas anteriores no presentó diferencias estadísticamente significativas en el estriado y corteza de rata. Aunque la administración de QUIN muestra una tendencia a aumentar la actividad de GST en estriado y corteza (Figura 24).

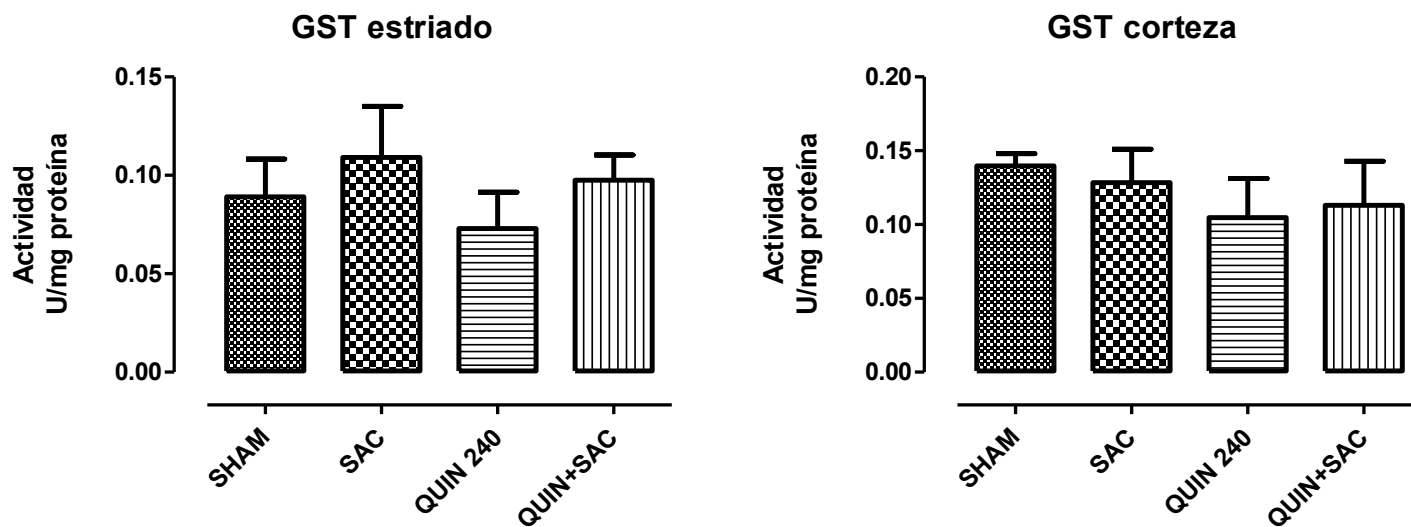


Figura 24. Actividad de la enzima de fase II, glutatión-S-transferasa (GST) en estriado y corteza de rata. Se inyectó en el estriado derecho 1 μ l de ácido quinolínico (QUIN) equivalente a 240 nmol. Los animales recibieron una dosis diaria de S-alilcisteína (SAC) 100 mg/kg cada 24 h durante 6 días. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6).



7. Discusión

Este trabajo se realizó con la finalidad de evaluar el efecto post-lesión de la SAC mediante diversas pruebas conductuales, histológicas y bioquímicas realizadas en las regiones del estriado y la corteza del cerebro de ratas macho Wistar, tomando en cuenta un gran número de estudios que evidencian el efecto preventivo de la SAC como un potente antioxidante (Elinos-Calderón et al., 2010; García et al., 2014; Colín-González et al., 2012; Cruz, et al., 2007; Herrera-Mundo et al., 2009; Pérez-De la Cruz et al., 2006), con el fin de proporcionar información sobre la función terapéutica (post-lesión) de este compuesto como antioxidante en el modelo con QUIN para ser utilizado como una alternativa terapéutica.

Una de las formas más utilizadas para determinar si un tratamiento en contra de las enfermedades neurodegenerativas tiene algún efecto, es valorando la actividad motora de los animales, debido a que estas funciones se alteran en éstas enfermedades. Para realizar estas pruebas se debe tomar en cuenta que estas sean sensibles para demostrar el daño causado por una lesión y el efecto de la alternativa terapéutica en las zonas del cerebro dañadas (Woodlee et al., 2005). Haciendo referencia a este tipo de estudios, encontramos que la administración diaria de SAC después de la lesión causada con QUIN, causa una mejoría tras evaluar el daño en las ratas. Específicamente en la prueba de asimetría motora en el modelo de cilindro, el cual ha sido utilizado para evaluar el uso de las extremidades delanteras ipsilaterales y contralaterales para comprobar el efecto benéfico de un tratamiento en modelos de infusión unilateral de dopamina (infusión de 6-OHDA) relacionado con la disminución de los niveles dopaminérgicos (Schallert et al., 2000).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba se observa que el número de contactos con ambas extremidades disminuye en los grupos con la infusión de QUIN, esta acción es considerada como normal debido al daño realizado en la zona del estriado (Figura 12). Sin embargo, en el grupo QUIN hay un aumento en



el uso de la extremidad ipsilateral y una disminución en el uso de la extremidad contralateral conforme transcurre el tiempo. Esto se debe probablemente, a la disminución en el número de células en el estriado como se muestra en la Figura 18 como consecuencia del tratamiento recibido por los animales de este grupo (una dosis de QUIN equivalente a 240 nmol). Para el grupo QUIN+SAC se observa lo contrario al grupo antes mencionado, ya que el uso de la extremidad ipsilateral disminuye para el día 6 de la prueba y en el caso de la extremidad contralateral aumenta su uso al mismo día, además de tener un número mayor de células preservadas (Figura 18).

Por su parte la prueba de conducta de rotación permite valorar el daño generado por el QUIN mediante el número de giros ipsilaterales al administrar apomorfina (1 mg/kg, s.c.). Debido a la respuesta de los receptores de dopamina a agonistas (Sindhu et al., 2006), la rotación por lo general se debe a que existe un desequilibrio a dopamina entre el estriado no lesionado y el lesionado, la estimulación de los receptores de dopamina no dañados en el estriado contralateral a la lesión da pie a la rotación ipsilateral como se observa en la Figura 16. El número de giros es proporcional a la lesión, es decir; a mayor número de giros, la lesión es de mayor magnitud lo cual nos da idea de la neurodegeneración en el estriado. En la prueba realizada se observa que los grupos con SAC disminuyen el número de giros ipsilaterales, lo que podría deberse al efecto de la SAC como antioxidante actuando frente al daño oxidante provocado por el QUIN.

Por otra parte, los resultados de la histología (Figura 17) muestran que el grupo QUIN tiene un mayor número de células dañadas en comparación con los otros grupos, este resultado se ve reflejado en la Figura 18, y es debido a que el QUIN en altas concentraciones sobre activa a los receptores NMDA produciendo un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular provocando la activación de diversas enzimas que producen ERO y de otras enzimas relacionadas con el daño celular como proteasas, lipasas y endonucleasas, llevando así a la muerte celular necrótica (Aguilera et al., 2007; Maldonado et al., 2010; Pérez-Severiano



et al., 2004; Santamaría et al., 2001), la cual se observa por los cambios celulares observados como inflamación mitocondrial, reducción del tamaño del núcleo y fragmentación del DNA. Como consecuencia de la muerte celular, los componentes celulares son liberados al espacio intracelular, dañando a células vecinas y de esta manera induciendo a la inflamación. Por esta razón, en las imágenes además de observar las células no dañadas y dañadas, aparecen células de microglia y linfocitos que se encuentran en la zona de daño debido al proceso inflamatorio. El tratamiento con SAC previnó la muerte neuronal causada por QUIN.

Para observar la muerte neuronal provocada por el QUIN se cuantificó el número de células positivas a FJ-B siete días después de provocar la lesión en el estriado (Figura 19). El fluoro jade B es un fluorocromo polianiónico derivado de la fluoresceína que tiene afinidad por productos poliamínicos cargados positivamente, que aparecen en la neurodegeneración celular. El fluoro jade B se utiliza como un marcador de alta afinidad en la detección de la degeneración neuronal en el sistema nervioso central y tiene una mayor especificidad y sensibilidad que otras técnicas como la tinción de Nissl y hematoxilina. Sin embargo, cabe mencionar que la FJ-B marca el daño neuronal total, es decir marca dendritas distales, axones y terminales (Schmued & Hopkins, 2000).

En esta prueba los resultados indicaron que el grupo QUIN en el lado ipsilateral a la lesión después de 7 días presenta un gran número de células positivas a FJ-B (Figura 19), al igual que otro estudio realizado con ácido kaínico que también es un agonista de los receptores NMDA, y de igual manera genera numerosas neuronas positivas a FJ-B en diversas regiones del cerebro incluido el estriado (Schmued & Hopkins, 2000). Esto sugiere que el QUIN provoca la neurodegeneración en las neuronas estriatales y que el tratamiento por 7 días con SAC disminuye esta degeneración neuronal ya que en la Figura 19 y 20 claramente se observa una disminución del marcaje de FJ-B. Al realizar la infusión con QUIN aumenta la liberación de Ca^{2+} y por lo tanto la generación de ERO, estas reacciones suceden



en tiempos cortos desencadenando una pronta muerte celular, por lo que se podría proponer que la SAC actúa de una manera rápida protegiendo las células para detener la degeneración celular.

Para determinar la expresión del factor nuclear Nrf2 se realizó un western blot en el homogenizado total de estriado, nos interesamos en este factor debido a que Nrf2 responde al estrés oxidativo que desempeña un papel importante en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. El Nrf2 actúa regulando la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes. Algunas sustancias que desencadenan la activación de este factor son diversos compuestos antioxidantes y/o electrófilos de diversa naturaleza química (Fainstein, 2007). De acuerdo con esta información, quisimos conocer cómo actúa Nrf2 frente al reto excitotóxico inducido por la infusión con QUIN. Se sabe por reportes previos que la SAC administrada durante 3 días a una dosis de 100 mg/kg, *i.p.* es capaz de activar el factor Nrf2 en hepatocitos de ratas Wistar expuestas a dicromato de potasio induciendo protección frente a este compuesto genotóxico y carcinógeno (Kalayarasan et al., 2008). Por otra parte, la SAC induce la activación del factor Nrf2 en corteza cerebral (Colín-González et al., 2012). Sin embargo, debido a que los resultados obtenidos no son contundentes (Figura 21) un mayor número de animales deben ser estudiados.

Por último, se midió la actividad de algunas enzimas antioxidantes y de fase II en el estriado y la corteza cerebral de la rata, ya que hay estudios en los cuales la administración preventiva en la enfermedad de Parkinson tiene un efecto antioxidante en el cerebro ya que incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como GPx y SOD (Manikandaselvi *et al.*, 2012). No se observaron cambios significativos en la actividad de estas enzimas (GPx, SOD, GST). Aunque se esperaba ver una disminución en estas enzimas al inducir la lesión con QUIN. De acuerdo a un estudio realizado por Hsu y colaboradores (Hsu et al., 2006) la administración subcrónica de SAC aumenta la actividad de la GPx en ratones en hígado y riñón. En otro estudio realizado en riñón se encontró que de igual manera



la actividad de esta enzima aumenta tras la administración de SAC (Gómez-Sierra et al., 2014), pero como se comentó anteriormente en este trabajo no se observan diferencias estadísticamente significativas. En el caso de la SOD existen informes que indican que la SAC por sí sola es capaz de aumentar la actividad de esta enzima hasta un 45% sobre el control al ser administrada a ratones durante 5 días a una dosis de 120 mg/kg *i.p.* (García et al., 2014). Los resultados obtenidos (Figura 23) podemos observar una ligera tendencia a seguir este comportamiento en el cual la actividad del grupo QUIN+SAC es mayor que la del grupo QUIN, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Estos resultados sugieren que el efecto protector de la SAC encontrado en este modelo no está asociado con la regulación en la actividad de las enzimas: GPx, SOD y GST por lo que se podrían medir otras enzimas antioxidantes para comprobar dicho efecto protector como: la glutatión reductasa (GR) y la catalasa (CAT) o llevar a cabo la medición de los niveles de proteínas oxidadas para ver si un efecto antioxidante de la SAC es el responsable del efecto protector.



8. Conclusiones

La SAC disminuyó las alteraciones inducidas por el QUIN en las pruebas de valoración motora, además del daño morfológico y la neurodegeneración en las células del estriado, mostrando un efecto protector.

Los resultados sugieren que la SAC podría ser utilizada como una posible alternativa terapéutica frente a la neurodegeneración inducida por los eventos excitotóxicos/pro-oxidantes que se presentan en diferentes enfermedades neurodegenerativas.



9. Perspectivas

Los resultados en los niveles de enzimas antioxidantes y de fase II no son contundentes respecto al poder antioxidante de la SAC, por lo tanto, estos experimentos deben ser repetidos mediante otras técnicas experimentales y aumentando el número de la n experimental o medir en otros tiempos u otras enzimas.



10. Referencias

Aguilera, P., Chánez-Cárdenas, M. E., Floriano-Sánchez, E., Barrera, D., J & Jiménez, P. D. M. (2007). Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology* 28(6), 1200-1207.

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition* 131(3), 955S-962S.

Amara, S. G., & Fontana, A. C. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International* 41(5), 313-318.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(17), 7915-7922.

Andreyen A.Y., Kushnareva Y.E. & Starkov A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 70(2):200-214.

Berridge, M. J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal* 220(2), 345-360.

Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 134(3),707-716.



Braidy, N., Grant, R., Adams, S., & Guillemin, G. J. (2010). Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS Journal* 277(2), 368-382.

Buchholz, J. N., Behringer, E. J., Pottorf, W. J., Pearce, W. J., & Vanterpool, C. K. (2007). Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging Cell* 6(3), 285-296.

Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annual Review of Biochemistry* 56(1), 395-433.

Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17(2), 164-173.

Carlberg, I., & Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250(14), 5475-5480.

Chirino, Y., Orozco-Ibarra, M., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de Investigación Clínica* 58(4), 350-358.

Colín-González, A. L., Maldonado, P. D., & Santamaría, A. (2013). 3-Hydroxykynurenine: an intriguing molecule exerting dual actions in the central nervous system. *Neurotoxicology* 34, 189-204.

Colín-González, A. L., Santana, R. A., Silva-Islas, C. A., Chánez-Cárdenas, M. E., Santamaría, A., & Maldonado, P. D. (2012). The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract-and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.



Copple, I. M., Goldring, C. E., Kitteringham, N. R., & Park, B. K. (2008). The Nrf2–Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246(1), 24-33.

Corona-Vázquez, T. (2002). Las enfermedades neurológicas. Su dimensión y repercusión social. *Gaceta Médica de México* 138(6), 533-536.

Cruz-Aguado, R., Francis-Turner, L., Díaz, C. M., & Antúnez, I. (2000). Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochemistry International* 37(1), 53-60.

Cruz, C., Correa-Rotter, R., Sánchez-González, D. J., Hernández-Pando, R., Maldonado, P. D., Martínez-Martínez, C. M., & Pedraza-Chaverri, J. (2007). Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 293(5), F1691-F1698.

Cullinan, S. B., Gordan, J. D., Jin, J., Harper, J. W., & Diehl, J. A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and Cellular Biology* 24(19), 8477-8486.

Dasuri, K., Zhang, L., & Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 170-185.

Dong X. X., Wang, Y., & Qin Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* 30(4) 379-87.



Elinos-Calderón, D., Robledo-Arratia, Y., Pérez-De La Cruz, V., Maldonado, P. D., Galván-Arzate, S., Pedraza-Chaverri, J., & Santamaría, A. (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(1), 35-44.

Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* 26, 18-25.

Flores Herrera, O., Rendón Huerta, E., Riveros Rosas, H., Sosa Peinado, A., Vázquez Contreras, E., & Velázquez López, I. (2005). Mecanismos de neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico* 29.

García, E., Santana-Martínez, R., Silva-Islas, C. A., Colín-González, A. L., Galván-Arzate, S., Heras, Y., & Santamaría, A. (2014). S-allyl cysteine protects against MPTP-induced striatal and nigral oxidative neurotoxicity in mice: participation of Nrf2. *Free Radical Research* 48(2), 159-167.

Gazullaa, J., & Cavero-Nagoreb, M. (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología* 42(7), 427-432.

Gómez-Quiroz L. E. & Cuevas-Bahia D. (2008). Superóxido dismutasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). *Manual Moderno* pp. 169-182.

Gómez-Sierra, T., Molina-Jijón, E., Tapia, E., Hernández-Pando, R., García-Niño, W. R., Maldonado, P. D., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). S-allylcysteine prevents cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 66(9), 1271-1281.



Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22), 7130-7139.

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences* 35(9), 505-513.

Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. In *Free Radicals in the Brain*. Springer Berlin Heidelberg pp. 21-40.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(6), 598-620.

Hammarström, A. K., Parkington, H. C., Tare, M., & Coleman, H. A. (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization in resting and depolarized mammary and coronary arteries of guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology* 126(2), 421-428.

Hansberg, T. W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26, 19-53.

Herrera-Mundo M. N., Silva-Adaya, D., Maldonado, P. D., 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. *Neuroscience Research* 56:39-44.



Hsu, C. C., Lin, C. C., Liao, T. S., & Yin, M. C. (2006). Protective effect of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 44(3), 393-397.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2014. Consulta de defunciones generales por lista mexicana de enfermedades, según año de registro. http://www.inegi.org.mx/lib/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11816. Revisado 28 de octubre del 2016. 18:40 hrs.

Jaramillo, S., Villa, N. A., Pineda, A. F., Gallego, A. B., Tabares, P., & Ceballos, A. (2005). Actividad sanguínea de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en novillas a pastoreo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40, 1115-1121.

Jordán, J. (2003). Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Offarm* 22(3), 102-113.

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 Applied Toxicology* 28(7), 908-919.

Kodera, Y., Suzuki, A., Imada, O., Kasuga, S., Sumioka, I., Kanezawa, A. & Maeshige, K. (2002). Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(3), 622-632.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30(6), 620-650.

Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Experimental Biology and Medicine* 200(2), 248-254.



Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2003). Protein blotting: a review. *Journal of Immunological Methods*, 274(1), 1-15.

Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., & Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 36 – 41.

Lau, A., Tian, W., Whitman, S. A., & Zhang, D. D. (2013). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxidants & Redox Signaling* 18(1), 91-93.

Lawson, L. D. (1998). Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. *Blood Journal* 179, 62.

Lee J. M., & Johnson J. A. (2004). An important role of Nrf2- ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research* 37,139-143.

Li, L., Fan, M., Icton, C. D., Chen, N., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Murphy TH & Raymond, L. A. (2003). Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiology of Aging* 24(8), 1113-1121.

Ljubuncic, P., Gochman, E., & Reznick, A. Z. (2010). Nitrosative Stress in Aging—Its Importance and Biological Implications in NF- κ B Signaling. In *Aging and Age-Related Disorders*. Humana Press pp. 27-54.

Luján-Miras, R. (2005). Receptores metabotrópicos del glutamato: nuevas dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. *Revista de Neurología* 40, 43-53.



Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91(4), 303-314.

Maiorino, M., Chu, F. F., Ursini, F., Davies, K. J., Doroshov, J. H., & Esworthy, R. S. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 266(12), 7728-7732.

Maldonado, P. D., Barrera, D., Rivero, I., Mata, R., Medina-Campos, O. N., Hernández-Pando, R., & Pedraza-Chaverri, J. (2003). Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radical Biology and Medicine* 35(3), 317-324.

Maldonado, P. D., Molina-Jijón, E., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Santamaria, A., & Pedraza-Chaverri, J. (2010). NAD(P) H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *Journal of Neuroscience Research*, 88(3), 620-629.

Manikandaselvi, S., Mahalakshmi, R., Thinagarbabu, R., & Angumeenal, A. R. (2012). Neuroprotective activity of S-Allylcysteine on Haloperidol induced Parkinson's disease in albino mice. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 4, 669-75.

Manji, H. K., Moore, G. J., Rajkowska, G., & Chen, G. (2000). Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 5(6), 578-593.

Marín-García, J. (2012). Mitochondria and their role in cardiovascular disease. *Springer Science & Business Media* 126-129.

Martínez, C. D., Vargas, C. R., & Arancibia, S. R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina* 46(6), 229-235.



Marty, A., & Neher, E. (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology* 367, 117.

Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 8(1), 95-108.

Mitchell, K. J., Tsuboi, T., & Rutter, G. A. (2004). Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic β -cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes* 53(2), 393-400.

Mostafa, M. G., Mima, T., Ohnishi, S. T., & Mori, K. (2000). S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Medica* 66(02), 148-151.

Nagae, S., Ushijima, M., Hatono, S., Imai, J., Kasuga, S., Matsuura, H. & Higashi, Y. (1994). Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Medica* 60(03), 214-217.

Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258(5082), 597-603.

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. *The Journal of Nutrition* 131(3), 1093S-1095S.

Olney, J. W. (1986). Inciting excitotoxic cytochrome among central neurons. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 203, 631-645.

Ottersen, O. P., & Storm-Mathisen, J. (1984). *Neurons containing or accumulation transmitter amino acids, ice: Handbook of Chemical Neuroanatomy*, A. Björklund, T. Hökfelt, and MJ Kuhar, eds.



Payne, J. L., Quiroz, J. A., Zarate, C. A., & Manji, H. K. (2002). Timing is everything: does the robust upregulation of noradrenergically regulated plasticity genes underlie the rapid antidepressant effects of sleep deprivation?. *Biological Psychiatry* 52(10), 921-926.

Pérez-De La Cruz, V., González-Cortés, C., Pedraza-Chaverrí, J., Maldonado, P. D., 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(5), 379-383.

Pérez, M. A., & Arancibia, S. R. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. *Archivos de Neurociencias* 12(1), 45-54.

Pérez-Severiano, F., Salvatierra-Sánchez, R., Rodríguez-Pérez, M., Cuevas-Martinez, E. Y., Guevara, J., Limón, D., & Santamaría, A. (2004). S-allylcysteine prevents amyloid- β peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *European Journal of Pharmacology* 489(3), 197-202.

Peuchen, S., Bolaños, J. P., Heales, S. J., Almeida, A., Duchon, M. R., & Clark, J. B. (1997). Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 52(4), 261-281.

Ray, B. B., Chauhan, N., & K Lahiri, D. (2011). The "Aged Garlic Extract" (AGE) and one of its active ingredients S-Allyl-LCysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agents for alzheimer's disease (AD). *Current medicinal chemistry* 18(22), 3306-3313.

Reyes, G. C., Sánchez, I. R., Calzada-Mendoza, C. C., & Olivares-Corichi, I. M. (2006). Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 14(4), 233-6.



Robitaille, R., & Charlton, M. P. (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *The Journal of Neuroscience* 12(1), 297-305.

Rodríguez, P. (2009). Formación de especies reactivas de oxígeno por interferencia en la expresión de la glutamatocisteína ligasa. Tesis de Maestría. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca, España.

Saavedra, O. M., Vázquez, E. N. J., Vargas, M. R. B. G., Reyes, G. M. C., & Bolaina, E. M. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 10(2), 32-39.

Sánchez, A. M. E., Mejía-Toiber, J., & Massieu, L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of Medical Research* 39(3), 265-276.

Santamaría, A., Jiménez-Capdeville, M. E., Camacho, A., Rodríguez-Martínez, E., Flores, A., & Galván-Arzate, S. (2001). In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *NeuroReport* 12(12), 2693-2696.

Santamaría, A., & Ríos, C. (1993). MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neuroscience Letters* 159(1-2), 51-54.

Santana-Martínez, R. A., Galván-Arzate, S., Hernández-Pando, R., Chánez-Cárdenas, M. E., Avila-Chávez, E., López-Acosta, G., & Maldonado, P. D. (2014). Sulforaphane reduces the alterations induced by quinolinic acid: modulation of glutathione levels. *Neuroscience* 272, 188-198.

Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., & Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of



stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39(5), 777-787.

Schmued, L. C., & Hopkins, K. J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 874(2), 123-130.

Schwarcz, R., Guidetti, P., Sathyaikumar, K. V., & Muchowski, P. J. (2010). Of mice, rats and men: revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Progress in Neurobiology* 90(2), 230-245.

Segura, T., Galindo, M. F., Rallo-Gutiérrez, B., Ceña, V., & Jordán, J. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Neurología* 36(11), 1047-57.

Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling* 6(2), 289-300.

Shigeri, Y., Seal, R. P., & Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews* 45(3), 250-265.

Simeone, T. A., Sanchez, R. M., & Rho, J. M. (2004). Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Journal of Child Neurology* 19(5), 343-360.

Sindhu, K. M., Banerjee, R., Senthilkumar, K. S., Saravanan, K. S., Raju, B. C., Rao, J. M., & Mohanakumar, K. P. (2006). Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP⁺ or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 84(2), 321-329.



Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., & Buhl, E. H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Research Reviews* 26(2), 113-135.

Sumimoto, H., Miyano, K., & Takeya, R. (2005). Molecular composition and regulation of the Nox family NAD (P) H oxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1), 677-686.

Suzuki, Y. J., Jain, V., Park, A. M., & Day, R. M. (2006). Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 40(10), 1683-1692.

Szewczyk, A., & Wojtczak, L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacological reviews* 54(1), 101-127.

Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research* 62(18), 5196-5203.

Ting, K. K., Brew, B. J., & Guillemain, G. J. (2009). Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* 6(1), 1.

Trifaro, J., & Vitale, M. (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends in Neuroscience* 16, 466-474.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1), 44-84.

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2), 126-133.



Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annual Review of Pathology* 5, 297.

Wolfensberger, M., Amsler, U., Cuénod, M., Foster, A. C., Whetsell, W. O., & Schwarcz, R. (1983). Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neuroscience Letters*, 41(3), 247-252.

Woodlee, M. T., Asseo-García, A. M., Zhao, X., Liu, S. J., Jones, T. A., & Schallert, T. (2005). Testing forelimb placing “across the midline” reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. *Experimental Neurology* 191(2), 310-317.

Yan, C. K., & Zeng, F. D. (2005). Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 5, 61-69.

Yuste, R., & Katz, L. C. (1991). Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6(3), 333-344.

Zadori, D., Klivenyi, P., Vamos, E., Fülöp, F., Toldi, J., & Vecsei, L. (2009). Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *Journal of Neural Transmission* 116(11), 1403-140.