



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre un marcador de necroptosis (RIP3)
en un modelo de infarto cerebral

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Sandra Monserrat Bautista Pérez

Tutor Principal

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

[Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Elena Ibarra Rubio
[Facultad de Química, UNAM](#)

Dra. Rachel Mata Essayag
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Morán Andrade Julio

Vocal: Funes Arguello María Soledad

Vocal: Navarro Angulo María de la Luz

Vocal: Gevorgyan Markosyan Gohar

Secretario: Arias Álvarez Ana Brígida Clorinda

Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Perla D. Maldonado Jiménez en el Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) Manuel Velasco Suárez.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 241655.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (No. de becario 778387) otorgada a la alumna durante los estudios de posgrado.

Se agradece al programa de Apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado a la alumna para la asistencia al congreso Internacional de la Sociedad de Neuroquímica (International Society of Neurochemistry).

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	3
III. ANTECEDENTES	5
1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL (EVC).....	5
2. ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN (IR).....	8
2.1 Estrés oxidante.....	11
2.2 Inflamación.....	15
2.3 Muerte celular.....	18
3. NECROPTOSIS.....	19
3.1 Necroptosis y EROs.....	22
3.2 Necroptosis e inflamación.....	24
3.3 Necroptosis en la IR.....	25
4. Tratamientos de la EVC.....	26
4.1 Tratamientos con antioxidantes.....	27
4.2 Tratamiento con antiinflamatorios.....	28
5. S-ALILCISTEÍNA (SAC).....	30
5.1 Farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad.....	32
5.2 Actividad biológica.....	35
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	41
V. HIPÓTESIS	42
VI. OBJETIVOS	42
1. Objetivo general.....	42
2. Objetivos particulares.....	42
VI. MÉTODOS	43
1. Reactivos y anticuerpos usados.....	43
2. Síntesis de la SAC.....	43
3. Animales.....	44
4. Diseño experimental.....	44
5. Oclusión de la arteria cerebral media.....	45
6. Evaluación del déficit motor.....	45
7. Muestras.....	46
8. Tinción de hematoxilina y eosina.....	47

10. Inmunohistoquímicas.....	47
11. Análisis estadístico	48
VII. RESULTADOS	48
1. La SAC previene el déficit motor inducido por la IR.....	48
2. La SAC previene el daño morfológico inducido la IR.....	49
3. La SAC previene la neurodegeneración inducida por la IR.....	52
4. La SAC previene el aumento de la necroptosis inducida por la IR.....	53
5. La SAC previene el estrés oxidante inducido por la IR.....	55
6. La SAC previene la inflamación inducida por la IR.....	57
VIII. DISCUSIÓN	59
IX. CONCLUSIÓN.....	65
X. REFERENCIAS.....	66

I. ABREVIATURAS

DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
EAE	Extracto de ajo envejecido
EVC	Enfermedad vascular cerebral
ER	Especies reactivas
EROs	Especies reactivas de oxígeno
IL	Interleucina
IR	Isquemia y reperfusión
MLKL	Pseudocinasa con dominio tipo cinasa de linaje mixto
NFκB	Factor nuclear κ B
NLRP	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que contiene un dominio de repetición rico en leucina y pirina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
¹O₂	Oxígeno singulete
8-OHdG	8-hidroxiguanosina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
ONOO⁻	Peroxinitrito
RIP3	Proteína cinasa de residuos de serina y treonina 3

O₂^{•-}	Radical anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
SAC	S-alilcisteína
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

II. RESUMEN

El infarto cerebral es una de las principales causas de muerte y discapacidad en el adulto mayor tanto en México como a nivel mundial. El daño que se presenta en el cerebro durante el infarto cerebral ocurre a través de la isquemia y la reperfusión (IR), durante los cuales las células que rodean el vaso obstruido mueren a través de diferentes mecanismos como necrosis, necroptosis y autofagia. La necroptosis es un tipo de muerte celular, que morfológicamente es similar a la necrosis, pero al igual que la apoptosis es un proceso controlado. Cuando las células mueren por apoptosis éstas son rápidamente removidas sin causar inflamación; sin embargo, al morir por necroptosis las células liberan moléculas proinflamatorias y su contenido celular, promoviendo la inflamación. En la necroptosis participan varios receptores y moléculas que convergen en la fosforilación y polimerización de la cinasa RIP3 (proteína cinasa de residuos de serina y treonina 3). Se ha reportado que un aumento en los niveles de RIP3 están relacionados con la inducción de la necroptosis en el infarto cerebral. Por otro lado, ya se ha reportado un efecto protector de la S-alilcisteína (SAC) en un modelo experimental de infarto cerebral; por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la SAC sobre los niveles de RIP3 en un modelo de infarto cerebral.

Los animales se dividieron en 3 grupos: 1) Control, sometidos al procedimiento quirúrgico de la operación, pero sin la oclusión de la arteria cerebral media; 2) IR, sometidos a 1 h de oclusión de la arteria cerebral media (isquemia) y 48 h de reperfusión; y 3) IR+SAC, sometidos a IR y tratados con SAC. La SAC se administró al inicio y 24 h después de la reperfusión por vía intraperitoneal. Los animales se sacrificaron a las 48 h de reperfusión para obtener el cerebro completo. Se midieron marcadores de déficit motor cada día, se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina y fluoro-jade B, así como las inmunohistoquímicas de los marcadores RIP3, NOS1 (óxido nítrico sintasa 1), 8-OHdG (8-hidroxiguanosina) y p65 (factor de transcripción p65) en el estriado y la corteza.

En este trabajo se corroboró el efecto protector de la SAC al disminuir el déficit motor, el daño morfológico y el número de células en neurodegeneración inducidos por la IR. Además, el tratamiento con SAC disminuyó el aumento de RIP3 (marcador de necroptosis), 8-OHdG (marcador de estrés oxidante) y p65 (marcador de inflamación) inducidos por la IR en la corteza y el estriado. Los niveles de NOS1 (marcador de estrés oxidante) no se modificaron después de la IR en la corteza; sin embargo, el porcentaje de células positivas fue mayor en el estriado, y este aumento fue disminuido por el tratamiento con SAC.

El efecto protector de la SAC en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media podría estar relacionado con la disminución de la necroptosis, el estrés oxidante y la inhibición de la vía proinflamatoria de NFκB en el estriado y la corteza. La SAC podría inhibir directa o indirectamente la necroptosis al disminuir el estrés oxidante o la inflamación.

III. ANTECEDENTES

1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL (EVC)

La EVC es un síndrome clínico caracterizado por el rápido desarrollo de signos neurológicos focales, que persiste por más de 24 h, sin otra causa aparente que un origen vascular (Arauz y Ruíz-Franco, 2012) y abarca un grupo heterogéneo de padecimientos que solo tienen en común el daño vascular al cerebro, causado por un proceso patológico primario en al menos un vaso sanguíneo (Barinagarrementería y Cantú, 2003; Piña y Martínez, 2016). La EVC se clasifica en 2 subtipos: isquémica y hemorrágica. La primera es consecuencia de la oclusión de un vaso y puede tener manifestaciones transitorias (ataque isquémico transitorio) o permanentes generando daño neuronal irreversible. La hemorrágica ocurre por la ruptura de un vaso dando lugar a una colección hemática en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo (Arauz y Ruíz-Franco 2012; Barinagarrementería y Cantú 2003).

El número de personas afectadas por esta enfermedad ha aumentado significativamente (Feigin *et al.*, 2016), actualmente es una de las principales causas de muerte, discapacidad y demencia a nivel mundial (Rivera-Nava, *et al.*, 2012). En cuanto a la mortalidad de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2015, ocupó el segundo lugar dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial; mientras que, en el 2016, el INEGI la reportó en el 6to lugar dentro de las principales causas de muerte en México (INEGI, 2016). Sin embargo, el número de casos de muerte por EVC podría estar subestimado ya que el 30% de los pacientes sufre de comorbilidades con otras enfermedades de riesgo cardiovascular, como la diabetes, las enfermedades cardíacas, la hipertensión, las neoplasias intracraneales, entre otras (Ramírez-Alvarado y Téllez-Alanís, 2016); así como otros factores de riesgo que son registrados como la causa de muerte (Góngora-Rivera, 2015).

Otro aspecto que dificulta el registro adecuado de la EVC es que existen varios términos para designar la enfermedad como embolismo, apoplejía, ataque cerebral, infarto cerebral, hemorragia cerebral, accidente cerebrovascular e incluso es generalizado como infarto, sin distinguir entre corazón o cerebro (Góngora-Rivera, 2015).

A nivel mundial la EVC es la principal causa de discapacidad en el adulto mayor (Rivera-Nava *et al.*, 2012; Scrutinio *et al.*, 2018), ya que el 75% de las personas que sobreviven padecen algún grado de discapacidad (Feigin *et al.*, 2016), y una tercera parte de los sobrevivientes queda con alguna discapacidad severa permanente (Hu y Chen, 2017). El costo que implica esta enfermedad para el paciente con secuelas neurológicas y la dependencia funcional es enorme, debido al cuidado a largo plazo, la rehabilitación y la pérdida de la capacidad productiva que impacta al individuo y a la familia (Góngora-Rivera, 2015).

Los factores de riesgo asociados a esta enfermedad se pueden dividir en no modificables y modificables (estilo de vida y médicos). Entre los factores no modificables están la edad, el género, la genética, la raza y el grupo étnico. Dentro de los factores de riesgo modificables están los relacionados con el estilo de vida como: la inactividad física, la obesidad, la dieta, el consumo de alcohol y tabaco; por otro lado, los factores de riesgo modificables médicos son: la hipertensión, la fibrilación auricular, la diabetes, la dislipidemia, la estenosis carotídea asintomática, la apnea obstructiva, la hipercoagulabilidad y la depresión (Kochhar *et al.*, 2013).

La EVC puede ocurrir a cualquier edad (Góngora-Rivera, 2015), sin embargo, la edad avanzada está relacionada con la vulnerabilidad a padecer esta enfermedad, ya que, debido al aumento en la prevalencia de factores de riesgo vasculares como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes y la obesidad (Maaijwee *et al.*, 2014). Después de los 55 años, la tasa de EVC se duplica en hombres y mujeres cada 10 años, más de la mitad de todos los casos ocurren en personas mayores de 75 años (Kochhar *et al.*, 2013). Esto

es importante ya que en México y en el mundo está aumentando el envejecimiento demográfico, debido a la disminución de la natalidad y la mortalidad, y al aumento de la esperanza de vida (Gómez *et al.*, 2013), lo que incrementa la incidencia de diabetes, obesidad y sedentarismo, aumentando a su vez el número de personas en riesgo (Cantú, 2012).

Lo anterior significa que el envejecimiento de la población, aumentará aún más el impacto socioeconómico que originan los trastornos cerebrovasculares, limitando los recursos médicos y sociales disponibles para cubrir las necesidades de los pacientes que sufren una EVC y de sus familiares (Ruano *et al.*, 2012). La trascendencia de esta llamada transición epidemiológica supera sustancialmente cualquier sistema de salud, ya que los padecimientos crónicos como la diabetes, la hipertensión, la obesidad y las dislipidemias han mostrado un aumento exponencial en los últimos 20 años y suelen generar consecuencias devastadoras como: las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Ruano *et al.*, 2012).

Además de la mortalidad y la discapacidad causada por la EVC, una repercusión grave es la alteración en las capacidades cognitivas, que pueden clasificarse como deterioro cognitivo vascular o demencia vascular (Mimenza *et al.*, 2012). El deterioro cognitivo vascular es un término usado para individuos que no cumplen los criterios de demencia y en quienes la presencia de la EVC es asintomática, en cambio la demencia vascular cerebral es la demencia relacionada con la presencia de la EVC sintomática usualmente a causa de un infarto, en asociación con declinación cognitiva de forma progresiva o evidencia de infartos bilaterales y múltiples (Mimenza *et al.*, 2012). Finalmente, aproximadamente 1 de cada 5 individuos han tenido infartos silentes (enfermedades de pequeños vasos), de forma asintomática, que al acumularse desencadenan deterioro cognitivo y demencia vascular cerebral (Cantú, 2012).

2. ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN (IR)

La isquemia es la condición o estado en el que un tejido como el cerebro es sometido a hipoxia o a bajos niveles de O₂ debido a la obstrucción de un vaso sanguíneo o a un flujo sanguíneo inadecuado (Mohr *et al.*, 2011). Mientras que la reperfusión se define como la restauración del flujo sanguíneo que conlleva a la oxigenación del tejido (Eltzschig y Eckle, 2011; Granger y Kvietys, 2015). La reversibilidad del daño isquémico y la supervivencia celular dependerán de la duración de la isquemia y del grado de disminución del flujo sanguíneo (Granger y Kvietys, 2015; Mohr *et al.*, 2011).

Después de un evento isquémico, dos áreas pueden ser distinguidas: 1) el centro o núcleo isquémico, caracterizado por la muerte de tipo necrótico; y 2) la zona que lo rodea, llamada penumbra (Chiquete y Cantú, 2012; Genova y Kucukboyaci, 2018). Originalmente esta zona fue definida fisiológicamente como la región con falta de actividad eléctrica y sin daño al comienzo de la isquemia (Carmichael, 2016); sin embargo, han aparecido otras definiciones de penumbra incluyendo: a) zona de isquemia con alteración de síntesis de proteínas y niveles de energía preservados; b) región isquémica con incremento de la extracción de O₂ (relación entre el consumo y el aporte de O₂) y reducción del flujo sanguíneo cerebral en la tomografía por emisión de positrones; c) región isquémica con perfusión anormal en la imagen de resonancia magnética, pero que es normal en la secuencia de difusión; d) zona de isquemia con flujo sanguíneo cerebral normal en el estudio de perfusión por tomografía computarizada; y e) región isquémica potencialmente rescatable con intervenciones terapéuticas apropiadas y oportunas (Chiquete y Cantú, 2012).

En condiciones normales, el flujo sanguíneo cerebral es de 50 a 60 mL/min/100 g de tejido, cuando el aporte sanguíneo disminuye a menos de 8 mL/min/100 g de tejido se presenta la isquemia. En la penumbra, los vasos sanguíneos cercanos proporcionan circulación colateral que mantienen el flujo sanguíneo entre 10 y 20 mL/min/100 g de tejido, por esta razón el tejido

se encuentra funcional y metabólicamente está activo; (Mergenthaler *et al.*, 2016). La zona de penumbra tiene dos destinos posibles: morir y formar parte del centro isquémico o sobrevivir (Carmichael, 2016). Sin ninguna intervención, al paso de los días, la zona de muerte celular avanzará de manera continua, incrementando el tamaño de la lesión (Genova y Kucukboyaci 2018; Mergenthaler *et al.* 2016).

Se estima que una persona que sufre un EVC de tipo isquémico pierde ~1.9 millones de neuronas por cada minuto si no recibe un tratamiento (Saver, 2006; Cobley *et al.*, 2018). Esto se debe a que el cerebro requiere de O₂ y glucosa para satisfacer su alta actividad metabólica, aproximadamente el 20% del O₂ total consumido y el 25% de la glucosa que circula en sangre son metabolizados por el cerebro (Cobley *et al.*, 2018; Kalogeris *et al.*, 2016).

Al disminuir los niveles de O₂, la mitocondria no puede generar ATP, lo que perturba las bombas iónicas membranales dependientes de ATP modificando las concentraciones iónicas, ya que se libera K⁺ al espacio extracelular y aumenta la concentración de Na⁺ y Ca²⁺ intracelular. Lo anterior, además de despolarizar las membranas, aumenta el contenido de agua intracelular y causa ruptura membranal (Cobley *et al.*, 2018; Doyle *et al.*, 2008; Nagy y Nardai, 2017).

El aumento intracelular de Ca²⁺ puede participar en la activación de: vías de muerte celular, producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), endonucleasas, fosfolipasas y proteasas (además de las caspasas) y factores de transcripción. Además, produce disfunción mitocondrial y del retículo endoplasmático, ambos responsables del almacenamiento de Ca²⁺ (Mohr *et al.*, 2011; Nagy y Nardai, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

La despolarización de las membranas neuronales causada por la isquemia, induce la liberación de glutamato al espacio sináptico, el cual permanece en altas concentraciones, debido a que la falta de energía impide el adecuado funcionamiento de los sistemas de recaptura de este neurotransmisor, este permanece activando a sus receptores causando la entrada de iones, lo que

puede culminar en la muerte celular (Wu y Tymianski, 2018). El glutamato es el principal aminoácido excitador, que en condiciones fisiológicas es necesario para la función celular, la plasticidad sináptica, la muerte, la supervivencia celular, el desarrollo neuronal, el aprendizaje y la memoria (Lai *et al.*, 2014; Nagy y Nardai, 2017). En altas concentraciones este neurotransmisor induce toxicidad neuronal, al activar los receptores de tipo ionotrópico que están ligados a canales iónicos que permiten la entrada rápida de iones Na^+ y Ca^{2+} a la célula. El término excitotoxicidad describe el proceso en el que altas cantidades de glutamato activan los receptores tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) e induce toxicidad (Wu y Tymianski, 2018).

El cerebro está rodeado por la barrera hematoencefálica que regula el movimiento de las moléculas entre la sangre y el cerebro. Sus componentes son las células endoteliales unidas por uniones estrechas, los pericitos, las terminaciones de los astrocitos que rodean los vasos sanguíneos y la matriz extracelular (Jiang *et al.*, 2018). La barrera hematoencefálica forma parte de la unidad neurovascular, una estructura dinámica que además de esas células incluye a las neuronas, la microglía y a las células inmunes periféricas (Jiang *et al.*, 2018). Las células endoteliales reaccionan ante el evento isquémico reordenando su citoesqueleto y alterando las proteínas de las uniones estrechas, lo que altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica; además las células endoteliales producen citocinas proinflamatorias y radicales libres (Jiang *et al.*, 2018).

Las células de la unidad neurovascular responden diferencialmente ante un evento isquémico. Las neuronas son más susceptibles debido a su gran demanda energética en comparación con los astrocitos (Rossi *et al.*, 2007). Los astrocitos y la microglía contribuyen a la inflamación y a la sobreproducción de EROs, generando estrés oxidante, lo que induce la contracción de los pericitos y dificulta la adecuada circulación sanguínea (Nagy y Nardai 2017). En fases tardías, la interacción de los astrocitos y la microglía con las neuronas tiene un papel importante en la reparación (Zhou

et al., 2018). Los astrocitos son importantes en la recaptura de glutamato y se sabe que después de la isquemia, el hinchamiento de los astrocitos comprime los vasos sanguíneos (Jiang *et al.*, 2018).

Finalmente, la disrupción de la barrera hematoencefálica es una característica del evento isquémico, y permite el paso de células del sistema inmune, que exacerban la respuesta inflamatoria y altera la homeostasis de iones y agua, causando edema (Jiang *et al.*, 2018).

2.1 Estrés oxidante

La producción de especies reactivas (ER) suele estar controlada por los sistemas de defensa antioxidante. El estado redox de las células permite cambios en la señalización celular, por lo que las defensas antioxidantes deben mantener niveles adecuados de ER para que estas puedan efectuar sus tareas (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El estrés oxidante se define como el desbalance entre el nivel de las ER y los sistemas antioxidantes. El daño que surge debido al estrés oxidante se conoce como daño oxidativo que Halliwell y Gutteridge (2015) definen como las alteraciones biomoleculares causadas por el ataque de las ER sobre los constituyentes de los organismos vivos. Un aumento del daño oxidante puede deberse a: la disminución de las defensas antioxidantes, una elevada producción de ER, daño celular, el envejecimiento y/o la muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2015). Fisiológicamente, el estrés oxidante puede inducir aumento en la proliferación, adaptación, daño celular, senescencia o muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El término ER incluye a las especies reactivas de oxígeno (EROs), pero también a las especies derivadas del nitrógeno, cloro, bromo, hierro y azufre. Las EROs incluyen todas aquellas especies radicales y no radicales derivadas del oxígeno y que son más reactivas que él, debido a que contienen oxígeno incompletamente reducido. Se consideran EROs: el oxígeno atómico (O); el ozono (O₃), que se genera de la unión del O con O₂; el oxígeno singulete (¹O₂),

que se produce por la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 ; el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Algunas especies reactivas de nitrógeno son el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO), el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Konigsberg, 2008). Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de manera independiente y que contiene uno o más electrones desapareados. Pueden formarse cuando una especie no radical pierde (radical catión $X^{\cdot+}$) o gana (radical anión $X^{\cdot-}$) un electrón, o cuando un enlace covalente sufre una ruptura homolítica y cada átomo del enlace se queda con un electrón ($A:B \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Los radicales pueden reaccionar entre ellos formando otra molécula no radical; o con no radicales, dando origen a otro radical, el cual puede unirse a otra molécula, ya sea un agente reductor u oxidante, o puede abstraer un hidrógeno enlazado a un carbono o a un nitrógeno (Halliwell y Gutteridge, 2015).

La mayoría de los metales en la primera fila del bloque d en la tabla periódica en forma iónica, son radicales libres, debido a la presencia de dos electrones desapareados, por lo que pueden donar electrones fácilmente y participar en varias reacciones. Reacciones no deseadas son la reacción de Fenton o la de Haber Weiss, ya que en ellas se genera el radical OH^{\cdot} y el anión hidroxilo ($OH^{\cdot} + OH^-$), que reaccionan rápidamente con cualquier molécula (Halliwell y Gutteridge, 2015).

En condiciones normales las ER presentes en el organismo provienen de reacciones endógenas del metabolismo, mientras que en condiciones como la IR se observa un aumento en la producción de EROs, proveniente de diferentes fuentes (Figura 1).

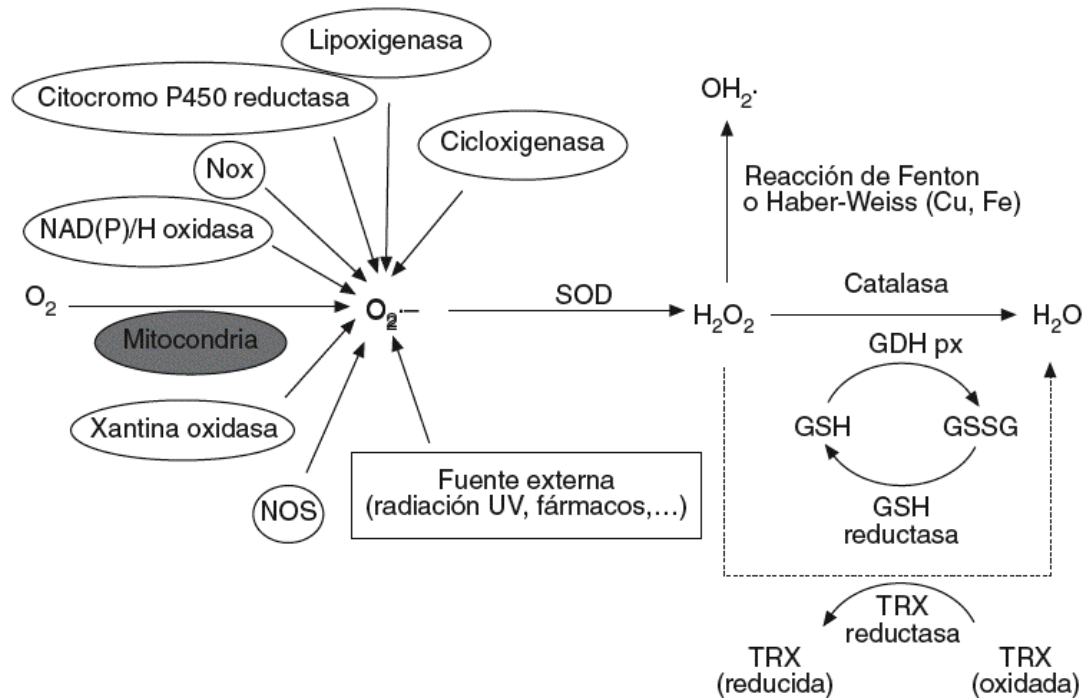


Figura 1. Formación y metabolismo celular de las EROs: El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), se produce por fuentes externas o por vías endógenas del metabolismo celular, como la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la NADPH oxidasa (NOX) de la membrana citoplasmática, la citocromo P450 reductasa, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la xantina oxidasa, la sintasa de óxido nítrico (NOS). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y este es degradado a agua por las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GDH px) y catalasa. Por otro lado, mediante la reacción de Fenton o Haber-Weiss, el H_2O_2 forma el radical hidroxilo OH^{\cdot} (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005).

El cerebro es susceptible al estrés oxidante debido a sus bajas defensas antioxidantes en comparación con otros tejidos, al alto contenido de metales de transición en algunas regiones y al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados; además, el cerebro expresa una gran cantidad de RNA largo no codificante, aproximadamente el 40% del RNA largo no codificante (Salta y Strooper, 2017) y microRNAs cuya oxidación se ha asociado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Poulsen *et al.*, 2012).

Particularmente en la IR, la mitocondria es la principal fuente de EROs especialmente después de la reperfusión, ya que ésta activa de nuevo, la

producción de energía a partir de la cadena transportadora de electrones; sin embargo, el complejo I opera en reversa, reduciendo NAD^+ a NADH , resultando en una enorme producción de O_2^- (Manzanero *et al.*, 2013).

Después de un evento isquémico aumenta la producción de NO, sintetizado por la sintasa de óxido nítrico NOS. Esta molécula es una ER sin carga que puede atravesar las membranas fácilmente, y fisiológicamente actúa como un neurotransmisor. Además, regula el flujo sanguíneo y participa en la señalización; sin embargo, durante la isquemia puede llevar a cabo reacciones de nitrosilación modificando la función de las proteínas. También el NO puede reaccionar con el O_2^- formando ONOO^- , un fuerte oxidante de proteínas y lípidos (Chen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015; Terpolilli *et al.*, 2012). Dos isoformas de la NOS se expresan constitutivamente en: células endoteliales (eNOS) y neuronas (nNOS) y ambas dependen del Ca^{2+} , mientras que la tercera isoforma es independiente de Ca^{2+} , es inducible (iNOS) y se expresa en diferentes tipos celulares como las neuronas, los macrófagos, los astrocitos y la microglía (Chen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015; Terpolilli *et al.*, 2012). La actividad de la nNOS y la iNOS se asocia con daño neuronal en la fase temprana y tardía de la isquemia, mientras que la actividad de la eNOS tiene efectos neuroprotectores (Chen *et al.*, 2017). La NOS sintetiza NO a partir de la L-arginina y el O_2 , por lo que durante la isquemia el oxígeno residual mantiene la producción de NO; sin embargo, este disminuye rápidamente y aumenta cuando el flujo es restablecido (Chen *et al.*, 2017; Halliwell y Gutteridge, 2015).

Otra ER asociada con el aumento del estrés oxidante y con la disfunción de la barrera hematoencefálica en el evento isquémico, es el O_2^- . Esta molécula es producida por las NADPH oxidasas (NOX) cuya función principal es producir O_2^- (McCann y Roulston, 2013; Manzanero *et al.*, 2013). La NOX se expresa constitutivamente en las neuronas, la microglía y los astrocitos, donde participa en la señalización celular en estado fisiológico (Narasimhan

et al., 2014); así mismo, en las células endoteliales y los pericitos su expresión es mayor (Chamorro *et al.*, 2016; Manzanero *et al.*, 2013).

El aumento de EROs resulta en la lipoperoxidación, la nitrosilación y oxidación de proteínas, el daño al DNA y la disfunción de la barrera hematoencefálica, lo que finalmente contribuye a la muerte celular (Tuttolomondo *et al.*, 2014).

La lipoperoxidación (daño oxidativo a los lípidos) culmina en la disfunción membranal y sus productos finales (4-hidroxinonal y 4-oxo-2-nonal) son neurotóxicos (Halliwell y Gutteridge, 2015). La oxidación de las proteínas es una importante consecuencia del estrés oxidante, ya que resulta en la disfunción de las proteínas dañadas. Por otro lado, en los ácidos nucleicos las bases púricas y pirimidínicas, así como los azúcares, son susceptibles a la oxidación (Duris *et al.*, 2014), promoviendo la muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2015).

2.2 Inflamación

La inflamación es una respuesta biológica a un estímulo nocivo, como patógenos o células dañadas, que intenta proteger al organismo removiendo el estímulo nocivo, e iniciando el proceso de reparación (Skaper *et al.*, 2018). Cuando ocurre en el sistema nervioso es conocida como neuroinflamación (Skaper *et al.*, 2018) y es una característica de todas las enfermedades neurológicas (Jana *et al.*, 2016), ya que promueve el daño al cerebro (Iadecola y Anrather, 2011a).

La respuesta inmune puede clasificarse en respuesta inmune innata y adaptativa (Abbas *et al.*, 2010). La respuesta inmune innata se considera el sistema de defensa más antiguo y conservado. Ante un estímulo nocivo es la primera en activarse. Está compuesta de barreras físicas, químicas, celulares y proteínas en la sangre, que median la inflamación y la producción de citocinas que regulan la respuesta inmune (Chamorro *et al.*, 2012). Las células del sistema inmune innato expresan receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs) (Heneka *et*

al., 2014). Los DAMPs al ser reconocidos activan vías que regulan la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, EROs y señales coestimuladoras (Chamorro *et al.*, 2012). Por otro lado, el sistema inmune adaptativo es más específico y lento, tiene la capacidad de recordar exposiciones previas a moléculas dañinas, al ser iniciada por el reconocimiento de antígenos por los linfocitos, estos responden proliferando y diferenciándose en células efectoras que pueden tener efectos citoprotectores o citotóxicos (Chamorro *et al.*, 2012).

Las citocinas son proteínas que funcionan como moléculas de señalización, actúan a través de receptores y son especialmente importantes en la regulación de las células del sistema inmune. Las citocinas incluyen las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), los factores estimuladores de colonias (CSF) y las quimiocinas y dependiendo del estímulo y el tipo celular se producirán unas u otras. Las IL son citocinas producidas por los linfocitos y participan en la inflamación y la regulación del sistema inmune. En condiciones fisiológicas, las IL están presentes en bajas concentraciones (Becher *et al.*, 2017; Prieto y Cotman, 2017); sin embargo, después del evento isquémico, son producidas y se pueden encontrar en la sangre, el suero y los tejidos incrementando su concentración (IL1, IL6 e IL10) (Kawabori y Yenari, 2015).

Las quimiocinas son un conjunto de proteínas, cuya principal función es la quimiotáctica, direccionando el movimiento de los leucocitos circundantes hacia los sitios de inflamación y son expresadas por neuronas, astrocitos, microglía, células endoteliales y células circulantes (Kawabori y Yenari, 2015). Además, varios factores de transcripción como el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB) se activan después del evento isquémico (Kawabori y Yenari, 2015). Todo lo anterior participa en el proceso de neuro inflamación.

La familia de los factores de transcripción NFκB está formada por 5 proteínas, RelA (p65), RelB, c-Rel (Rel), p100 y p105 (precursor p50). Todas contienen el dominio de homología Rel, que ayuda a la dimerización, a la unión con el

DNA, y a la interacción con su inhibidor I κ B. NF κ B es el nombre que se le da a las proteínas diméricas que resultan de las combinaciones de las proteínas que pertenecen a esa familia (Courtois *et al.*, 2016). El heterodímero más común está formado por RelA (p65) y p50, se localiza en el citoplasma y en estado inactivo está unido a I κ B, su proteína inhibidora endógena. Los estímulos proinflamatorios activan la cinasa IKK, que al ser activada fosforila a I κ B para su degradación vía proteasoma, entonces NF κ B se transloca al núcleo, donde se une a los sitios κ B, ubicado en los promotores de genes proinflamatorios (Kawabori y Yenari, 2015).

Los DAMPs y citocinas expresadas en la fase temprana del daño isquémico accedan a la circulación sistémica a través de la ruptura de la barrera hematoencefálica o por el líquido cefalorraquídeo, causando una respuesta inflamatoria sistémica (Becker y Buckwalter, 2016). La respuesta inflamatoria es transitoria y es sucedida por una inmunodepresión que predispone a infecciones, estos cambios persisten varias semanas después del evento isquémico (Anrather y Iadecola, 2016).

Ante un evento isquémico, la cascada inflamatoria es activada inmediatamente después de la oclusión del vaso. La falta de flujo sanguíneo provoca estrés en el endotelio lo que promueve la expresión de selectinas que son cruciales para alentar el paso de los leucocitos, atrayéndolos al endotelio, en donde se unen y promueven la obstrucción del vaso sanguíneo (Anrather y Iadecola, 2016). La inflamación endotelial promueve la ruptura de la barrera hematoencefálica y la entrada de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos (Anrather y Iadecola, 2016). En el parénquima del cerebro, la liberación de DAMPs de las neuronas dañadas, activa los receptores de patrones moleculares presentes en la microglía y los astrocitos (Anrather y Iadecola, 2016).

La activación de la microglía implica cambios en su morfología y su expresión génica, la cual varía dependiendo de la naturaleza, fuerza y duración de estímulo. Puede adoptar una activación clásica o alternativa, liberando

mediadores proinflamatorios, o moléculas neuroprotectoras; en los estados tempranos del evento isquémico la microglía asume el fenotipo alternativo y gradualmente se transforma a la forma clásica (Li *et al.*, 2014), para liberar IL1 β y TNF mediante el inflamasoma, lo que induce la expresión de citocinas y quimiocinas en las células endoteliales y los astrocitos (Anrather y Iadecola, 2016).

La hipoxia generada por la isquemia inicia la producción de EROs que activa la cascada de coagulación y lleva a la activación del complemento, plaquetas y células endoteliales. El NO al reaccionar con otras EROs disminuye, promoviendo la contracción del vaso sanguíneo. Finalmente, la degranulación de los mastocitos y los macrófagos liberan citocinas proinflamatorias que facilitan la infiltración de los leucocitos (Iadecola y Anrather, 2011b).

2.3 Muerte celular

La muerte celular es un proceso inevitable como consecuencia de la vida, además de ser un proceso para eliminar células, irreversiblemente dañadas o potencialmente dañinas (Galluzzi *et al.*, 2018b). La muerte celular puede ser regulada o accidental. La muerte celular accidental es instantánea y catastrófica debido a que las células son expuestas a un daño físico o químico. Por otro lado, la muerte celular regulada requiere de una maquinaria molecular, lo que implica que es un proceso modulable por intervenciones genéticas o farmacológicas (Galluzzi *et al.*, 2018b). La muerte regulada puede presentarse en dos escenarios: por un lado, puede ocurrir en ausencia de cualquier perturbación actuando solo para el recambio o desarrollo del tejido (muerte celular programada), o se puede originar por perturbaciones del ambiente intracelular o extracelular. Cuando las perturbaciones son intensas o prolongadas, este tipo de muerte expone o libera moléculas que alertan al organismo (Galluzzi *et al.*, 2018b).

La muerte celular se manifiesta por alteraciones morfológicas que históricamente se usaron para clasificarla en: 1) apoptosis (tipo I), caracterizada por el encogimiento citoplasmático, la condensación de la cromatina (picnosis), la fragmentación nuclear (cariorraxis) y la formación de vesículas membranales (cuerpos apoptóticos) que son eliminadas eficientemente por fagocitosis; 2) autofagia (tipo II) que se manifiesta por extensa vacuolización y culmina en su eliminación por fagocitosis; y 3) necrosis (tipo III) que no muestra las características de la muerte de tipo I o II; en este tipo de muerte las células necróticas se alargan, los organelos se hinchan, hay disrupción de las membranas y no hay condensación nuclear (Weinlich *et al.*, 2017; Galluzzi *et al.*, 2018b).

Actualmente se han descubierto nuevas subrutinas de muerte celular, cada una de las cuales tiene cierto grado de interconectividad y características que van desde el aspecto completamente apoptótico hasta totalmente necrótico y desde un perfil no inflamatorio hasta un perfil proinflamatorio. Los tipos de muerte celular de acuerdo al Comité de Nomenclatura de la muerte celular son: apoptosis intrínseca, apoptosis extrínseca, necrosis modulada por la transición de la permeabilidad mitocondrial, necroptosis, ferroptosis, piroptosis, partanatos, muerte celular entótica, muerte celular NETótica, muerte celular dependiente de lisosomas, muerte celular dependiente de autofagia y muerte celular inmunogénica (Berghe *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2018b).

3. NECROPTOSIS

La necroptosis es un tipo de muerte celular controlado, pero presenta características morfológicas de la necrosis. Requiere de la actividad de la cinasa RIP3 (proteína cinasa de residuos de serina y treonina 3), que previamente era conocida como regulador de la inflamación, supervivencia celular y enfermedad, y de su sustrato MLKL (pseudocinasa de linaje mixto con dominio tipo cinasa) (Dhuriya y Sharma, 2018). Es independiente de la activación de caspasas y es inhibida por la actividad de estas (Vandenabeele

et al., 2010; Wegner *et al.*, 2017; Weinlich *et al.*, 2017). La necroptosis se clasifica en 3 categorías: la necroptosis extrínseca estimulada por TNF α , la necroptosis intrínseca estimulada por EROs y la necroptosis intrínseca mediada por la isquemia (Dhuriya y Sharma, 2018).

La cinasa RIP3 (o RIPK3) pertenece a la familia RIPK (por sus siglas en inglés Receptor-interacting protein kinases) y está dentro de la categoría de las proteínas cinasas de serinas/treoninas. Las cinasas de esta familia, además de contar con estructuras similares, comparten funciones fisiológicas que incluyen la regulación de la muerte celular, la inflamación y la diferenciación celular (Anwar y Choi, 2018). Existen 7 RIPK, nombradas como RIPK1 a RIPK7, la mayoría de sus señales lleva a la activación de la vía de NF κ B y/o a la activación de la proteína activadora 1 (AP-1), lo que lleva finalmente a la muerte celular (Anwar y Choi, 2018).

Se han identificado varios iniciadores de la necroptosis, como el TNF (factor de necrosis tumoral), el CD95L (también conocido como FasL y APO-1L), los TRAIL (ligandos inductores de apoptosis relacionados con TNF), los TWEAK (inductores débiles de la apoptosis relacionados con TNF), el estrés genotóxico, la estimulación policlonal de TCR (receptores de células T), la activación mediada por virus, los fármacos anticancerígenos, los PAMPs y los interferones (Berghe *et al.*, 2014). Sin embargo, esos ligandos también pueden activar vías de supervivencia o a la apoptosis (Arora *et al.*, 2017).

Además de la activación de los receptores antes mencionados, la necroptosis depende de que RIP3 fosforile a la proteína MLKL, al complejo que se forma entre estas dos proteínas se le conoce como necrosoma y su formación es regulada por la interacción entre varias proteínas (Galluzi *et al.*, 2018). En la figura 2 se muestran algunas vías de activación y ejecución de la necroptosis, así como los complejos que llevan a la formación del necrosoma: (1) TNFR1; (2) Los receptores de interferones IFNAR e IFNGR a través de la formación del complejo RIP1-RIP3; (3) el receptor TLR4 vía la formación del complejo TRIF-RIP1-RIP3; (4) el receptor TLR3 vía a formación del complejo TRIF-

RIP1-FADD-cFLIP-caspasa 8; (5) durante una infección con el virus de citomegalovirus (MCMV) el receptor intracelular DAI reconoce la doble cadena de DNA, recluta a RIP3 e induce su fosforilación y oligomerización.

La vía mejor caracterizada es la iniciada por la unión de TNF α a TNFR1 que sufre un cambio conformacional permitiendo que la porción citosólica del receptor se una a las proteínas RIP1, cIAP1, cIAP2 (inhibidor de la apoptosis 1 y 2) TRAF2 y TRAF 5 (factor asociado a TNFR 2 y 5). A la unión de estas proteínas se les conoce como complejo I (Figura 2-1), cuando este complejo se desubiquitiniza y se une a la proteína FADD se forma el complejo II (Figura 2-2), que promueve la muerte celular y que puede estar formado por diferentes proteínas y depende o no de la actividad de RIP1. Si depende de la actividad de RIP1, este complejo II también es conocido como ripoptosoma (Wegner *et al.*, 2018). En este complejo si la caspasa 8 se activa, el resultado es la muerte apoptótica; pero si la caspasa 8 está inhibida se recluta a RIP3 para la formación del necrosoma, que estimula la necroptosis (Vandenabeele *et al.*, 2010; Wegner *et al.*, 2018).

Una vez que el necrosoma es formado (Figura 2-3), RIP3 se fosforila y recluta otras moléculas de RIP3 que se fosforilan y forman estructuras fibrilares (Figura 2-4) (Galluzzi *et al.*, 2018a). La activación de RIP3 lleva a la fosforilación de MLKL (Galluzzi *et al.*, 2018a, Silke *et al.*, 2015), que se oligomeriza y se transloca a las membranas, causando las características de la muerte por necroptosis: la ruptura de membranas y el hinchamiento de los organelos, que culmina en la muerte celular (Figura 2-5). MLKL también puede inducir el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 requerido para la liberación de la IL-1 β (Zhang *et al.* 2017).

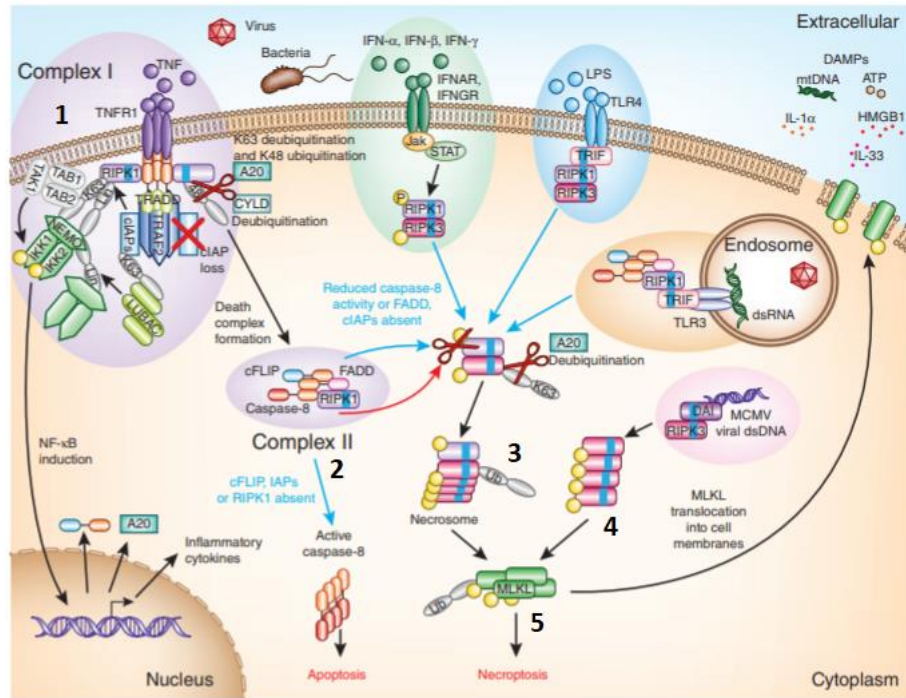


Figura 2. RIP1 y RIP3 regulan la muerte necroptótica. Este tipo de muerte puede ser inducida por varios receptores (como TNFR1), que llevan a la asociación de RIP1 con RIP3, a través de sus dominios RHIM (Azul). La fosforilación de RIP3 lleva al reclutamiento de otras moléculas de RIP3 que se fosforilan y polimerizan para posteriormente fosforilar y activar a MLKL. La translocación de MLKL lleva a la necroptosis y a la liberación de PAMPs (modificada de Silke *et al.*, 2015).

3.1 Necroptosis y EROs

La necroptosis está acompañada de la liberación de EROs (Weinlich *et al.*, 2017) pero su relación aún es controversial, ya que la inhibición de la producción de EROs disminuye la necroptosis solo en algunos tipos celulares (Fulda, 2016).

El tratamiento con antioxidantes como el hidroxianisol butilado, la N-acetil cisteína, el α tocoferol y el piruvato de etilo, previenen la necroptosis inducida por el BV6/TNF α en cultivos celulares de linfocitos T (Schenk y Fulda, 2015). Estos autores reportaron que las EROs promueven y estabilizan la formación del necrosoma conformado por RIP1 y RIP3, el ensamblaje de este complejo disminuye por el pretratamiento con los antioxidantes (hidroxianisol butilado,

la N-acetil cisteína, α tocoferol y piruvato de etilo). Por otro lado, la formación del necrosoma es seguida de un aumento de EROs y al silenciar a RIP1 o RIP3 también se puede observar la disminución de la producción de EROs (Schenk y Fulda, 2015).

De igual manera al inducir la necroptosis con TNF/-z-VAD-fmk/ciclohexamina, en fibroblastos, el pretratamiento con el antioxidante hidroxianisol butilado disminuye la muerte celular y la acumulación de EROs, mientras que en fibroblastos derivados de ratones *knockout* de las proteínas RIP, TRAF2 o TRADD (proteínas relacionadas con la formación del necrosoma), disminuye la producción de EROs y la muerte por necroptosis (Lin *et al.*, 2004).

También se ha observado en fibroblastos que las proteínas cIAP y TAK1 rescatan a las células de la necroptosis inducida por TNF/BV6 al inhibir la producción de EROs dependiente de la formación del complejo RIP1/RIP3. Por otro lado, el tratamiento con TNF/BV6 incrementa la producción de EROs, la cual disminuye con el tratamiento de necrostatina 1 o disminuyendo los niveles de RIP3. Mientras que el silenciamiento de cIAP y TAK1 resulta en el aumento de la necroptosis y el aumento de EROs, al combinar el tratamiento de TNF/BV6 con el antioxidante hidroxianiso butilado en estas células disminuye la necroptosis y la producción de EROs (Vanlangenakker *et al.*, 2010). En este modelo la producción de EROs se atribuye al complejo mitocondrial NDUF8 (NADH deshidrogenasa 1 β subcomplejo 8) (Vanlangenakker *et al.*, 2010).

De igual manera, se ha reportado que en fibroblastos derivados de embriones de ratón *knockout* para ciclofilina, disminuye la necroptosis inducida por TNF. La ciclofilina es una proteína que participa en la formación del poro de transición mitocondrial, el cual induce la formación de ER y participa en la inducción de la necroptosis (Fulda, 2016).

Adicionalmente al infectar al pez cebra con *M. tuberculosis*, este organismo responde liberando grandes cantidades de TNF α que activan la muerte por necroptosis y la producción de EROs por la mitocondria. Esta producción de

EROs depende de la asociación de RIP1 y RIP3 (Roca y Ramakrishnan, 2013).

Finamente, durante la isquemia cerebral, la activación de los receptores NMDA aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo que activa a la NOS y por consiguiente la producción de NO (Miao *et al.*, 2015). El NO que puede nitrosilar a RIP3, el cual aumenta conforme aumenta el tiempo de reperfusión (Miao *et al.*, 2015). Se ha reportado que al usar un antagonista de la NOS se disminuye la nitrosilación de RIP3 y disminuye el daño neuronal (Miao *et al.*, 2015).

3.2 Necroptosis e inflamación

Cuando las células mueren por necroptosis, la ruptura de la membrana celular lleva a la liberación de DAMPs, generando una respuesta inflamatoria, ya que estas moléculas se unen a receptores membranales o a receptores intracelulares de las células vecinas, induciendo la producción de citocinas por la vía de NFκB. La proteína MLKL que se une a la membrana y forma los poros que caracterizan a la necroptosis y promueve la activación del inflamasoma NLRP3, que activa a la caspasa 1, para generar a la IL1β. La activación del inflamasoma NLRP3 también podría estar regulada por la actividad de RIP3 (Gutierrez *et al.*, 2017; Kearney y Martin, 2017; Lawlor *et al.*, 2015)

Ratones *knockout* para RIP3 administrados con TNF, para producir el síndrome de inflamación sistémica, tienen menor mortalidad, al igual que los ratones que reciben un pretratamiento de necrostatina-1, lo que sugiere que la necroptosis medía el daño celular relacionado con la inflamación, que eventualmente lleva a la muerte; de igual modo los niveles de DAMPs y citocinas son menores en ratones con deficiencia de RIP3 (Orozco y Oberst, 2018). Los DAMPs que se cuantificaron y que fueron menores en los ratones deficientes en el modelo de inflamación sistémica fueron la enzima lisosomal hexosaminidasa y la enzima citosólica lactato deshidrogenasa y ADN

mitocondrial, mientras que los parámetros específicos asociados al daño disminuyeron fueron AST y ALT (daño en hígado) y creatina cinasa (daño en corazón o riñón). Por otro lado, las citocinas que se cuantificaron fueron IL-1 e IL-6, y este efecto protector fue mayor en la fase tardía de la inflamación en el modelo de inflamación sistémica (Orozco y Oberst, 2018).

Además, al usar un inhibidor de RIP3 (Dabrafenib) en un modelo de isquemia por foto trombosis en ratones, disminuye el daño al tejido y la producción de TNF α , Cruz y colaboradores, correlacionan la actividad de TNF α con la activación de la necroptosis, sin embargo, además de TNF α no se cuantificaron otras citocinas proinflamatorias (Cruz *et al.*, 2018).

3.3 Necroptosis en la IR

En el foco isquémico, las células más próximas a la arteria ocluida, mueren por necrosis, pero en la periferia predominan otros tipos de muerte celular entre los que se encuentran la necroptosis, la apoptosis y la autofagia. Para asegurar la máxima supervivencia celular se deben usar estrategias que puedan contrarrestar los diferentes tipos de muerte celular (Kalogeris *et al.* 2016; Vieira *et al.* 2014).

La necroptosis representa un blanco terapéutico ante el daño por IR desde el 2005 (Vandenabeele *et al.*, 2010; Weinlich *et al.*, 2017), cuando se demostró que la necrostatina-1, un inhibidor de la necroptosis, disminuye el área de infarto en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratones (Degterev *et al.*, 2005). A partir de ese estudio se ha confirmado la eficacia de inhibir la necroptosis en modelos de IR en diferentes órganos incluyendo la retina, el corazón y el riñón (Wegner *et al.*, 2017).

La isquemia cerebral global resulta de la interrupción del flujo sanguíneo a todo el cerebro, tal como sucede durante un paro cardíaco. El hipocampo es el área más afectada en animales que son sometidos a isquemia global. En la región CA1 del hipocampo, la isquemia activa cambios transcripcionales que llevan al incremento del mRNA de RIP3 que se transcribe aumentando

los niveles de la proteína RIP3. En estas condiciones se ha observado que RIP3 entra al núcleo y forma un complejo con AIF, mecanismo necesario para la degradación del DNA. El tratamiento con la necrostatina-1 previene los cambios inducidos en RIP3 (Vieira *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2015; Zhou y Yuan, 2014).

En los modelos de privación de oxígeno y glucosa en cultivos celulares y oclusión de la arteria cerebral media, la necroptosis es inhibida por la necrostatina-1, pero además se disminuye la neuroinflamación, la expresión de IL1 β , IL 6, TNF α y la activación de NF κ B (Yang *et al.*, 2017b; Zhao *et al.*, 2015).

En el modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas, los niveles de la proteína RIP3 aumentan progresivamente después de 2 h de isquemia a las 6, 12, 24, y 72 h de reperusión (Dong *et al.*, 2016).

Finalmente, en modelos que comparten características con el modelo de daño por IR, como el modelo de impacto cortical controlado, el de daño traumático cerebral y el de isquemia hemorrágica, la administración de la necrostatina-1 disminuye la muerte celular y el daño oxidante y previene la infiltración de células del sistema inmune. Además, en astrocitos y neuronas disminuye la disfunción mitocondrial (Li *et al.*, 2008; Linkermann *et al.*, 2013; Zhou y Yuan, 2014).

4. Tratamientos de la EVC

La terapia con el factor trombolítico activador de plasminógeno tisular recombinante (rtPA) es el único tratamiento farmacológico aprobado por la FDA para el infarto cerebral. Sin embargo, debido a la pequeña ventana terapéutica y a los efectos colaterales que produce, se estima que solo el 5% de los pacientes se puede beneficiar de esta terapia (Zhou *et al.*, 2018). Por ello la búsqueda de nuevos agentes está justificada y es necesaria.

La neuroprotección consiste en estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear las consecuencias metabólicas y bioquímicas asociadas a la IR, con el fin de prevenir la muerte neuronal. Se basa en el principio de que la IR es un proceso dinámico y no un evento instantáneamente irreversible. La neuroprotección intenta modificar los eventos moleculares que ocurren en forma secuencial a lo largo de los minutos y horas en el área de penumbra y así evitar el daño neuronal secundario (Chiquete y Cantú, 2012). Además, se ha determinado en pacientes, que el 45% del área final afectada permanece viable hasta 12 h después del evento isquémico (Díez-Tejedor, 2006)

Varias estrategias se han probado para detener el avance de la transformación del área de penumbra en área de infarto, en modelos preclínicos; sin embargo, hasta hoy aún no se ha tenido éxito en pacientes (Patel y McMullen, 2017; Siket, 2016).

4.1 Tratamientos con antioxidantes

Un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidante de una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Los antioxidantes pueden categorizarse dependiendo de su modo de acción en tres clases: los que eliminan las ER reaccionando con ellas (antioxidantes directos), los que inhiben la formación de las ER, fortaleciendo las defensas antioxidantes o promoviendo la reparación (antioxidantes indirectos) y los que tienen actividad antioxidante directa e indirecta (Antoniou *et al.*, 2014).

Las células están equipadas con antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que eliminan el exceso de EROs con el fin de mantener la homeostasis redox. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen antioxidantes exógenos, adquiridos de la dieta, como el ácido ascórbico (vitamina C), el α tocoferol (vitamina E), los carotenoides, los flavonoides, entre otros; mientras que los antioxidantes endógenos son aquellos que son sintetizados en el organismo como la bilirrubina o el glutatión reducido. Por otro lado, los antioxidantes enzimáticos

incluyen proteínas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

En la EVC el estrés oxidante es una característica importante, ya que está relacionada con el daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que ha llevado a probar el uso de antioxidantes para disminuir el daño oxidativo inducido por la IR (Zhou *et al.*, 2018).

En estudios preclínicos, el uso de antioxidantes (el ácido úrico, la melatonina, la eritropoyetina, entre otros) como terapia en la EVC han mostrado tener éxito (Zhou *et al.*, 2018). Sin embargo, este beneficio no se ha observado en los estudios clínicos (Roleira *et al.*, 2012). A nivel molecular, las diferencias en los sistemas de transportadores, los canales, los receptores y las enzimas que regulan el paso de moléculas extrañas entre los modelos animales y los humanos, pueden interferir con las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de los antioxidantes evaluados; por ello, estas propiedades deben ser evaluadas para aumentar el posible éxito clínico. Debido a que varios mecanismos están implicados en el daño inducido por la IR, el uso de una terapia que solo atienda un blanco terapéutico podría ser ineficiente; por lo que las nuevas terapias deben incluir varios medicamentos o un medicamento con múltiples blancos terapéuticos para intervenir a varios niveles en la cascada isquémica (Roleira *et al.*, 2012).

4.2 Tratamiento con antiinflamatorios

La inflamación también representa un blanco terapéutico para la EVC isquémica. Se ha reportado en modelos animales que las señales del sistema inmune y sus mediadores pueden tener efectos perjudiciales o benéficos en diferentes estados de la enfermedad. Las terapias que se han desarrollado tienen como objetivo disminuir la activación de la microglía y la migración de leucocitos, así como modular las propiedades anti- y pro- inflamatorias de las citocinas durante la fase aguda (Drieu *et al.*, 2018; Veltkamp y Gil, 2016).

La minociclina, es uno de los tratamientos que se ha probado para el tratamiento de la IR, en estudios preclínicos ya que disminuye la activación de la microglía, la producción de EROs, la expresión de quimiocinas y el tamaño de la lesión; sin embargo, en estudios clínicos no se ha logrado comprobar su eficacia (Drieu *et al.*, 2018).

Entre las estrategias para disminuir el paso de células del sistema inmune al parénquima cerebral está la administración de anticuerpos como el Enlimomab un anticuerpo de origen murino que va dirigido hacia ICAM (molécula que promueve el paso de las células del sistema inmune al parénquima facilitando su adhesión y rodamiento sobre las células endoteliales), que anteriormente había mostrado un efecto protector, disminuyendo el daño neurológico, en un modelo de infarto cerebral por embolia en conejo. No obstante, al ser administrado en pacientes 6 h después del evento isquémico aumentó los efectos adversos (Drieu *et al.*, 2018).

Por otro lado, la IL-1Ra es el único tratamiento dirigido hacia la IL-1, IL-1Ra es una citocina antiinflamatoria que modula los efectos de la IL-1 y se expresa en macrófagos, neutrófilos, y la microglía, en estudios preclínicos ha mostrado que disminuye el área de infarto en ratas y ratones; pero en estudios clínicos se ha reportado que su vida media es muy corta y atraviesa la barrera hematoencefálica lentamente por lo que no alcanza concentraciones terapéuticas en el cerebro de los pacientes (Lambertsen *et al.*, 2018).

A pesar de que la intervención en el proceso inflamatorio después de la isquemia y la reperfusión ha tenido mucho éxito en estudios preclínicos; al igual que en el caso de los antioxidantes, no se ha podido probar su efectividad en estudios clínicos. Este fallo se puede atribuir a que la inflamación en la IR es el resultado de varias vías redundantes (Jin *et al.*, 2013). Por lo que es necesario un estudio más profundo de la participación de la inflamación en el daño por la IR.

5. S-ALILCISTEÍNA (SAC)

El ajo (*Alliu sativum* L.), se cree que tuvo su origen en las montañas en el centro de Asia y fue domesticado desde la antigüedad. Ha sido mencionado en manuscritos egipcios, babilonios, griegos, hindúes y chinos, así como en la biblia. El ajo contiene más de 2000 moléculas con actividad biológica (Majewski, 2014). Desde la antigüedad se le han atribuido propiedades medicinales, como antimicrobiano, anticancerígeno, antioxidante, regulador del sistema inmune, antidiabético, hepatoprotector, antifibrinolítico y anti-agregador plaquetario, además de estar relacionado con la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Santhosha *et al.*, 2013).

Actualmente, existen varias presentaciones del ajo para su comercialización con fines medicinales, una de ellas es el extracto de ajo envejecido (EAE), que es preparado al sumergir los dientes de ajo fresco picados en etanol (15-20%) por un periodo mayor a 20 meses a temperatura ambiente en contenedores de acero inoxidable (Amagase *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2016).

Se han reportado varios efectos biológicos del EAE que incluyen: atrapador del radical $O_2^{\cdot-}$, reducción del colesterol y lipoproteínas en la sangre, efectos anti ateroscleróticos, inhibición de la agregación plaquetaria, modulación del sistema inmune, protege las membranas de la lipoperoxidación e induce enzimas antioxidantes (revisado en Colin-González *et al.*, 2012). La capacidad del EAE para disminuir el daño oxidante se ha observado en modelos experimentales de varias enfermedades incluyendo diabetes, cáncer, infarto cerebral, Alzheimer, Parkinson y alteraciones cardiovasculares, además de mejorar la actividad cognitiva y aumentar la esperanza de vida en animales con senescencia acelerada (revisado en Qu *et al.*, 2016).

Los efectos biológicos del EAE han sido atribuidos principalmente a la S-alilcisteína (SAC), el compuesto organosulfurado más abundante en esta presentación (Lim, 2015) y que se ha usado para estandarizar los productos comerciales de EAE (Lim, 2015; Qu *et al.*, 2016).

La SAC deriva de la γ -glutamil-S-alil-L-cisteína, a través de una transformación enzimática que cataliza la γ -glutamilttransferasa (Figura 3A). Esta enzima se encuentra en la membrana celular, mientras que su sustrato se encuentra en vacuolas, lo que dificulta la transformación enzimática en los dientes de ajo intacto (Amagase, 2006; Yin *et al.*, 2015). Sin embargo, al picar los dientes de ajo y almacenarlos en etanol incrementan los niveles de SAC (Xu *et al.*, 2015). Otra forma de obtener SAC es a través de su síntesis química (Figura 3B) a partir de la L-cisteína y el bromuro de alilo como se hace actualmente en el laboratorio (Nagae *et al.*, 1994; Maldonado *et al.*, 2003).

La SAC es un compuesto de color blanco brillante, inodoro, soluble en agua y poco soluble o insoluble en solventes orgánicos. Su solubilidad es mayor en soluciones básicas que en soluciones ácidas, no es higroscópico y su punto de fusión es de 223.7 °C. Es un compuesto muy estable ya que no se modifica su estructura al ser almacenado en condiciones ácidas, lo que indica que se absorbe sin cambios debidos al pH gastrointestinal. Soluciones de este compuesto permanecen sin cambios hasta por 2 años (Kodera *et al.*, 2002).

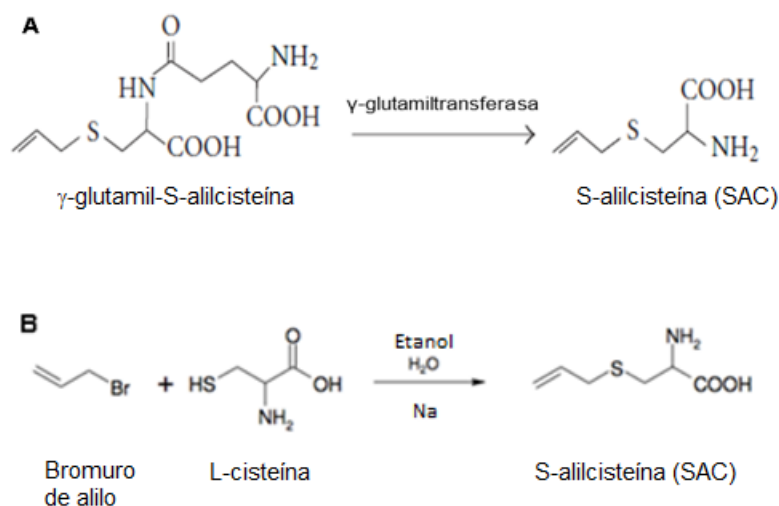


Figura 3. Síntesis enzimática (A) y química (B) de la SAC. (A) La síntesis enzimática ocurre a través del catabolismo de la γ -glutamil-S-alilcisteína por la γ -glutamilttransferasa en los dientes de ajo picado. (B) La síntesis química ocurre de la reacción entre la L- cisteína y el bromuro de alilo.

5.1 Farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad

La SAC tiene una alta biodisponibilidad en humanos, su tiempo de vida media es aproximadamente de 10 h y el tiempo de depuración es de 24 h, estos resultados son muy similares a los observados en modelos animales (Amano *et al.*, 2015; 2016; Koderá *et al.*, 2002; Nagae *et al.*, 1994).

El principal metabolito de la SAC en la orina es la NAc-SAC (N-acetil-S-alil-L-cisteína) (Koderá *et al.*, 2002). Sin embargo, otros metabolitos que se pueden encontrar en el plasma y en la orina de animales son la N-acetil-S-alil-L-cisteína (NAc-SAC), la N-acetil-S-alil-L-cisteína sulfóxido (NAc-SACS), la S-alil-L-cisteína sulfóxido (SACS) y la L- γ -glutamil-S-alil-L-cisteína (Amano *et al.*, 2015; 2016). La SAC se reabsorbe en el riñón, lo que contribuye a su largo tiempo de vida media en este órgano, especialmente en perros. El metabolismo, la excreción y la farmacocinética son muy similares en perros y en ratas, solo difieren en la excreción urinaria de su principal metabolito la NAc-SAC, que es menor en perros (Amano *et al.*, 2015). Los cuatro metabolitos se producen por la N-acetilación y la S-oxidación de la SAC (Figura 4). El riñón y el hígado son los órganos donde se lleva a cabo la N-acetilación de la SAC y de la desacetilación de la NAc-SAC (Amano *et al.*, 2015), mediante la N-acetil transferasa y las monohidrogenasas que contienen flavina, respectivamente (FMO, del inglés flavin-containing monohydrogenase) (Park *et al.*, 2017).

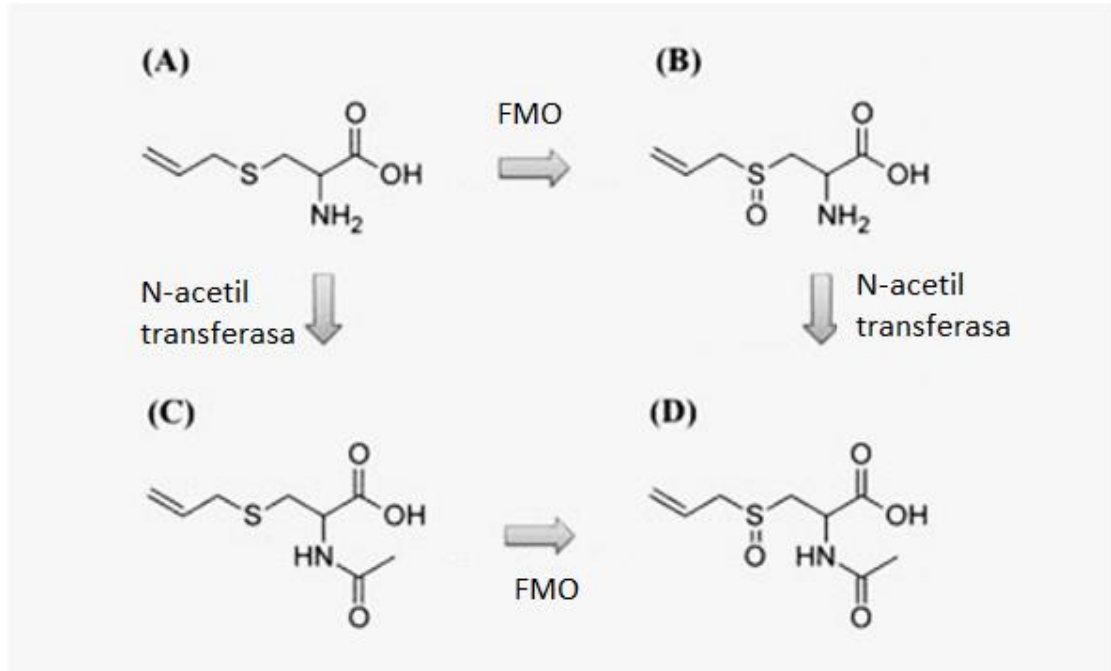


Figura 4. Metabolismo de la SAC (A) y estructura química de sus metabolitos: la S-alil-L-cisteína sulfóxido (B), la N-acetil-S-alil-L-cisteína (C) y la N-acetil-S-alil-L-cistein-sulfoxido (D). Las enzimas que llevan a cabo su metabolismo son la N-acetil transferasa y la flavín monooxigenasa (FMO) (Modificada de Park *et al.*, 2017).

En ratas después de una dosis oral de 50 mg/kg, el órgano en el que se observa una mayor concentración es en el riñón, seguido del hígado, el bazo, el corazón, el pulmón y finalmente el cerebro (Yan y Zeng, 2005).

La dosis letal media (DL₅₀) es similar a la de otros aminoácidos (Tabla 1) (Kodera *et al.*, 2002).

Tabla 1. Dosis letal 50, de la SAC

Vía	Sexo	DL ₅₀ mg/kg	
		Ratón	Rata
Intragástrica	Machos	8890	10940
	Hembras	9390	9500
Intraperitoneal	Machos	6910	3340
	Hembras	3650	3340

(Modificada de Koderá *et al.*, 2002)

Después de la administración diaria de la SAC por vía oral durante un mes, sólo se observaron los siguientes efectos negativos con dosis ≥ 500 mg/kg (Koderá *et al.*, 2002):

- Disminución del peso corporal en hembras y machos.
- Aumento del pH urinario en machos.
- Disminución de los niveles de proteínas urinarias (en hembras) y urobilinógeno (en machos). El urobilinógeno es un metabolito de la bilirrubina, generado por las bacterias intestinales que es reabsorbido. Por lo que esta información sugiere que la SAC podría tener efectos sobre la flora intestinal.
- Incremento de los niveles de glucosa en el suero de hembras, sugiriendo que la SAC induce atrofia del páncreas y disminuye la secreción de insulina. La atrofia en el tejido pancreático se observó solo en las hembras administradas con las dosis más altas de SAC (1000 mg/kg).
- Modificación de la función renal y hepática (disminución de los niveles de urea y creatinina en suero, aumento en el colesterol total, proteínas, lípidos y fosfatasa alcalina en suero) en hembras.

- Disminución del hematocrito, hemoglobina, el volumen corpuscular promedio, la hemoglobina corpuscular promedio y la concentración corpuscular de la hemoglobina en ambos géneros.

5.2 Actividad biológica

Ya se han reportado los efectos benéficos de la SAC en varios modelos experimentales preclínicos, los cuales en su mayoría se han asociado con su capacidad antioxidante, antiinflamatoria o ambas. Por ello, se ha propuesto su uso como suplemento en medios de cultivo, debido a sus propiedades antioxidantes (Dvořáková *et al.*, 2016).

Los efectos antioxidantes de la SAC se han asociado con los siguientes mecanismos (revisado en Colín-González, *et al.*, 2012):

- Su grupo tioalilo puede funcionar como nucleófilo donando fácilmente un protón, neutralizando compuestos o haciéndolos menos reactivos. Además, se ha reportado que el grupo alilo es necesario para la función biológica y atrapadora de radicales (Kodera *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2011). La SAC atrapa $O_2^{\bullet-}$ (Kim *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2003; Medina-Campos *et al.*, 2007), H_2O_2 (Ide *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 2003; Medina-Campos *et al.*, 2007), OH^{\bullet} (Kim *et al.*, 2001; Numagami y Ohnishi, 2001; Medina-Campos *et al.*, 2007), ácido hipocloroso (Medina-Campos *et al.*, 2007), 1O_2 , radical peroxilo (Maldonado *et al.*, 2011) y $ONOO^-$ (Kim *et al.*, 2001; Medina-Campos *et al.*, 2007).
- Induce enzimas antioxidantes y al factor de transcripción Nrf2 (Shi *et al.*, 2015; Franco-Enzástiga *et al.*, 2017).
- Inhibe enzimas prooxidantes como la NOS, la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la ciclooxigenasa (Kim *et al.*, 2001).
- Quela metales divalentes.

Por otro lado, los mecanismos antiinflamatorios asociados con la SAC son (revisado en Colín-González *et al.*, 2015):

- Posible inhibición del receptor tipo toll 4 (TLR4), que activa la vía de NFκB.
- Incrementa la expresión de PPARα y PPARγ (receptor de peroxisoma proliferador activado), receptores relacionados con la inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias (Mong y Yin 2012; Takemura *et al.*, 2013).
- Inhibe la vía de NFκB (regulador de la respuesta inmune), a través de la disminución de la enzima que fosforila al inhibidor de NFκB (Park *et al.*, 2014) y regula la vía de las MAP cinasas (Geng *et al.*, 1997; Mong y Yin, 2012).
- Inhibe la desacetilasa de histonas (represor de la transcripción), lo que reduce la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1β, TNFα e IFNγ.
- Regula el inflammasoma y disminuye las citocinas proinflamatorias (IL1β y TNFα).

En animales con senescencia acelerada disminuye los déficits cognitivos (Nishiyama *et al.*, 2001) y mejora la calidad del esperma (Takemura *et al.*, 2014).

En modelos de estrés restrictivo, que simula alteraciones psicológicas observadas en humanos, la SAC mejora el comportamiento, reduce el estrés oxidante a nivel sistémico y en el hipocampo (Becerril-Chávez *et al.*, 2017; Colín-González *et al.*, 2012)

En modelos de enfermedades donde la inflamación es un mecanismo importante de daño como la cistitis hemorrágica (Abdi *et al.*, 2016; Abdi *et al.*, 2018; Bhatia *et al.*, 2008), la gota (Preethi *et al.*, 2018), la atrofia muscular (Dutt *et al.*, 2018) y la inflamación intestinal (Park *et al.*, 2014), tiene actividad citoprotectora, antioxidante y disminuye la inflamación.

Adicionalmente, su actividad anticancerígena se ha observado en modelos de cáncer de ovario (Xu *et al.*, 2014; 2018), cáncer nasofaríngeo (Cho *et al.*,

2015), cáncer de próstata (Chu *et al.*, 2007), cáncer de mama (Gapter *et al.*, 2008), cáncer de boca (Pai *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2009), cáncer de pulmón (Tang *et al.*, 2010), neuroblastoma (Welch *et al.*, 1992), carcinoma hepatocelular (Ng *et al.*, 2012; Sengupta *et al.*, 2017; Sundaresan y Subramanian, 2008) y cáncer gástrico (Velmurugan y Nagini, 2005) donde promueve la muerte celular, disminuye la invasividad o modula el estrés oxidante y la inflamación.

También previene la toxicidad inducida en el oído (Uzun *et al.*, 2016), el hígado (Anandasadagopan *et al.*, 2017; Bayraktar *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2018; Hsu *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2013; Kattaia *et al.*, 2017; Kodai *et al.*, 2007; Kodai *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2008; Mizuguchi *et al.*, 2006; Mostafa *et al.*, 2000; Shinkawa *et al.*, 2009; Tsukioka *et al.*, 2017; Yan y Yin, 2007), el pulmón (Bayraktar *et al.*, 2015), el corazón (Avula *et al.*, 2014; Mostafa *et al.*, 2000), la retina (Chao *et al.*, 2014) y el riñón (Gómez-Sierra *et al.*, 2014; Magendiramani *et al.*, 2009; Maldonado *et al.*, 2003; Segoviano-Murillo *et al.*, 2008).

En modelos de diabetes inducida ha mostrado actividad antidiabética en animales adultos y neonatos (Iliya *et al.*, 2016; Lembede *et al.*, 2018; Saravanan *et al.*, 2009; Saravanan y Ponmurugan, 2011; 2012; 2013). Además disminuye la inflamación, el estrés oxidante (Sathibabu *et al.*, 2018), los niveles de ácidos grasos (Saravanan y Ponmurugan, 2010; Takemura *et al.*, 2013), el déficit cognitivo (Baluchnejadmojarad *et al.*, 2017), la disfunción en la aorta (Brahmanaidu *et al.*, 2017), la activación de la vía metabólica del sorbitol (Naidu *et al.*, 2016), las proteínas glicosiladas (Saravanan *et al.*, 2010) y otros productos de glicosilación que también se relacionan con el envejecimiento (Ahmad *et al.*, 2007).

La SAC también tiene efectos benéficos en modelos de alteración en la circulación sanguínea y en células endoteliales (Borek, 2001), previniendo el daño isquémico y aumentando la angiogénesis (Syu *et al.*, 2017). Además

previene la hipertensión (Asdaq y Inamdar, 2010; Yu *et al.*, 2012) y reduce el proceso aterogénico (Ho *et al.*, 2001).

Finalmente, la actividad neuroprotectora de la SAC se ha probado en varios modelos experimentales de isquemia cerebral, esclerosis múltiple (Escribano *et al.*, 2017; 2018), neuroinflamación (Zarezadeh *et al.*, 2017; Zeinali *et al.*, 2018), neurotoxicidad (Elinos-Calderón *et al.*, 2010; García *et al.*, 2010; Herrera-Mundo *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2003; Pérez-Severiano *et al.*, 2004) la enfermedad de Parkinson (Denzer *et al.*, 2016; García *et al.*, 2014; Kosuge *et al.*, 2003; Pérez-Severiano *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2011), Alzheimer (Javed *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011) y Huntington (Elinos-Calderón *et al.*, 2010; Herrera-Mundo *et al.*, 2006; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2006). Además de su efecto neuroprotector también se ha reportado que tiene actividad neurotrófica (Kodera *et al.*, 2002).

Particularmente en la IR se ha probado su efecto protector en varios modelos. Los primeros en reportar el efecto protector de la SAC fueron Numagami y colaboradores en 1996 y 2001. Los modelos que usaron fueron los de isquemia cerebral focal (ligación permanente de la arteria cerebral media) e isquemia global (oclusión bilateral de la arteria carótida común, por 1 h). En ambos estudios la SAC (100, 300 y 600 mg/kg) se administró 30 min antes de la isquemia. En el modelo de isquemia focal, la SAC disminuyó el contenido de agua en el hemisferio dañado y el área de infarto, siendo la dosis de 300 mg/kg la que mostro el mayor efecto. Mientras que en el modelo de isquemia global la SAC disminuyó la cantidad de EROs después de la reperfusión (Numagai *et al.*, 1996; Numagami y Ohnishi, 2001).

Posteriormente, se evaluó el efecto de la SAC en dos modelos (isquemia cerebral global e isquemia cerebral transitoria), en ambos casos se administró una sola dosis de 300 mg/kg antes de la isquemia o dos dosis, antes de la isquemia y después de la reperfusión. La SAC disminuyó el área de infarto, el estrés oxidante y la muerte neuronal, así como la activación de ERK (cinasa regulada por señales extracelulares). En este trabajo, el efecto de la SAC se

relacionó con su capacidad para actuar directamente sobre ERK (Kim *et al.*, 2006).

Por otro lado, en el modelo de la oclusión de la arteria cerebral media, la SAC (300 mg/kg) se administró 2 veces: 15 min antes de la oclusión y 2 h después de la oclusión. La SAC mejoró el déficit neurológico y restauró los niveles de ATP, glutatión y la actividad de los complejos mitocondriales. Además, disminuyó el edema, los niveles de lipoperoxidación, proteínas carboniladas y el contenido de H₂O₂ (Atif *et al.*, 2009).

De igual manera en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas sometidas a 3 h de isquemia y 24 h de reperfusión, fueron administradas con SAC (100 mg/kg) 30 min antes de la isquemia y a las 0, 6 y 12 h de reperfusión. Tras este esquema de administración, la SAC disminuyó el volumen de la lesión, el estrés oxidante y la pérdida neuronal y mejoró el déficit neurológico (Ashafaq *et al.*, 2012).

El efecto protector de la SAC en la IR cerebral podría estar relacionado con la activación del factor Nrf2. Shi y colaboradores (2015), evaluaron en cultivos de neuronas y ratones, el efecto de la SAC sobre los niveles de Nrf2. El tratamiento con SAC aumentó los niveles de Nrf2 y los niveles de genes de proteínas antioxidantes. Por otro lado, en animales *knockout* para Nrf2^{-/-} sometidos a la oclusión de la arteria cerebral media, el tratamiento con SAC disminuyó el efecto protector observado en los animales Nrf2^{+/+}. En este estudio la dosis de SAC que utilizó fue de 300 mg/kg administrada 30 min antes de la isquemia (Shi *et al.*, 2015).

Adicionalmente, en el modelo de la oclusión de la arteria cerebral media se reportó que la SAC inhibe directamente la activación de ERK y disminuye la muerte celular causada por excitotoxicidad (Kim *et al.*, 2006a)

En ratas hipertensas propensas a eventos isquémicos, la SAC disminuyó la mortalidad y la pérdida de las funciones motoras, así como el daño histológico asociado con la isquemia (Kim *et al.*, 2006b).

Además de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la SAC, se ha reportado que puede modular diferentes tipos de muerte celular como la apoptosis (Orozco-Ibarra *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2014; 2018), la autofagia (Wu *et al.*, 2018) y la necroptosis (Sengupta *et al.*, 2017).

En cuanto al efecto de la SAC sobre la necroptosis, se empleó un tratamiento de SAC y la berberina y se evaluó la necroptosis y la apoptosis en células cancerígenas. Ambos compuestos indujeron la muerte por necroptosis y apoptosis en las células, a través de la regulación de la vía adenilato ciclasa-AMP cíclico-proteína cinasa A (Sengupta *et al.*, 2017).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La EVC de tipo isquémico es una de las principales causas de muerte y demencia en el adulto mayor tanto en México como a nivel mundial. Actualmente no existe un tratamiento efectivo para disminuir las secuelas que se presentan en los pacientes que han sufrido una EVC de tipo isquémico, por lo que es importante la búsqueda de blancos y estrategias terapéuticas. Para poder desarrollar terapias en este padecimiento, es necesario tomar en cuenta los eventos que se desencadenan después de la IR, los cuales culminarán en la muerte celular. Entre los tipos de muerte celular que se presentan después de la IR se encuentra la necroptosis, la cual depende del aumento y activación de la proteína RIP3.

Ya se ha reportado una relación entre la necroptosis con la inflamación y el estrés oxidante, ya que al disminuir estas condiciones se observa un menor número de células que muere por necroptosis.

Por ello, el uso de un compuesto con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias podría tener efecto sobre la necroptosis. En este contexto la administración previa de la SAC en modelos de EVC disminuye las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por la IR, lo cual se ha relacionado con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Así el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración post isquemia de SAC sobre los niveles de RIP3 en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media.

V. HIPÓTESIS

Si existe una relación causal entre la necroptosis y el estrés oxidante y la inflamación, entonces el tratamiento con SAC (un compuesto con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias) disminuirá el aumento de los niveles de RIP3 (un marcador de necroptosis, debido a que participa en la formación del necrosoma) en un modelo de IR cerebral.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de la SAC, sobre los niveles de RIP3 (un marcador de necroptosis) en un modelo de IR cerebral.

2. Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la administración post isquemia de la SAC en animales sometidos a 1 h de isquemia y 48 h de reperfusión (IR) sobre:

- El déficit motor.
- El daño histológico cuantificando el número de células dañadas (tinción de hematoxilina y eosina).
- El número de células en neurodegeneración (tinción de fluoro-jade B).
- Los niveles de RIP3 (inmunohistoquímica).
- Los niveles de daño oxidante NOS1 y 8-OHdG marcadores de daño oxidante (inmunohistoquímica).
- Los niveles de p65 marcador de inflamación (inmunohistoquímica).

VI. MÉTODOS

1. Reactivos y anticuerpos usados

Los reactivos utilizados para la síntesis de la SAC fueron clorhidrato de L-cisteína monohidratada, bromuro de alilo, etanol y sodio metálico de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Para la cuantificación de las células en neurodegeneración el fluoro-jade B (FJ-B) se obtuvo de Millipore (Bedford, MA, USA). El anticuerpo anti-RIP3 (ab62344) se obtuvo de Abcam (Cambridge, MA, USA) y los anticuerpos anti-8-OHdG (sc-39387), anti-p65 (sc-7151) y anti-NOS1 (sc-8309) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, USA).

2. Síntesis de la SAC

La SAC se obtuvo por síntesis química mediante la reacción entre la L-cisteína y el bromuro de alilo en etanol absoluto y sodio metálico.

Esta síntesis se llevó a cabo en un matraz de bola, en el que se colocaron 10.5 g de clorhidrato de L-cisteína monohidratada y 180 mL de etanol absoluto bajo condiciones de agitación constante. Al transcurrir 10 min se adicionaron 5.42 g de sodio metálico en hojuelas manteniendo una agitación vigorosa por 30 min a partir de la disolución total de sodio. A continuación, se añadieron 5.4 mL de bromuro de alilo y la mezcla se mantuvo con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se agregó agua fría (50 mL) y se continuó con la agitación durante 1 h. El etanol se evaporó por destilación y posteriormente se adicionaron 5.0 mL de ácido acético (pH final de 5.6). El precipitado blanco formado se filtró al vacío y se dejó secar. Al compuesto obtenido se le midió el punto de fusión en un aparato Fisher-Johns y se comparó con el reportado de 223.3-223.6 °C (Kodera *et al.*, 2002).

3. Animales

Se usaron 45 ratas macho Wistar con un peso inicial de 280-320 g, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con libre acceso a la comida y al agua, y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y luz (ciclos de 12 h de luz/12 h oscuridad). Durante los experimentos se hicieron los esfuerzos por minimizar el sufrimiento de los animales. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, proyecto 15/18. Los animales fueron utilizados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA 2-2002 y la NOM-062-ZOO-1999-SAGARPA.

4. Diseño experimental

Los animales se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos (SHAM n=9; IR n=18; IR+SAC n=18):

- SHAM, animales sometidos al procedimiento de la cirugía sin la oclusión de la arteria cerebral media.
- IR, animales sometidos a la oclusión de la arteria cerebral media durante 1 h (isquemia) y 48 de reperusión.
- IR+SAC, animales sometidos a IR y tratados con SAC.

La SAC se administró en una dosis de 100 mg/kg vía intraperitoneal, al inicio de la reperusión y 24 h después. Los animales del grupo SHAM e IR recibieron SSI (solución salina isotónica) en el mismo esquema.

Transcurridas las 48 h de reperusión se midió el déficit motor justo antes del sacrificio. Después se obtuvo el cerebro completo para evaluar el daño morfológico, la neurodegeneración y los niveles de RIP3 (marcador de necroptosis), NOS1 y 8OHdG (marcadores de estrés oxidante) y p65 (marcador de inflamación).

5. Oclusión de la arteria cerebral media

Para inducir la anestesia, los animales se colocaron en una cámara de anestesia regulando el vaporizador al 4-5% de isoflorano y flujo de oxígeno a (0.5-1.0 L/min). Para mantener la anestesia se reguló el vaporizador a 1-2% de isoflorano y oxígeno al 100% manteniendo el mismo flujo de oxígeno. Se colocó el animal en posición de cúbito supino, se rasuro y se limpió el cuello. Usando un microscopio de disección, se hizo una incisión en la que se expuso la arteria carótida común, la arteria carótida externa y la carótida interna. Se cerró la arteria carótida externa cauterizando, se colocó una pinza antes de la bifurcación en la arteria carótida común y se introdujo un filamento por la arteria carótida común hasta la arteria carótida interna, el filamento entró hasta la arteria cerebral media en donde se dejó por 1 h, transcurrido el tiempo se retiró el filamento, para inducir la reperusión que duró 48 h.

6. Evaluación del déficit motor

Se evaluó mediante 5 pruebas:

- Movilidad espontánea: el animal se colocó sobre una superficie plana, sin daño el animal debe iniciar la exploración antes de 3 s.
- Reflejo de agarrar: el animal se sostuvo de la cola y se aproximó a un cable; sin daño el animal se sostiene del cable con ambas patas delanteras de manera simultánea, con daño no lo puede hacer.
- Barra horizontal: se colocaron las patas delanteras de la rata sobre un cable; sin daño el animal se sujeta por más de 3 s, con daño no lo puede hacer.
- Flexión de la pata contralateral a la lesión: el animal se sostuvo por la cola y se levantó de la mesa; sin daño el animal extiende ambas patas, con daño los animales flexionan la pata contralateral a la lesión.
- Giros contralaterales. Se sostuvo el animal por la cola sobre una superficie plana elevando solo las patas traseras; sin daño los animales

caminan hacia adelante, con daño los animales se desplazaban dando giros contralaterales a la lesión.

A cada prueba se le asignó un valor de 0 si el comportamiento fue normal y un valor de 1 si la conducta estuvo alterada.

7. Muestras

Después de 48 h de reperusión, los animales se sacrificaron administrando por vía intraperitoneal pentobarbital sódico (120 mg/kg). Posteriormente, se perfundieron con 250 mL de SSI 0.9% fría con heparina (5 UI/L), seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% en amortiguador PBS. Los cerebros se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 h y se incluyeron en parafina.

Para la inclusión, en los tratamientos que se muestran en la Tabla 2, los órganos se colocaron en casetes, manteniendo una agitación constante:

Tabla 2. Tratamientos para la inclusión del tejido.

Tratamiento	Duración.
Agua corriente	15 min
Alcohol 60 %	30 min
Alcohol 70 %	30 min
Alcohol 80 %	30 min
Alcohol 96 % (1)	30 min
Alcohol 96 % (2)	30 min
Alcohol 100 % (1)	30 min
Alcohol 100 % (2)	24 h
Alcohol-xilol	30 min
Xilol (1)	30 min
Xilol (2)	30 min
Parafina (1)	1 h
Parafina (2)	1 h

Después de pasar los casetes por parafina (2), los cerebros se colocaron en moldes que se llenaron de parafina, al enfriarse los bloques se obtuvieron cortes de 5 μ m que se fijaron en portaobjetos.

8. Tinción de hematoxilina y eosina

Los cortes se desparafinaron con xilol por 1 h y se pasaron por soluciones de alcohol-xilol, alcohol al 100%, alcohol 96 % y agua destilada por 3 min cada uno. Se tiñeron con hematoxilina, se lavaron con agua y se viró la hematoxilina con carbonato de litio al 1 %. Después se pasaron por etanol al 70 % y se tiñeron con eosina. Posteriormente, se pasaron por soluciones de alcohol 70%, alcohol 96%, alcohol 100%, alcohol-xilol y finalmente en xilol. Posteriormente se montaron con resina y se observaron en el microscopio.

Los resultados se expresan como porcentaje de células dañadas por campo.

9. Tinción de fluoro-jade B (FJB)

Los cortes se desparafinaron con xilol por 15 min y se metieron en alcohol al 100% 2 veces. Se sumergieron 5 min en una solución de NaOH 10% y alcohol 80%, 2 min en alcohol al 70%, 2 min en agua destilada y en oscuridad se colocaron en una solución de permanganato de potasio 0.06% por 10 min, se lavaron en agua destilada por 2 min y se colocaron en una solución de FJB 0.0004% y ácido acético 0.1% por 20 min. Finalmente, se lavaron en agua destilada por 2 min y se hicieron 3 lavados con agua destilada de 1 min cada uno, se dejaron secar y se montaron con resina para observarlos en el microscopio. Los resultados se expresan como células positivas a FJB por campo.

10. Inmunohistoquímicas

Los cortes se desparafinaron con xilol y se hidrataron con lavados de alcohol en concentraciones decrecientes hasta llegar a agua destilada, después se colocaron durante 1 h en una solución de PBS con Tritón X-100 0.2% y 1 h en una solución de citrato de sodio 5% con Tritón X-100 0.2% para

desenmascarar el antígeno. Se inactivó la peroxidasa endógena con H₂O₂, los cortes se incubaron con los anticuerpos anti-RIP3 (1:200), anti-NOS1 (1:50), anti-8-OHdG (1:50) o anti p65 (1:50) durante 24 h. Posteriormente, se incubaron con el kit de anticuerpo secundario universal y estreptavidina-peroxidasa (Kit Dako K0690). Los cortes se revelaron con 3,3-diaminobencidina (Kit Dako K3468), se contrastaron con hematoxilina y se montaron con una resina. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas por campo.

11. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. Se realizó una prueba de ANOVA, seguida de una prueba Tukey, usando el software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de $P > 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

1. La SAC previene el déficit motor inducido por la IR

La SAC ha mostrado tener un efecto neuroprotector, disminuyendo el déficit motor en el modelo de la oclusión de la arteria cerebral media, con diferentes tiempos de oclusión y esquemas de administración, por lo que se evaluó el efecto de un tiempo de oclusión y esquema de administración distinto a los reportados en otros experimentos anteriormente.

La Figura 5 muestra la evaluación del daño motor a las 48 h después del inicio de la reperusión. El grupo IR mostró una mayor puntuación comparado con el grupo SHAM, mientras que el tratamiento con SAC previno parcialmente este aumento.

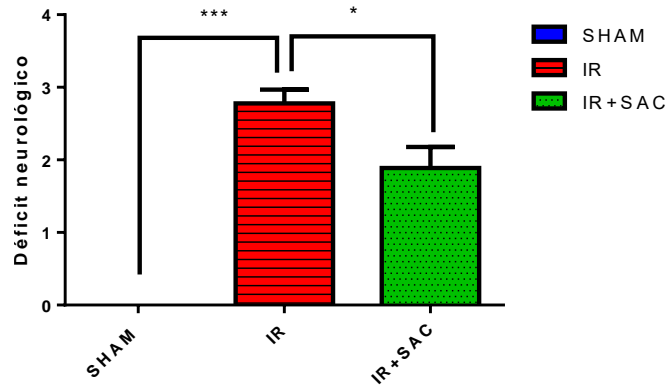


Figura 5. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre el daño motor inducido por 1 h de isquemia y 48 h de reperusión (IR). La SAC se administró por vía intragástrica, al inicio de la reperusión y a las 24 h de reperusión. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. El número de animales por grupo fue: SHAM (9), IR (18) e IR+SAC (18). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

2. La SAC previene el daño morfológico inducido la IR

Además del daño motor se cuantificó el daño histológico usando la tinción de hematoxilina y eosina y el número de células en neurodegeneración usando la tinción de fluoro-jade B, para correlacionar el efecto protector observado en la cuantificación del déficit motor.

La cuantificación del daño histológico, las células en neurodegeneración y las células positivas en las inmunohistoquímicas se llevó a cabo en la corteza y el estriado, debido a que esta zona es una zona de transición entre el foco isquémico y la zona de penumbra (Figura 6).

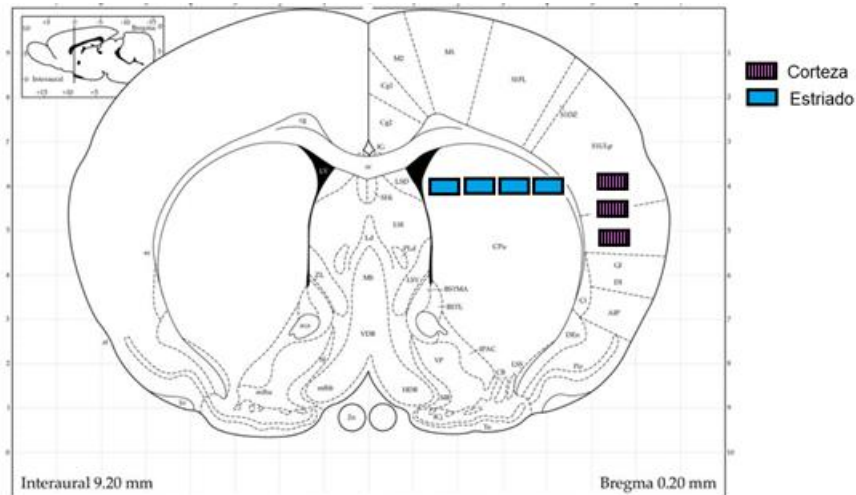


Figura 6. Corte coronal que muestra las áreas donde se tomaron las fotografías para evaluar el daño histológico y el número de células positivas en las inmunohistoquímicas en los 3 grupos estudiados. Se tomaron 3 fotos en la corteza y 4 fotos en el estriado.

Los grupos SHAM mostraron una estructura sana en el estriado y la corteza (Figura 7A). Mientras que los grupos con IR muestran daño morfológico, caracterizado por un aumento de la afinidad por la eosina (eosinofílicas) y por la disminución del tamaño de los núcleos teñidos con mayor intensidad por la hematoxilina (picnosis). El grupo IR mostró un 80% de daño tanto en estriado como en corteza comparado con el grupo SHAM. Dicho aumento fue disminuido parcialmente con el tratamiento con SAC (Figura 7B).

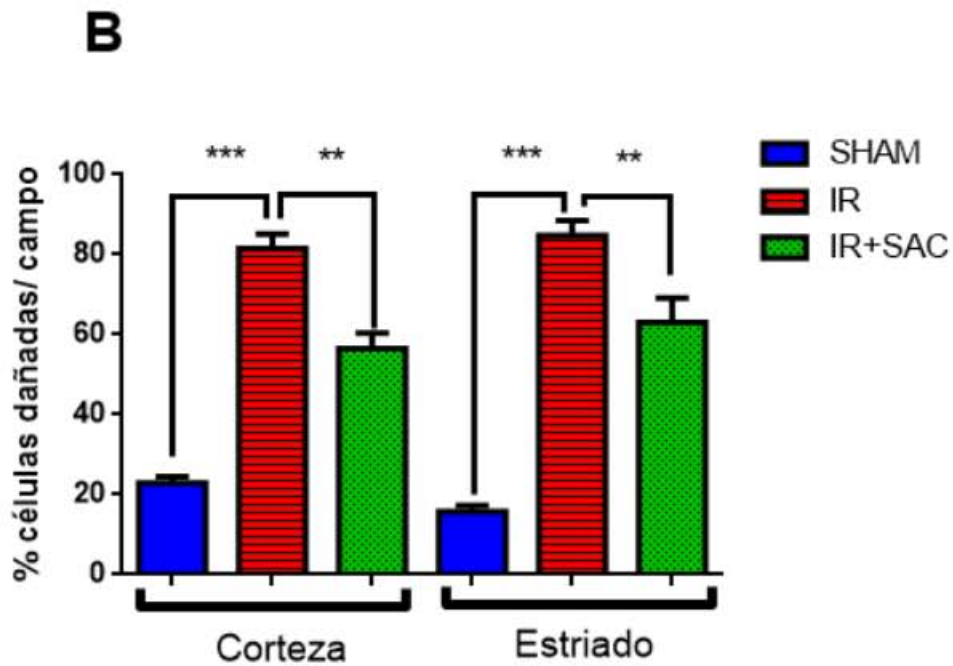
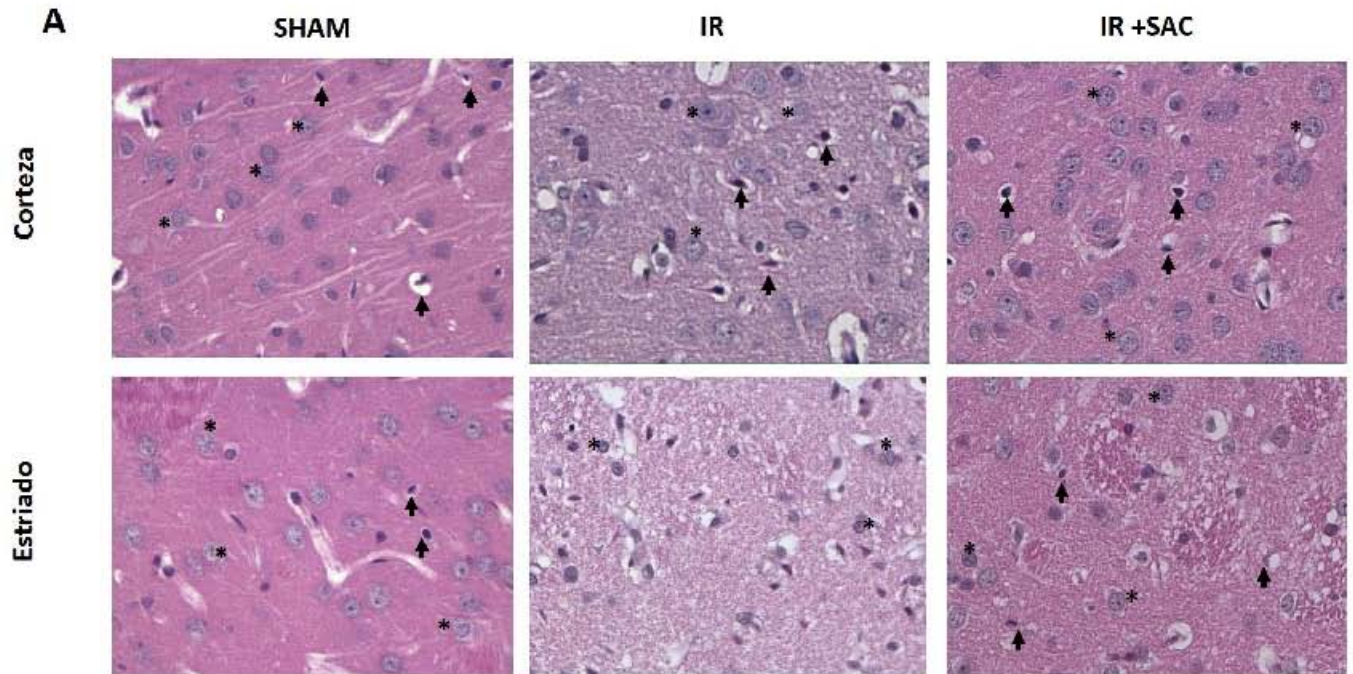
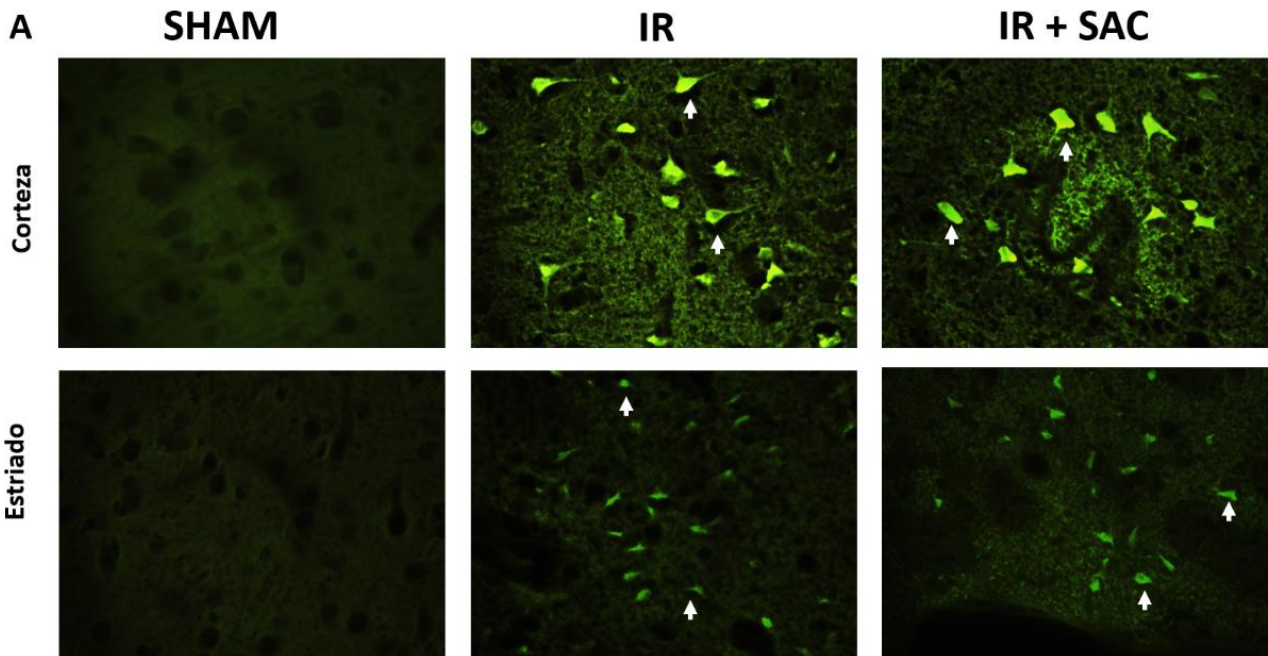


Figura 7. Efecto de la S-allicisteína (SAC) sobre el daño morfológico inducido por 1 h de isquemia y 48 de reperusión (IR). **(A)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina de la corteza y el estriado. En el grupo IR se muestran células con daño como picnosis (flechas) y células sin daño morfológico (asteriscos). **(B)** Gráfica que muestra el porcentaje de células dañadas en la corteza y el estriado.

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. El número de animales por grupo fue: SHAM (3), IR (8), IR+SAC (6).

3. La SAC previene la neurodegeneración inducida por la IR

La tinción con fluoro-jade B como daño isquémico evidencia a las células que están en neurodegeneración, ya que se ha propuesto que se una a poliaminas que se expresan en la muerte celular, por lo que se realizó el conteo del número de células positivas (verdes) caracterizadas por la emisión de fluorescencia (Figura 8A), esta tinción marca las células que están en proceso de neurodegeneración. Los animales sometidos a IR mostraron un mayor número de células positivas en la corteza y el estriado, comparados con el grupo SHAM; mientras que el tratamiento con SAC previno el aumento del número de células positivas inducidos por la IR (Figura 8B).



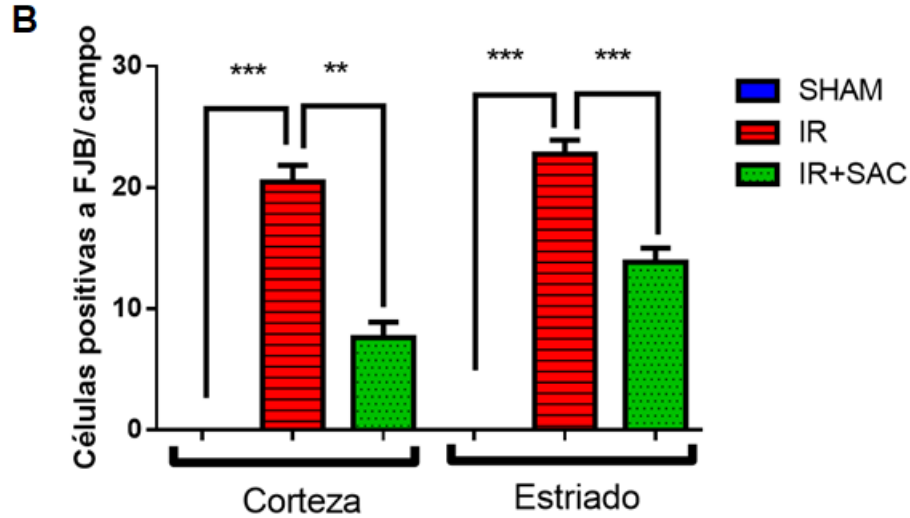


Figura 8. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre el número de células en neurodegeneración inducido por 1 h de isquemia y 48 h de reperfusión (IR). **(A)** Imágenes representativas de la tinción con fluoro-jade B (FJB) de la corteza y el estriado. Se muestran las células positivas a FJB (flechas). **(B)** Gráfica que muestra el número de células en neurodegeneración en la corteza y el estriado. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. El número de animales por grupo fue: SHAM (2), IR (11), IR+SAC (12).

4. La SAC previene el aumento de la necroptosis inducida por la IR

Después de corroborar el efecto protector de la SAC, se cuantificaron el número de células positivas a RIP3, para saber si el efecto protector ejercido por la SAC estaba relacionado con el número de células que mueren por necroptosis. Animales sometidos a IR mostraron un mayor porcentaje de células positivas (color café) a RIP3 comparados con el grupo SHAM en ambas regiones estudiadas (Figura 9A). El tratamiento con SAC previno el aumento del porcentaje de RIP3 en la corteza y el estriado (Figura 9B).

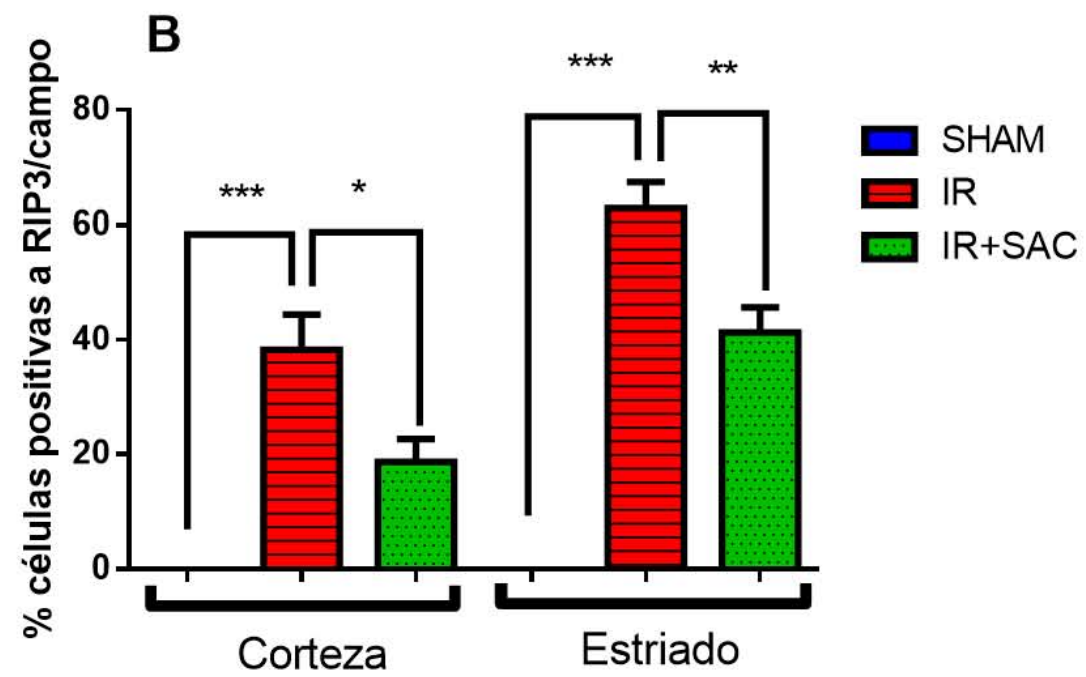
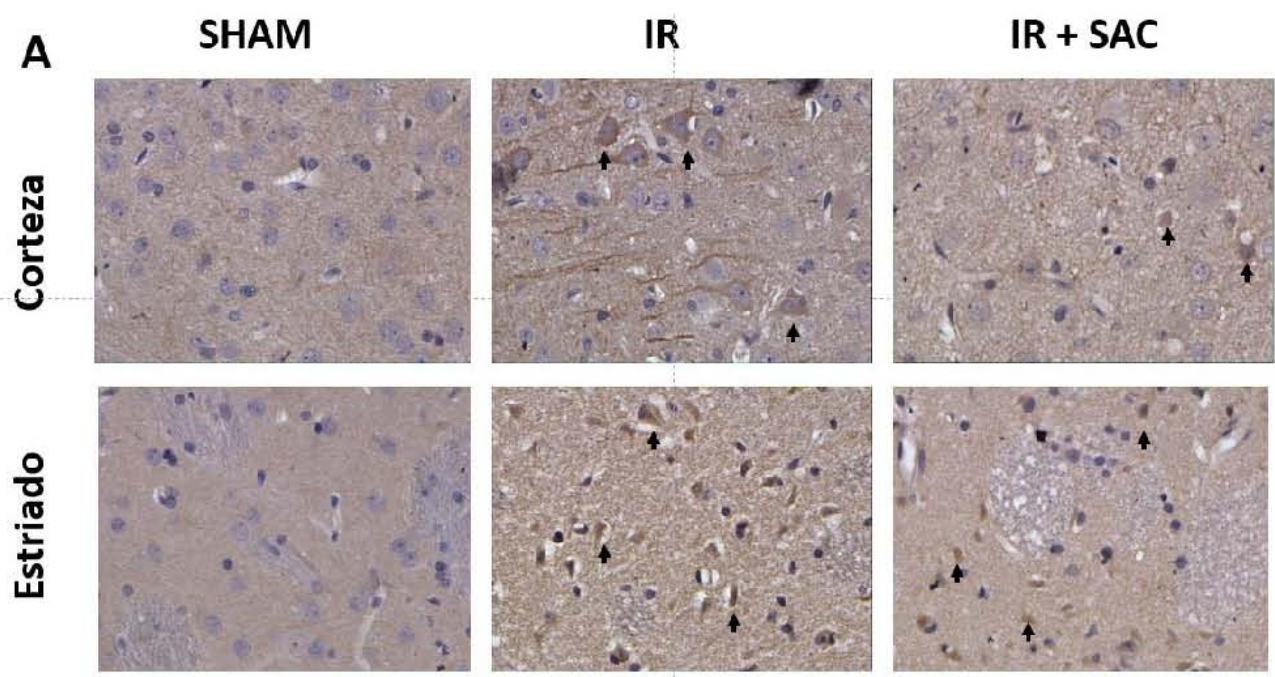
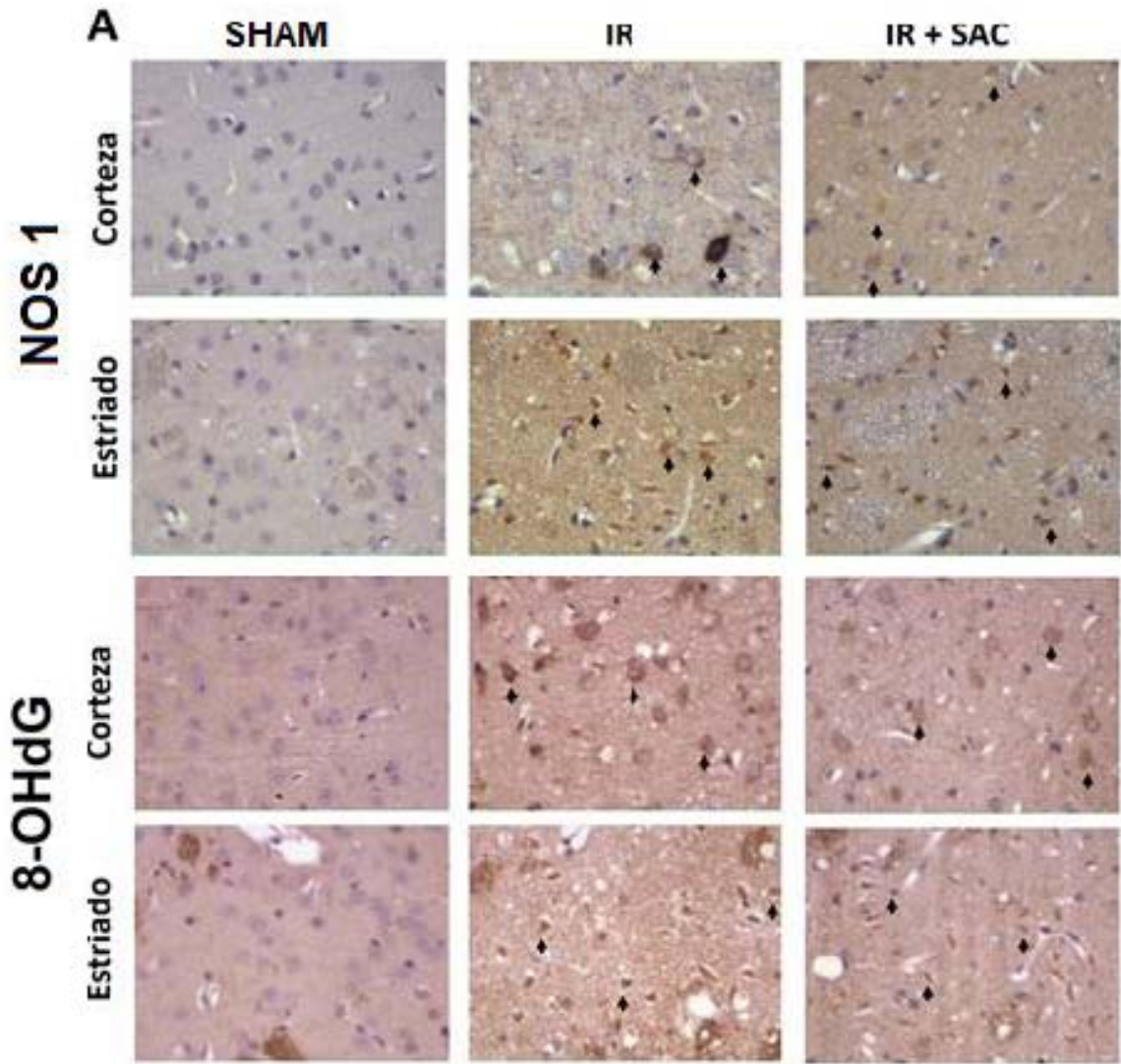


Figura 9. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre los niveles de la proteína RIP3 después de 1 h de isquemia y 48 de reperfundición (IR). **(A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de RIP3, en la corteza y el estriado. Se muestran las células positivas en color café (flechas). **(B)** Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a RIP3 por campo. Los resultados se muestran como la media \pm el

error estándar de la media. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. El número de animales por grupo fue: SHAM (3), IR (7), IR+SAC (8).

5. La SAC previene el estrés oxidante inducido por la IR

Debido a que se ha relacionado el aumento del estrés oxidante como causa y resultado de la necroptosis, se cuantificaron dos marcadores de estrés oxidante: la enzima NOS1, relacionada con la producción de EROs y el marcador de daño oxidante a DNA la 8OH-dG. Los animales sometidos a IR muestran un mayor porcentaje de células positivas (color café) a NOS1 solo en el estriado. Por otro lado, los animales sometidos a la IR tienen un mayor porcentaje de células positivas a 8OH-dG en la corteza y el estriado comparados con el grupo SHAM (Figura 10A). El tratamiento con SAC disminuyó el porcentaje de células positivas a NOS1 y 8-OHdG en ambas regiones (Figura 10B).



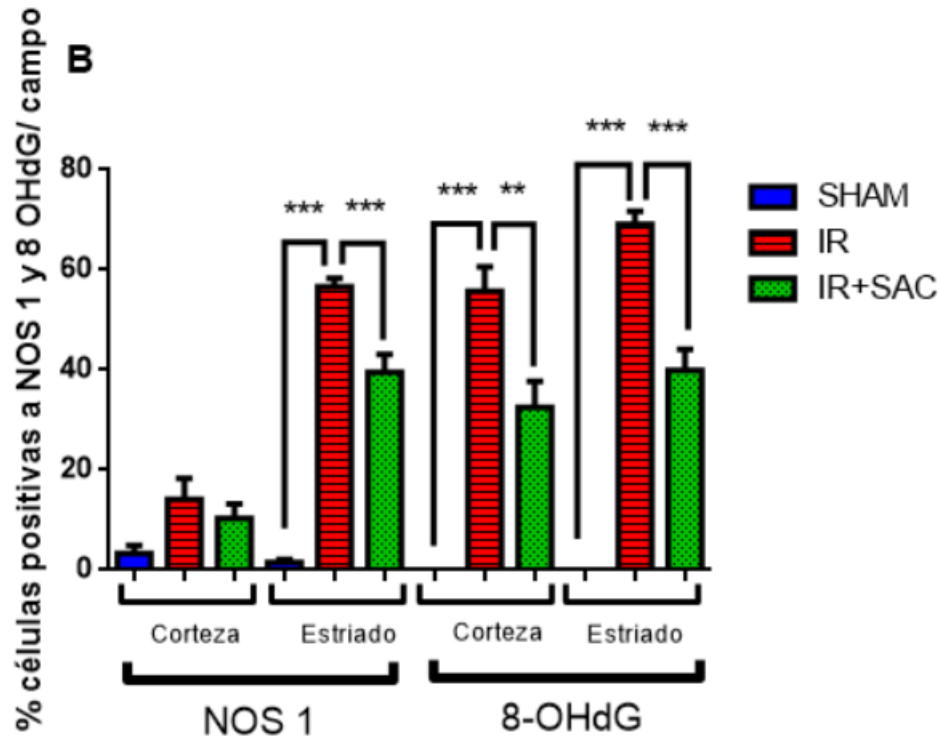


Figura 10. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre dos marcadores de estrés oxidante (NOS1: sintasa de óxido nítrico y 8-OHdG: 8 hidroxiguanosina) después de 1 h de isquemia y 48 h de reperfusión (IR). **(A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra NOS1 y 8-OHdG en la corteza y el estriado. Se muestran células positivas en color café (flechas). **(B)** Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a NOS1 y 8-OHdG por campo en la corteza y el estriado. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. *** p <0.001, ** p <0.01. El número de animales para NOS1 por grupo fue: SHAM (3), IR e IR+SAC (8); y para 8-OHdG: SHAM (3), IR e IR+SAC (9).

6. La SAC previene la inflamación inducida por la IR

Además del estrés oxidante también se ha relacionado la inflamación con la necroptosis y, siendo la inflamación un blanco terapéutico de la SAC, se cuantificó p65 como marcador de inflamación. A continuación, se muestran imágenes representativas de la corteza y el estriado mostrando células positivas a p65 (Figura 11A). Los animales sometidos a IR mostraron mayor porcentaje de células positivas a p65 en la corteza y el estriado comparados con el grupo SHAM; el tratamiento con SAC disminuyó parcialmente el porcentaje de células positivas en ambas regiones (Figura 11B).

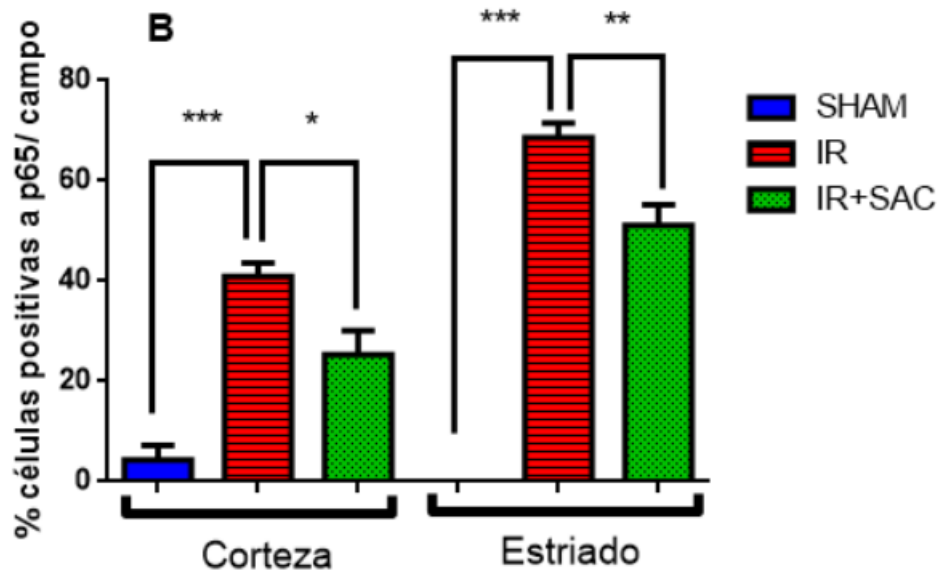
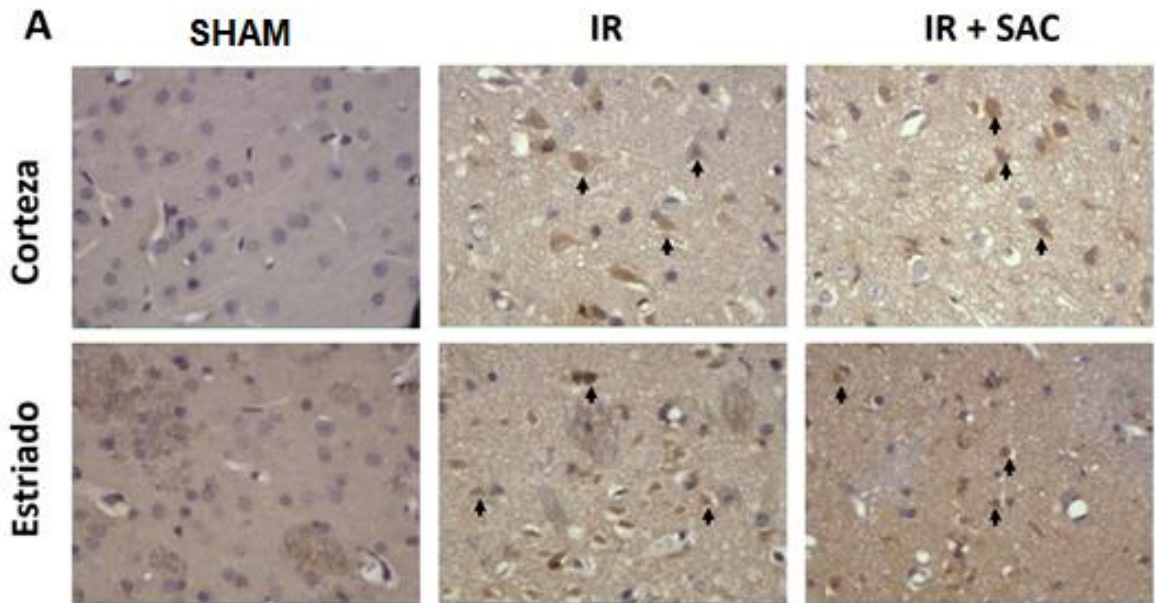


Figura 11. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre los niveles de p65 después de 1 h de isquemia y 48 de reperusión (IR). **(A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica hacia p65 en la corteza y el estriado. Se marcan células positivas en color café (flechas). **(B)** Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas por campo en la corteza y el estriado. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. El número de animales por grupo fue: SHAM (3), IR e IR+SAC (8).

VIII. DISCUSIÓN

La EVC de tipo isquémico afecta a una gran parte de la población adulta (Rivera-Nava *et al.*, 2012) y sus consecuencias van desde la discapacidad hasta la muerte (Arauz y Ruíz-Franco, 2012). Los riesgos (como obesidad, diabetes, etc.) asociados a esta enfermedad son actualmente los principales problemas de salud a nivel mundial (Góngora-Rivera, 2015). Aunque esta enfermedad se presentaba en personas mayores de 65 años, en la última década la incidencia de este padecimiento en adultos que tienen entre 20 y 64 años ha aumentado un 25%, y se sugiere que este aumento pudiera ser consecuencia del aumento en los factores de riesgo a edades más tempranas (Katan y Luft, 2018; Maaijwee *et al.*, 2014). Tomando en cuenta lo anterior y ya que se espera que el porcentaje de personas mayores a nivel mundial aumente, es probable que también aumente el número de personas afectadas por la EVC de tipo isquémico.

Actualmente, solo existe un tratamiento aprobado por la FDA para la EVC de tipo isquémico; pero no todas las personas son candidatas para recibir este tratamiento, debido a los criterios de exclusión y a la limitada ventana terapéutica de este tratamiento, por lo que solo un 5% de los pacientes que sufren EVC reciben este tratamiento. Por ello, es importante la búsqueda de otras alternativas terapéuticas que puedan ayudar a los pacientes que han sufrido una EVC de tipo isquémico. Varias moléculas en estudios preclínicos han mostrado efectos terapéuticos benéficos; sin embargo, esta eficacia no se ha alcanzado en estudios clínicos (Roleira *et al.*, 2012). En este sentido, la búsqueda de nuevos tratamientos implica conocer mejor la fisiopatología de esta enfermedad a nivel molecular. Se sabe que en la IR se activan varios mecanismos de daño que incluyen la excitotoxicidad, el estrés oxidante, la inflamación y la muerte celular, como la necroptosis (Jun-Long *et al.*, 2018).

La SAC es un aminoácido organosulfurado que ha mostrado un efecto protector en varios modelos experimentales, incluyendo la isquemia cerebral,

dicho efecto se ha atribuido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (revisado en Colín-González *et al.*, 2012; 2015).

Numagami y colaboradores en 1996 y 2001 llevaron a cabo los primeros trabajos en los que se habla sobre el efecto protector de la SAC, en el modelo oclusión de la arteria cerebral media y en la oclusión de la arteria carótida común por 1 h y 3 días de reperusión. Ellos probaron tres dosis de SAC 100, 300 y 600 mg/kg, administradas 30 min antes del inicio de la isquemia por vía intraperitoneal. El efecto protector (disminución del contenido de agua debido a la isquemia) más significativo lo observaron con la dosis de 300 mg/kg.

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media es diferente al anterior debido a que el procedimiento sobre la arteria cerebral media es temporal y se lleva a cabo mediante la introducción de un filamento de nylon (Morris *et al.*, 2016). Usando este modelo, los animales fueron administrados con 300 mg/kg de SAC justo antes de iniciar la isquemia, que tuvo una duración de 2 h, y al inicio de la reperusión que duró 22 h, observando una disminución en el área de infarto y en el daño sobre los complejos mitocondriales causados por la IR en el hipocampo (Kim *et al.*, 2006; Atif *et al.*, 2009). Posteriormente, Ashafaq y colaboradores (2012) modificaron el esquema de administración, usando cuatro dosis de SAC de 100 mg/kg por vía intraperitoneal antes de la isquemia (2 h) y a las 0, 6 y 12 h después del inicio de la reperusión (22 h). Con este nuevo esquema, la SAC redujo el volumen de la lesión, mejoró el déficit neurológico, disminuyó el estrés oxidante y la pérdida neuronal.

Como se puede ver en las figuras 5 y 7, en el presente trabajo se corroboró el efecto protector de la SAC, ya que se observó disminución del déficit motor y del porcentaje de células con daño en las regiones de la corteza y el estriado. La diferencia con los trabajos anteriores fue el esquema de administración de la SAC, ésta se administró al inicio de la reperusión y se dio una segunda dosis 24 h después del inicio de la reperusión (que duró 48 h). Adicionalmente, se realizó la tinción de fluoro-jade B (figura 8) como marcador de daño isquémico, ya que esta tinción evidencia a las células que

están en neurodegeneración (Butler *et al.*, 2002). Aunque el mecanismo de acción del fluoro-jade B no se conoce con exactitud, se ha propuesto que se une a poliaminas que se expresan en la muerte celular, como la espermidina, la putrecina y la cadaverina (Shmued y Hopkins, 2000). Desde que ocurre el evento isquémico, aumenta el tamaño de la lesión inicial, causando a su vez que un mayor número de células entren en neurodegeneración (Liu *et al.*, 2009); por lo tanto, células positivas a fluoro-jade B, se pueden observar desde las 24 h y hasta los 3 días de reperfusión (Liu *et al.*, 2009). En la cuantificación que se realizó a las 48 h, se observó un mayor número de células positivas en el grupo IR comparado con el grupo IR+SAC por lo que el daño en el tejido fue menor debido a la presencia de la SAC (figura 8).

Una vez corroborado el efecto protector de la SAC (figuras 5, 7 y 8) se realizó la cuantificación de las células positivas a la proteína RIP3, en la corteza y el estriado en la zona de penumbra. Nuestros resultados después de 1 h de isquemia y 48 h de reperfusión, los niveles de RIP3 están incrementados en la corteza y el estriado (figura 9). Dicho aumento fue prevenido por el tratamiento con SAC en ambas regiones, sugiriendo que parte del efecto protector de la SAC en la corteza y el estriado podría estar relacionado con la disminución de la necroptosis.

La muerte por necroptosis se identificó por primera vez por Degterev *et al.* (2005) en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media, ya que esta podía inhibirse con el uso de la necrostatina-1, lo que daba como resultado una disminución del área de infarto y prevenía el déficit cognitivo provocado por la IR. La necroptosis ya se ha reportado después del daño por isquemia en otros órganos (Zhou y Yuan, 2014) y en otras enfermedades neurodegenerativas (Chen *et al.*, 2014).

En la isquemia cerebral, la necroptosis se ha logrado observar desde las 6 h y hasta las 72 h de reperfusión (Dong *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018). A nivel molecular la necroptosis depende de la activación de la proteína RIP3 (Galluzi *et al.*, 2018) y se ha reportado que la expresión de RIP3 aumenta después de

la oclusión de la arteria cerebral media, y continúa incrementándose hasta las 72 h de reperfusión, en la corteza (Dong *et al.*, 2016).

Además de la necrostatina-1, pocas moléculas se han asociado con la inhibición de la necroptosis en la isquemia cerebral. Entre ellas está el Ponatinib, un inhibidor de la actividad de las cinasas RIP1 y RIP3. Al combinar esta molécula con un inhibidor de la apoptosis, se disminuyó el área de infarto causada por la 2 h de isquemia y 24 h de reperfusión en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media. En este estudio la inhibición de la necroptosis y la apoptosis se observó por la disminución de la proteína RIP3 y las caspasas 3 y 8, respectivamente. El mayor efecto se observó cuando se administran ambos compuestos (Tian *et al.*, 2018).

Por otro lado, la molécula ex527 (un inhibidor de una desacetilasa que regula la inflamación, el metabolismo y la muerte neuronal después de la isquemia cerebral) en combinación con la necrostatina-1, disminuyó los niveles de RIP3 y MLKL (moléculas reguladoras de la necroptosis) a las 24 h en la corteza y el hipocampo, después de una isquemia de 1 h (Nikseresht *et al.*, 2018).

Además, el β -cariofileno (que se encuentra en el aceite esencial de varias plantas y especies) disminuyó el volumen de infarto y mejoró el déficit neurológico, efecto que se atribuyó a que inhibe la inflamación y la muerte por necroptosis causadas por la IR en cerebro completo y el hipocampo a las 48 h de la reperfusión (Yang *et al.*, 2017a).

A diferencia de los trabajos anteriores, en los que se ha cuantificado RIP3 después de la isquemia y reperfusión, en el presente trabajo la cuantificación de RIP3 se llevó a cabo en el estriado y la corteza, en la zona de penumbra después de 1 h de isquemia y 48 h de reperfusión (figuras 6 y 9). Sin tratamiento se esperaba que el área de infarto se extendiera hasta incluir el área de penumbra. Asimismo, el aumento en el área de infarto se debe, en parte, a que la necroptosis está acompañada de la liberación de DAMPs y EROs, lo que promueve la inflamación y el estrés oxidante y, a su vez, la muerte de las células vecinas por necroptosis (Vandenabeele *et al.*, 2010).

Como se observa en la figura 9, el tratamiento con la SAC disminuyó el número de células positivas a RIP3, y por lo tanto el número de células que estaban en proceso de muerte por necroptosis. Debido a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la SAC, éstas podrían ser las responsables del efecto protector observado ya que se cuantificaron marcadores de estrés oxidante e inflamación.

Se sabe que el estrés oxidante aumenta como consecuencia de la activación de la necroptosis; sin embargo, también puede actuar como un inductor de la necroptosis (Dhuriya y Sharma, 2018), para evaluar el efecto de la SAC sobre el estrés oxidante se cuantificaron los marcadores de estrés NOS1 y 8-OHdG.

Durante la IR, el estrés oxidante se eleva por varios mecanismos entre los que se encuentran la actividad de varias enzimas como las NOS. El NO producido por estas enzimas contribuye al daño neuronal (Samdani *et al.*, 1997), debido a que reacciona con varias enzimas nitrosilando y modificando su actividad (Bach, 2017). El aumento de NO se puede observar después de 1 h de isquemia y 24-48 h de reperfusión en la corteza, el estriado, el hipocampo (Shen *et al.*, 2006), así como un aumento en la expresión de las enzimas NOS1 y NOS2 (Corsani *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1994).

Se puede observar en la figura 10, que a las 48 h de reperfusión el número de células positivas a NOS1 es mayor en el grupo IR, mientras que el número de células positivas disminuyó con el tratamiento de SAC. Este aumento de NOS1 podría estar relacionado con el aumento de la necroptosis, debido a que se observó que la NOS1 contribuye a la nitrosilación de RIP3 y que al usar un inhibidor de la NOS1 disminuye, tanto la nitrosilación de RIP3, como el daño neuronal, debido a la IR (Sahani y Sawa, 2011; Miao *et al.*, 2015). Este efecto de la nitrosilación de RIP3 fue observado por Miao y colaboradores (2015) en cultivos neuronales y en el modelo de oclusión global transitoria, después de 15 min de isquemia y 3 h de reperfusión.

Por otro lado, el efecto protector del tratamiento con la SAC observado en la figura 10 sobre NOS1, podría deberse en parte a la capacidad antioxidante de la SAC, puesto que ya se ha reportado que la SAC es capaz de inhibir la producción de NO en otros modelos de daño y actuar directamente sobre niveles de peroxinitrito después de la oclusión de la arteria cerebral media, que a su vez podría relacionarse con una menor cantidad de RIP3 nitrosilado y menor número de células que mueren por necroptosis, tal y como se observa en la figura 9 (Colín-González *et al.*, 2012),

Adicionalmente, el estrés oxidante puede causar la modificación de los ácidos nucleicos, los ácidos grasos y las proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2015). La 8-OHdG es un marcador de daño oxidativo al ADN, después de la IR (Nakajima *et al.*, 2012). Debido a que la necroptosis depende e induce el estrés oxidante, se cuantificaron los niveles de 8-OHdG corroborando que la SAC disminuye el estrés oxidante después de la IR, reflejado en un menor número de células positivas a 8-dGOH en la corteza y el estriado, como se puede observar en la figura 10 (Ashafaq *et al.*, 2012; Atif *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Numagami *et al.*, 1996; Numagami y Ohnishi, 2001; Shi *et al.*, 2015).

Entre los compuestos con actividad antioxidante que han demostrado reducir el estrés oxidante y la necroptosis, está la baicalina, que se usó en un modelo *in vitro* de células endoteliales que se sometieron a la privación de oxígeno y glucosa, en este experimento se encontró que este compuesto disminuía el estrés oxidante y la proporción de células que mueren por necroptosis (Luo *et al.*, 2017).

Del mismo modo el tratamiento con NAD⁺ y NADPH ha mostrado proteger *in vivo* e *in vitro* contra la isquemia, disminuyendo el estrés oxidante e inhibiendo la muerte por apoptosis y necroptosis (Huang *et al.*, 2018).

Finalmente, las células que mueren por necrosis y necroptosis liberan su contenido intracelular, provocando una respuesta inflamatoria, que puede provocar la muerte por necrosis o necroptosis (Kang y Tang, 2016). Se ha reportado que la inhibición de la necroptosis puede prevenir o reducir la

inflamación en varios modelos experimentales como ocurre en el daño por IR (Kang y Tang, 2016). Por ello se midieron los niveles de p65 en el estriado y la corteza. El tratamiento con SAC disminuyó el incremento inducido por la IR en los niveles de p65 (figura 11). Ya se ha reportado que la SAC es capaz de modular la inflamación a través de la vía de NFκB en otros modelos de daño (revisado en Colín-González *et al.*, 2015).

Se sabe que el factor de transcripción NFκB regula la inflamación y después de la IR aumenta su expresión 24 h después del inicio de la reperfusión en la zona de penumbra y hasta 4 días después (Gabriel *et al.*, 1999). La proteína p65 es una subunidad del factor de transcripción NFκB que está relacionado con la expresión de genes inflamatorios (Dhuriya y Sharma, 2018). Puede ser activado por estímulos proinflamatorios, estrés oxidante e hipoxia (Ridder y Schwaninger, 2009).

La disminución de los niveles de NFκB podría justificar el efecto protector de moléculas como la curcumina después de la IR (Li *et al.*, 2016). También se ha observado que el tratamiento con sulforofano disminuye la necroptosis a través de la vía NF-κB p65 en la microglía (Qin *et al.*, 2018).

En conjunto nuestros resultados sugieren que el efecto protector de la SAC en el modelo de IR está asociado con su capacidad para disminuir los niveles de RIP3 en el estriado y la corteza, así como el estrés oxidante y la inflamación.

IX. CONCLUSIÓN

La SAC disminuyó los niveles de RIP3 en el estriado y la corteza en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media, sugiriendo que su efecto protector podría estar relacionado con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

X. REFERENCIAS

Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2010) *Inmunología celular y molecular* (6th ed.). Elsevier España.

Abdi S, Afjal A, Najmi A, Raisuddin S (2018) S-allyl cysteine ameliorates cyclophosphamide-induced downregulation of urothelial uroplakin IIIa with a concomitant effect on expression and release of CCL11 and TNF- α in mice. *Pharmacological Reports* 70(4): 769–776.

Abdi S, Najmi A, Raisuddin S (2016) Cyclophosphamide-induced downregulation of uroplakin ii in the mouse urinary bladder epithelium is prevented by s-allyl cysteine. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 119(6): 598–603.

Ahmad M, Pischetsrieder M, Ahmed N (2007) Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation end products. *European Journal of Pharmacology* 561(1): 32–38.

Amagase, H (2006) Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition* 136(3): 716–725.

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

Amano H, Kazamori D, Itoh K (2016) Pharmacokinetics of S-allyl-L-cysteine in rats is characterized by high oral absorption and extensive renal reabsorption. *The Journal of Nutrition* 146(2): 456–459.

Amano H, Kazamori D, Itoh K, Koder Y (2015) Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of S-allyl-L-cysteine in rats and dogs. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 43(5): 749–755.

Anandasadagopan S, Sundaramoorthy C, Pandurangan A, Nagarajan V, Srinivasan K, Ganapasam S (2017) S-allyl cysteine alleviates inflammation by modulating the expression of NF- κ B during chromium (VI)-induced hepatotoxicity in rats. *Human and Experimental Toxicology* 36(11): 1186–1200.

Anrather J, Iadecola C (2016). Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics* 13(4): 661–670.

Antoniou X, Borsello T, Lüscher T, Camici G (2014) Antioxidants and Neuroprotection. In Laher I (Ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer Berlin Heidelberg: 2175–2189.

Anwar M, Choi S (2018) Receptor-Interacting Protein Kinase. In Choi S. (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Cham: Springer International Publishing: 4547–4555.

Arauz A, Ruíz-Franco A (2012) Enfermedad vascular cerebral. *Revista de La Facultad de Medicina (México)* 55(3): 11–21.

Arora D, Sharma P, Siddiqui M, Shukla Y (2017) Necroptosis: Modules and molecular switches with therapeutic implications. *Biochimie* 137: 35–45.

Asdaq S, Inamdar M (2010) Potential of garlic and its active constituent, S-allyl cysteine, as antihypertensive and cardioprotective in presence of captopril. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 17(13): 1016–1026.

Ashafaq M, Khan M, Shadab Raza S, Ahmad A, Khuwaja G, Javed H, Islam F (2012) S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutrition Research* 32(2): 133–143.

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

Avula P, Asdaq S, Asad M (2014) Effect of aged garlic extract and S-allyl cysteine and their interaction with atenolol during isoproterenol induced myocardial toxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 46(1): 94–99.

Bach A (2017) Targeting Oxidative Stress in Stroke. En Lapchak P., Zhang J. (eds) *Neuroprotective Therapy for Stroke and Ischemic Disease*. Springer Series in Translational Stroke Research: 203-250.

Baluchnejadmojarad T, Kiasalari Z, Afshin-Majd S, Ghasemi Z, Roghani M (2017) S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *European Journal of Pharmacology* 794: 69–76.

Barinagarrementería F, Cantú C (Eds.). (2003) *Enfermedad vascular cerebral*. El Manual Moderno. México, 10-30.

Bayraktar O, Tekin N, Aydın O, Akyuz F, Musmul A, Burukoglu D (2015) Effects of S-allyl cysteine on lung and liver tissue in a rat model of

lipopolysaccharide-induced sepsis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388(3): 327–335.

Becerril-Chávez H, Colín-González A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Chavarría A, Eduarda de Lima M, Santamaría A (2017) Protective effects of S-allyl cysteine on behavioral, morphological and biochemical alterations in rats subjected to chronic restraint stress: Antioxidant and anxiolytic effects. *Journal of Functional Foods* 35: 105–114.

Becher B, Spath S, Goverman J (2017) Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews. Immunology* 17(1): 49–59.

Becker K, Buckwalter M (2016) Stroke, inflammation and the immune response: dawn of a new era. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13(4): 659–660.

Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P (2014) Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(2): 135-147.

Bhatia K, Ahmad F, Rashid H, Raisuddin S (2008) Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46(11): 3368–3374.

Blaser H, Dostert C, Mak T, Brenner D (2016) TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in Cell Biology* 26(4): 249–261.

Borek C (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. *The Journal of Nutrition* 131(3): 1010–1015.

Brahmanaidu P, Uddandrao V, Sasikumar V, Naik R, Pothani S, Begum M, Saravanan G (2017) Reversal of endothelial dysfunction in aorta of streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats by S-allylcysteine. *Molecular and Cellular Biochemistry* 432(1-2): 25–32.

Butler T, Kassed C, Sanberg P, Willing A, Pennypacker K (2002) Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Research* 929(2): 252–260.

Cantú C (2012) Enfermedad vascular cerebral. *Clínicas mexicanas de neurología. Academia Mexicana de neurología. Pydesa.* xv-xiii; 1-50; 63-74; 221-234.

Carmichael S (2016) The 3 Rs of Stroke Biology: Radial, Relayed, and Regenerative. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics* 13(2): 348–359.

Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas A (2016) Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurology* 15(8): 869–881.

Chamorro Á, Meisel A, Planas A, Urra X, Van de Beek D, Veltkamp R (2012) The immunology of acute stroke. *Nature Reviews. Neurology* 8(7): 401–410.

Chao H, Chen I, Liu H (2014) S-allyl L-cysteine protects the retina against kainate excitotoxicity in the rat. *The American Journal of Chinese Medicine* 42(3): 693–708.

Chen J, Kostrzewa R, Xu X (2014) Necroptosis, a potential therapeutic target for neurological disorders. In Kostrzewa R.M. (Ed.), *Handbook of Neurotoxicity*. Springer New York: 69–93.

Chen Z, Mou R, Feng D, Wang Z, Chen G (2017) The role of nitric oxide in stroke. *Medical Gas Research* 7(3): 194–203.

Chiquete E, Cantú C (2012) Penumbra isquémica y el potencial de la neuroprotección en el infarto cerebral agudo. In Cantú C. (Ed.), *Enfermedad vascular cerebral. Clínicas mexicanas de neurología*. Academia Mexicana de neurología. Pydesa: 63-74.

Cho O, Hwang H, Lee B, Oh Y, Kim C, Chun M (2015) Met inactivation by S-allylcysteine suppresses the migration and invasion of nasopharyngeal cancer cells induced by hepatocyte growth factor. *Radiation Oncology Journal* 33(4), 328–336.

Chu Q, Lee D, Tsao S, Wang X, Wong Y (2007) S-allyl cysteine, a water-soluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgen-independent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. *BJU International* 99(4): 925–932.

Clark W, Wissman S, Albers G, Jhamandas J, Madden K, Hamilton S, (1999) Recombinant tissue-type plasminogen activator (Ateplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS study: a randomized controlled trial. Alteplase thrombolysis for acute noninterventional therapy in ischemic stroke. *Journal of the American Medical Association* 282(21): 2019-2026.

Cobley J, Fiorello M, Bailey D (2018) 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology* 15: 490–503.

Colín-González A, Becerril H, Flores-Reyes B, Torres I, Pinzón E, Santamaría-Del Angel D, Maldonado P (2015) Acute restraint stress reduces hippocampal oxidative damage and behavior in rats: Effect of S-allyl cysteine. *Life Sciences* 135: 165–172.

Colín-González A, Santana R, Silva-Islas C, Chánez-Cárdenas M, Santamaría A, Maldonado P (2012) The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 907162.

Corsani L, Bizzoco E, Pedata F, Gianfriddo M, Faussonne-Pellegrini M, Vannucchi M (2008) Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion. *Experimental Neurology* 211(2): 433–440.

Courtois G, Pescatore A, Gautheron J, Fusco F, Ursini M, Senegas A (2016) The NF- κ B signaling pathway: players and functions. En Courtois G, Pescatore A, Gautheron J, Fusco F, Ursini M, Senegas A (Eds.), *NF- κ B-Related Genetic Diseases*. Cham: Springer International Publishing: 1–21.

Cruz S, Qin Z, Stewart A, Chen H (2018) Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury. *Neural regeneration research* 13(2): 252-256.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Yuan, J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*: 1(2): 112–119.

Denzer I, Münch G, Pischetsrieder M, Friedland K (2016) S-allyl L-cysteine and isoliquiritigenin improve mitochondrial function in cellular models of oxidative and nitrosative stress. *Food Chemistry* 194: 843–848.

Dhuriya Y, Sharma D (2018) Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation* 15(1): 199.

Diez-Tejedor (2006) Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Guías Oficiales de la sociedad Española de Neurología. Díez-Tejedor (ed) Prous Science. No. 3.

Dong Y, Bao C, Yu J, Liu X (2016) Receptor-interacting protein kinase 3-mediated programmed cell necrosis in rats subjected to focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Molecular Medicine Reports* 14(1): 728–736.

Doyle K, Simon R, Stenzel-Poore M (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55(3): 310–318.

Drieu A, Levard D, Vivien D, Rubio M (2018) Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 11: 1-15.

Duris K, Rolland W, Zhang J (2014) Stroke pathophysiology and reactive oxygen species. In Laher I (Ed.) *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer Berlin Heidelberg: 1979–1997

Dutt V, Saini V, Gupta P, Kaur N, Bala M, Gujar R, Mittal A (2018) S-allyl cysteine inhibits TNF α -induced skeletal muscle wasting through suppressing proteolysis and expression of inflammatory molecules. *Biochimica* 1862(4): 895–906.

Dvořáková M, Heroutová I, Němeček D, Adámková K, Krejčová T, Nevorál J, Sedmíková M (2016) The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ* 4: e2280.

Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Pérez-De La Cruz V, Maldonado P, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí 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.

Eltzschig H, Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nature Medicine* 17(11): 1391–1401.

Escribano B, Agüera E, Aguilar-Luque M, Luque E, Feijóo M, LaTorre M, Túnez I (2018) Neuroprotective effect of S-allyl cysteine on an experimental model of multiple sclerosis: Antioxidant effects. *Journal of Functional Foods* 42: 281–288.

Escribano B, Luque E, Aguilar-Luque M, Feijóo M, Caballero-Villarraso J, Torres L, Túnez I (2017) Dose-dependent S-allyl cysteine ameliorates multiple sclerosis disease-related pathology by reducing oxidative stress and biomarkers of dysbiosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Pharmacology* 815: 266–273.

Feigin V, Norrving B, George M, Foltz J, Roth G, Mensah G (2016) Prevention of stroke: A strategic global imperative. *Nature Reviews. Neurology* 12(9): 501–512.

Franco-Enzástiga Ú, Santana-Martínez R, Silva-Islas C, Barrera-Oviedo D, Chánez-Cárdenas M, Maldonado P (2017) Chronic administration of S-allylcysteine activates Nrf2 factor and enhances the activity of antioxidant enzymes in the striatum, frontal cortex and hippocampus. *Neurochemical Research* 42(11): 3041–3051.

Fulda S (2016) Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species. *Biological Chemistry* 397(7): 657–660.

Gabriel C, Justina C, Camins A, Planas A (1999) Activation of nuclear factor-kappaB in the rat brain after transient focal ischemia. *Brain research. Molecular brain research* 65(1): 61-69.

Galluzi L, Kepp O, Chan F, Kroemer G (2018a) Necroptosis: Mechanisms and relevance to disease. *Annual review of pathology* 12: 103-130.

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S, Abrams J, Adam D, Agostinis P, Kroemer G (2018b) Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death and Differentiation* 25(3): 486–541.

Gapter L, Yuin O, Ng K (2008) S-Allylcysteine reduces breast tumor cell adhesion and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367(2): 446–451.

García E, Santana-Martínez R, Silva-Islas C, Colín-González A, 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.

García E, Villeda-Hernández J, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado P, Santamaría A (2010) S-allylcysteine reduces the MPTP-induced striatal cell damage via inhibition of pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expressions in mice. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 18(1): 65–73.

Geng Z, Rong Y, Lau B (1997) S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radical Biology and Medicine* 23(2): 345–350.

Genova H, Kucukboyaci N (2018) Ischemic penumbra. En Kreutzer J, Deluca J, Caplan B (Eds.), *Encyclopedia of clinical neuropsychology*. Springer. New York: 1862-1864

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

Gómez S, Pérez M, Rodríguez A, Pantoja J (2013) Fortalecimiento de la atención primaria del adulto mayor ante la transición demográfica en México. *Atención Primaria / Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria* 45(5): 229-284.

Góngora-Rivera F (2015) Perspective on stroke in Mexico. *Medicina Universitaria* 17(68): 184–187.

Gong Z, Ye H, Huo Y, Wang L, Huang Y, Huang M, Yuan X (2018) S-allyl-cysteine attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by targeting STAT3/SMAD3 pathway. *American Journal of Translational Research* 10(5): 1337–1346.

Granger D, Kvietys P (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology* 6: 524–551.

Gutierrez K, Davis M, Daniels B, Olsen, Ralli-Jain P, Tait S, Gale M, Oberst A (2017) MLKL activation triggers NLRP3-mediated processing and release of IL-1 β independent of gasdermin-D. *198(5):2156-2164*.

Halliwell B, Gutteridge J (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: 30-152.

Heneka M, Kummer M, Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Immunology* 14(7): 463–477.

Herrera-Mundo M, Silva-Adaya D, Maldonado P, Galván-Arzate S, Andrés-Martínez L, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A (2006) S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neuroscience Research* 56(1): 39–44.

Ho S, Ide N, Lau B (2001) S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 8(1): 39–46.

Hsu C, Lin C, Liao T, Yin M (2006) Protective effect of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 44(3): 393–397.

Hu G, Chen Y (2017) Post-stroke dementia: Epidemiology, mechanisms and management. *international Journal of Gerontology*: 11(4), 210–214.

Huang J, Liu W, Sun X (2018) Hydrogen inhalation improves neurological outcomes after cerebral ischemia/reperfusion independent of anti-necroptosis. *Medical gas research* 8(1): 1-5.

Huang Q, Sun M, Li M, Zhang D, Han F, Wu J, Fukunaga K, Chen Z, Qin Z (2018) Combination of NAD⁺ and NADPH offers greater neuroprotection in ischemic stroke models by relieving metabolic stress. *Molecular Neurobiology* 55(7): 6063-6075.

Hwang Y, Kim H, Choi J, Do M, Chung Y, Jeong T, Jeong H (2013) S-allyl cysteine attenuates free fatty acid-induced lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24(8): 1469–1478.

Iadecola C, Anrather J (2011a) Stroke research at a crossroad: Asking the brain for directions. *Nature Neuroscience* 14(11): 1363–1368.

Iadecola C, Anrather J (2011b) The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature Medicine* 17(7): 796–808.

Ide N, Matsuura H, Itakura Y (1996) Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytotherapy Research: PTR* 10(4): 340–341.

Iliya I, Mohammed B, Akuyam S, Yaro J, Timbuk J, Tanko M, Nok A (2016) Histological and biochemical evaluation of the antidiabetic potentials of s-allyl-cysteine and mangiferin in type 2 diabetic rat models. *Sub-Saharan African Journal of Medicine* 3(1): 32-40.

Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K (2003) Neurotoxicity induced by amyloid beta-peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: Protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain Research* 985(1): 98–107.

Jana N, Basu A, Tandon P (Eds.). (2016) *Inflammation: The Common Link in Brain Pathologies*: 1-16.

Javed H, Khan M, Khan A, Vaibhav K, Ahmad A, Khuwaja G, Islam F (2011) S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research* 1389: 133–142.

Jiang X, Andjelkovic A, Zhu L, Yang T, Bennett M, Chen J, Shi Y (2018) Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Progress in Neurobiology* 163-164:144–171.

Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G (2013) Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6(5): 834–851.

Jun-Long H, Yi L, Bao-Lian Z, Jia-Si L, Ning Z, Zhou-Heng Y, Xue-Jun S, Wen-Wu L (2018) Necroptosis signaling pathways in stroke: From mechanism to therapies. *Current Neuropharmacology* 16(9): 1327-1339.

Kalogeris T, Baines C, Krenz M, Korthuis R (2016). Ischemia/reperfusion. *Comprehensive physiology* 7(1): 113–170.

Kang R, Tang D (2016) What Is the Pathobiology of Inflammation to Cell Death? Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, Autophagic Cell Death, Pyroptosis, and NETosis. En: Maiuri M., De Stefano D. (eds) *Autophagy Networks in Inflammation*. *Progress in Inflammation Research*, 81-106.

Katan M, Luft A (2018) Global burden of stroke. *Seminars in neurology* 38(2): 208-211.

Kattaia A, Abd E, Mohamed E, Abdul-Maksou R, Elfakharany Y (2017) Molecular mechanisms underlying histological and biochemical changes induced by nitrate in rat liver and the efficacy of S-allylcysteine. *Ultrastructural Pathology* 41(1): 10–22.

Kawabori M, Yenari M (2015) Inflammatory responses in brain ischemia. *Current Medicinal Chemistry* 22(10): 1258–1277.

Kearney C, Martin S (2017) An inflammatory perspective on necroptosis. *Molecular cell* 65(6): 965-973.

Kim J, Lee J, Chang N, Chun H, Kim W (2006a) S allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free radical research* 40(8): 827-835.

Kim J, Chang N, Kim W, Chun H (2006b) Dietary S-allyl-L-cysteine reduces mortality with decreased incidence of stroke and behavioral changes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70(8): 1969–1971.

Kim K, Chun S, Koo M, Choi W, Kim T, Kwon Y, Kim Y (2001) Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial

cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology and Medicine* 30(7): 747–756.

Kochhar G, Jue J, Nielsen C (2013) Stroke risk factors. En Corrigan M, Escuro A, Kirby D (editores) *Handbook of clinical nutrition and stroke. Nutrition and health*. Humana Press: 33-46.

Kodai S, Takemura S, Kubo S, Azuma H, Minamiyama Y (2015) Therapeutic administration of an ingredient of aged-garlic extracts, S-allyl cysteine resolves liver fibrosis established by carbon tetrachloride in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 56(3): 179–185.

Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Hai S, Yamamoto S, Kubo S, Suehiro S (2007) S-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats. *Free Radical Research* 41(4): 489–497.

Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanezawa A, Ono 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.

Konigsberg M (2008) Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones medicas (1a ed.) *El manual moderno*, México: 3-146; 359-376.

Kosuge Y, Koen Y, Ishige K, Minami K, Urasawa H, Saito H, Ito Y (2003) S-allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid beta-protein- and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience* 122(4): 885–895.

Lai T, Zhang S, Wang Y (2014) Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 115: 157–188.

Lambertsen K, Finsen B, Clausen B (2018) Post-stroke inflammation-target or tool for therapy?. *Acta Neuropathologica* 137(5): 693-714.

Lawlor K, Khan N, Mildenhall A, Gerlic M, Croker B, Cruz A, Hall C, Spall S, Anderton H, Masters S, Rashidi M, Wicks I, Alexander W, Mitsuuchi Y, Benetatos C, Condon S, Wong W, Silke J, Vaux D, Vince J (2015) RIP3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nature communications* 6: 6282.

Lembede B, Erlwanger K, Nkomozezi P, Chivandi E (2018) Effect of neonatal orally administered S-allyl cysteine in high-fructose diet fed Wistar rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 9(2): 160–171.

Lim T (2015) *Allium sativum*. In Lim T (Ed.), *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 9, Modified Stems, Roots, Bulbs*. Dordrecht: Springer Netherlands: 210–360.

Lin Y, Choksi S, Shen H, Yang Q, Hur G, Kim Y, Tran J, Nedospasov S, Liu Z (2004) Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *The Journal of Biological chemistry* 279(11): 10822-10828.

Lin C, Yin M, Liu W (2008) Alleviative effects of s-allyl cysteine and s-ethyl cysteine on MCD diet-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46(11): 3401–3406.

Linkermann A, Hackl M, Kunzendorf U, Walczak H, Krautwald S, Jevnikar A (2013) Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13(11): 2797–2804.

Li P, Gan Y, Mao L, Leak R, Chen J, Hu X (2014) The critical roles of immune cells in acute brain injuries. In Chen J, Hu X, Stenzel-Poore M, Zhang J (Eds.), *Immunological mechanisms and therapies in brain injuries and stroke*. Springer New York: 9–25.

Li W, Suwanwela N, Patumraj S (2016) Curcumin by down-regulating NF- κ B and elevating Nrf2, reduces brain edema and neurological dysfunction after cerebral I/R. *Microvascular research* 106: 117-127.

Liu F, Schafer D, McCullough L (2009) TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of neuroscience methods* 179(1): 1-8.

Liu H, Li J, Zhao F, Wang H, Qu Y, Mu D (2015). Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Reviews in the Neurosciences* 26(1): 105–117.

Li Y, Yang X, Ma C, Qiao J, Zhang C (2008) Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neuroscience Letters* 447(2-3): 120–123.

Luo S, Li S, Zhu L, Fang S, Chen J, Xu Q, Li H, Luo N, Yang C, Luo d, Li L, Ma X, Zhang R, Wang H, Chen Y, Wang Q (2017) Effect of baicalin on oxygen-glucose deprivation-induced endothelial cell damage. *Neuroreport* 28(6): 299-306.

Maaijwee N, Rutten-Jacobs L, Schaapsmeeders P, Van Dijk E, De Leeuw F (2014) Ischaemic stroke in young adults: Risk factors and long-term consequences. *Nature Reviews. Neurology* 10(6): 315–325.

Magendiramani V, Umesalma S, Kalayarasan S, Nagendraprabhu P, Arunkumar J, Sudhandiran G (2009) S-allyl cysteine attenuates renal injury by altering the expressions of iNOS and matrix metallo proteinase-2 during cyclosporine-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology* 29(6): 522–530.

Majewski M (2014) *Allium sativum*: Facts and myths regarding human health. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 65(1): 1–8.

Maldonado P, Alvarez-Idaboy J, Aguilar-González A, Lira-Rocha A, Jung-Cook H, Medina-Campos O, Galano A (2011) Role of allyl group in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of S-allylcysteine. *The Journal of Physical Chemistry* 115(45): 13408–13417.

Maldonado P, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos O, 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.

Manzanero S, Santro T, Arumugam T (2013) Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochemistry International* 62(5): 712–718.

McCann S, Roulston C (2013) NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain Sciences* 3(2): 561–598.

Medina-Campos O, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado P, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J (2007) S-allyl cysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK (1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 45(10): 2030–2039.

Mergenthaler P, Dirnagl U, Kunz A (2016) Ischemic Stroke: Basic Pathophysiology and Clinical Implication. En Pfaff D (Ed.) *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. Springer New York: 2543–2563.

Miao W, Qu Z, Shi K, Zhang D, Zong Y, Zhang G, Hu S (2015) RIP3 S-nitrosylation contributes to cerebral ischemic neuronal injury. *Brain Research* 1627: 165–176.

Mimenza A, Aguilar S, Guitiérrez L (2012) Demencia vascular. In Cantu C (Ed.) Enfermedad vascular cerebral. Clínicas mexicanas de neurología. Academia Mexicana de neurología. Pydesa: 221-234.

Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, Inoue K, Suehiro S (2006) S-allyl cysteine attenuated CCl₄-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *BioFactors* 26(1): 81–92.

Mohr J, Wolf P, Grotta J, Moskowitz M, Mayberg M, Kumer R (2011) Stroke, pathophysiology, diagnosis and management (5th ed.). Elsevier saunders: 44-120.

Mong M, Yin M (2012) Nuclear factor κ B-dependent anti-inflammatory effects of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine in kidney of diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(12): 3158–3165.

Morris G, Wright A, Tan R, Gladbach A, Ittner L, Vissel B (2016) A comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice. *PLoS One* 11(2): e0148503.

Mostafa M, Mima T, Ohnishi S, Mori K (2000) S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Medica* 66(2): 148–151.

Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Higashi Y (1994) Pharmacokinetics of the garlic compound S-allyl cysteine. *Planta Medica* 60(3): 214–217.

Nagy Z, Nardai S (2017) Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside. *Brain Research Bulletin* 134: 30–37.

Naidu P, Sathibabu Uddandrao V, Naik R, Pothani S, Munipally P, Meriga B, Saravanan G (2016) Effects of S-allylcysteine on biomarkers of the polyol pathway in rats with type 2 diabetes. *Canadian Journal of Diabetes* 40(5): 442–448.

Nakajima H, Unoda K, Ito T, Kitaoka H, Kimura F, Hanafusa T (2012) The relation of urinary 8-OHdG, a marker of oxidative stress to DNA, and clinical outcomes for ischemic stroke. *The Open Neurology Journal* 6: 51–57.

Narasimhan P, Sakata H, Jung J, Nishi T, Wakai T, Maier C, Chan P (2014) Immune cell-derived free radicals in acute brain injury. In Chen J, Hu X, Stenzel-Poore M, Zhang J (Eds.), *Immunological mechanisms and therapies in brain injuries and stroke*. Springer New York: 53–66.

Ng K, Guo D, Cheng Q, Geng W, Ling C, Li C, Man K (2012) A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *PloS One* 7(2): e31655.

Nikseresht S, Khodaghali F, Ahmadiani A (2018) Protective effects of ex-527 on cerebral ischemia–reperfusion injury through necroptosis signaling pathway attenuation. *Journal of cellular physiology* 234(2): 1816-1826.

Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H (2001) Ameliorative effect of S-allyl cysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *The Journal of Nutrition* 131(3): 1093S–5S.

Niwa M, Inao S, Takayasu M, Kawai T, Kajita Y, Nihashi T, Kabeya R, Sugimoto T, Yoshida J (2001) Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurologia medico-chirurgica* 41(2): 63-72.

Numagami Y, Ohnishi S (2001) S-allyl cysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *The Journal of Nutrition* 131(3): 1100–1105.

Numagami Y, Sato S, Ohnishi S (1996) Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: A possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochemistry International* 29(2): 135–143.

Orozco-Ibarra M, Muñoz-Sánchez J, Zavala-Medina M, Pineda B, Magaña-Maldonado R, Vázquez-Contreras E, Chánez-Cárdenas M (2016) Aged garlic extract and S-allylcysteine prevent apoptotic cell death in a chemical hypoxia model. *Biological Research* 49: 7.

Orozco S, Oberst A (2018) RIPK3 in cell death and inflammation: The Good, the Bad and the Ugly. *Immunological reviews* 277(1): 102-112.

Pai M, Kuo Y, Chiang E, Tang F (2012) S-allyl cysteine inhibits tumor progression and the epithelial-mesenchymal transition in a mouse xenograft model of oral cancer. *The British Journal of Nutrition* 108(1): 28–38.

Park J, Han Y, Kangwan N, Lee S, Jung M, Kim E, Hahm K (2014) S-allyl cysteine alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damages by increasing cyclooxygenase-2 inhibition, heme oxygenase-1 induction, and histone deacetylation inhibition. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29: 80–92.

Park T, Oh J, Lee J, Park S, Jang Y, Lee Y (2017) Oral administration of (S)-allyl-L-cysteine and aged garlic extract to rats: Determination of metabolites and their pharmacokinetics. *Planta Medica* 83(17): 1351–1360.

Patel R, McMullen P (2017) Neuroprotection in the treatment of acute ischemic stroke. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 59(6): 542–548.

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado P, 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-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado P, Medina-Campos O, Ortíz-Plata A, Santamaría A (2004) S-allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International* 45(8): 1175–1183.

Piña R, Martínez D (2016) Epidemiología, etiología y clasificación de la enfermedad vascular cerebral. *Archivos de Medicina* 16(2): 495-507.

Pulsen H, Specht E, Broedbaek K, Henriksen T, Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Tonnesen M, Nielsen P, Andersen H, Weimann A (2012) RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism?. *Free Radical Biology and Medicine* 52(8): 1353-1361.

Preethi J, Chitra L, Ancy I, Kumaradhas P, Palvannan T (2018) S-allyl cysteine as potent anti-gout drug: Insight into the xanthine oxidase inhibition and anti-inflammatory activity. *Biochimie* 154: 1-9.

Prieto G, Cotman C (2017) Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 34: 27–33.

Qin S, Yang C, Huang W, Du S, Mai H, Xiao J, Lü T (2018) Sulforaphane attenuates microglia-mediated neuronal necroptosis through down-regulation of MAPK/NFκB signaling pathways in LPS-activated BV-2 microglia. *Pharmacological research* 133: 218-235.

Qu Z, Mossine V, Cui J, Sun G, Gu Z (2016) Protective Effects of AGE and Its Components on Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Neuromolecular Medicine* 18(3): 474–482.

Ramírez-Alvarado G, Téllez-Alanís B (2016) Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en México: Ausencia de registro de las secuelas cognitivas. *Revista Mexicana de Neurociencia* 17(2): 59–70.

Ray B, Chauhan N, Lahiri D (2011a) The “aged garlic extract:” (AGE) and one of its active ingredients S-allyl-L-cysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agents for Alzheimer’s disease (AD). *Current Medicinal Chemistry* 18(22): 3306–3313.

Ray B, Chauhan N, Lahiri K (2011b) Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by aged garlic extract and S-allyl-L-cysteine treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *Journal of Neurochemistry* 117(3): 388–402.

Ridder D, Schwaninger M (2009) NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience* 158(3): 995-1006.

Rivera-Nava S, Miranda-Medrano L, Pérez-Rojas J, de Jesús Flores J, Rivera-García B, Torres-Arreola L (2012) Guía de práctica clínica Enfermedad vascular cerebral isquémica. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social* 50(3): 335–346.

Roca F, Ramakrishnan L (2013) TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell* 153(3): 521–534.

Roleira F, Tavares-da-Silva E, Garrido J, Borges F (2012) Antioxidants and stroke: Success and pitfalls. In Lapchak P, Zhang J (Eds.), *Translational Stroke Research: From Target Selection to Clinical Trials*. Springer New York: 117–143.

Rossi D, Brady J, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature Neuroscience* 10(11): 1377–1386.

Ruano L, Quiñones G, Arzola J, Sosa F, Cantú C (2012) Incidencia y prevalencia de la EVC en México. En *Enfermedad Vascular cerebral clínicas mexicanas de neurología*. Cantú C. y Cuevas, C. (Eds.), Pydesa: 1-14.

Sahani N, Sawa A (2011) Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidant redox signaling* 14(8): 1493-1504.

Salta E, Strooper B (2017) Noncoding RNAs in neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience* 18(10): 627-640.

Samdani A, Dawson T, Dawson V (1997) Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 28(6): 1283–1288.

Santhosha S, Jamuna P, Prabhavathi S (2013) Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience* 3: 59–74.

Saravanan G, Ponmurugan P (2010) Beneficial effect of S-allylcysteine (SAC) on blood glucose and pancreatic antioxidant system in streptozotocin diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 65(4): 374–378.

Saravanan G, Ponmurugan P (2011) Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 189(1-2): 100–106.

Saravanan G, Ponmurugan P (2012) Ameliorative potential of S-allylcysteine: Effect on lipid profile and changes in tissue fatty acid composition in experimental diabetes. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 64(6): 639–644.

Saravanan G, Ponmurugan P (2013) S-allylcysteine improves streptozotocin-induced alterations of blood glucose, liver cytochrome p450 2e1, plasma antioxidant system, and adipocytes hormones in diabetic rats. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 11(4): e10927.

Saravanan G, Ponmurugan P, Kumar G, Rajarajan T (2009) Antidiabetic properties of S-allyl cysteine, a garlic component on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Applied Biomedicine* 7(3): 151–159.

Saravanan G, Ponmurugan P, Senthil G, Rajarajan T (2010) Antidiabetic effect of S-allylcysteine: Effect on plasma and tissue glycoproteins in experimental diabetes. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 17(14): 1086–1089.

Sathibabu V, Brahmanaidu P, Ravindarnaik R, Suresh P, Vadivukkarasi S, Saravanan G (2018) Restorative potentiality of S-allylcysteine against diabetic nephropathy through attenuation of oxidative stress and inflammation in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *European Journal of Nutrition*: 1-13.

Saver J (2006) Time is brain-quantified. *Stroke* 37(1): 263-266.

Schenk B, Fulda S (2015) Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNF α -induced necroptotic signaling and cell death. *Oncogene* 34(47): 5796-5806.

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

Scrutinio D, Guida P, Lanzillo B, Ferretti C, Loverre A, Montrone N, Spaccavento S (2018) Rehabilitation outcomes of patients with severe disability poststroke. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*: 1-10.

Sengupta D, Chowdhury K, Chatterjee S, Sarkar A, Paul S, Sur P, Sadhukhan (2017) Modulation of adenylate cyclase signaling in association with MKK3/6 stabilization under combination of SAC and berberine to reduce HepG2 cell survivability. *Apoptosis* 22(11): 1362-1379.

Shen J, Ma S, Chan P, Lee W, Fung P, Cheung R, Tong Y, Liu K (2006) Nitric oxide down-regulates caveolin-1 expression in rat brains during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *Journal of neurochemistry* 96(4): 1078-1089.

Sengupta D, Chowdhury K, Chatterjee S, Sarkar A, Paul S, Sur P, Sadhukhan G (2017) Modulation of adenylate cyclase signaling in association with MKK3/6 stabilization under combination of SAC and berberine to reduce HepG2 cell survivability. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 22(11): 1362–1379.

Shi H, Jing X, Wei X, Perez R, Ren M, Zhang X, Lou H (2015) S-allyl cysteine activates the Nrf2-dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry* 133(2): 298–308.

Shinkawa H, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, Osada-Oka M, Suehiro S (2009) S-allyl cysteine is effective as a chemo preventive agent against porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Medical Journal* 55(2): 61–69.

Siket M (2016) Treatment of acute ischemic stroke. *Emergency medicine Clinics of North America* 34(4): 861–882.

Silke J, Rickard J, Gerlic M (2015) The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nature Immunology* 16(7): 689–697.

Skaper S, Facci L, Zusso M, Giusti P (2018) An inflammation-centric view of neurological disease: Beyond the neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12: 72.

Sundaresan S, Subramanian P (2008) Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by S-allylcysteine. *Molecular and Cellular Biochemistry* 310(1-2): 209–214.

Takemura S, Ichikawa H, Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T, Minamiyama Y (2014) S-allyl cysteine ameliorates the quality of sperm and provides protection from age-related sperm dysfunction and oxidative stress in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 55(3): 155–161.

Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, Okada S, Kubo S (2013) S-allyl cysteine improves nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats via regulation of hepatic lipogenesis and glucose metabolism. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 53(2): 94–101.

Tang F, Chiang E, Chung J, Lee H, Hsu C (2009) S-allylcysteine modulates the expression of E-cadherin and inhibits the malignant progression of human oral cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20(12): 1013–1020.

Tang F, Chiang E, Pai M (2010) Consumption of S-allylcysteine inhibits the growth of human non-small-cell lung carcinoma in a mouse xenograft model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(20): 11156–11164.

Terpolilli N, Moskowitz M, Plesnila N (2012). Nitric oxide: Considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(7): 1332–1346.

Tian J, Guo S, Chen H, Peng J, Jia M, Li N, Zhang X, Yang J (2018) Combination of emricasan with ponatinib synergistically reduces ischemia/reperfusion injury in rat brain through simultaneous prevention of apoptosis and necroptosis. *Stroke research* 9(4): 382-392.

Tsai S, Chiu C, Yang H, Yin M (2011) S-allyl cysteine, S-ethyl cysteine, and S-propyl cysteine alleviate β -amyloid, glycation, and oxidative injury in brain of mice treated by D-galactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(11): 6319–6326.

Tsukioka T, Takemura S, Minamiyama Y, Mizuguchi S, Toda M, Okada S (2017) Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats with S-allyl cysteine. *Molecules* 22(4): 1-11.

Tuttolomondo A, Pinto A, Licata G (2014) Neuroprotection against reactive oxygen species-mediated injury in acute ischemic stroke. En Laher I, (Ed.) *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer Berlin Heidelberg: 1999–2021.

Uzun L, Kokten N, Cam O, Kalcioglu M, Ugur M, Tekin M, Acar G (2016) The effect of garlic derivatives (S-allylmercaptocysteine, diallyl disulfide, and S-allylcysteine) on gentamicin induced ototoxicity: An experimental study. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 9(4): 309–313.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11(10): 700–714.

Vanlangenakker N, Berghe T, Bogaert P, Laukens B, Zobel K, Deshayes K, Vucic D, Fulda S, Vandenabeele P, Mertrand M (2010) cIAP and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell death and differentiation* 18(2011): 656-665.

Vaquero-Raya E, Molero-richard X (2005) Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del pancreas ¿Una posible diana terapéutica?. *Gastroenterología y hepatología* 28(8): 437-510.

Velmurugan B, Nagini S (2005) Combination chemoprevention of experimental gastric carcinogenesis by S-allylcysteine and lycopene: Modulatory effects on glutathione redox cycle antioxidants. *Journal of Medicinal Food* 8(4): 494–501.

Veltkamp R, Gill D (2016) Clinical Trials of Immunomodulation in Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13(4): 791–800.

Vieira M, Fernandes J, Carreto L, Anuncibay-Soto B, Santos M, Han J, Santos A (2014) Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiology of Disease* 68: 26–36.

Wegner K, Saleh D, Degterev A (2017) Complex pathologic roles of RIPK1 and RIPK3: Moving beyond necroptosis. *Trends in Pharmacological Sciences* 38(3): 202–225.

Weinlich R, Oberst A, Beere H, Green D (2017) Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18(2): 127–136.

Welch C, Wuarin L, Sidell N (1992) Antiproliferative effect of the garlic compound S-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Letters* 63(3): 211–219.

Wu Q, Tymianski M (2018) Targeting NMDA receptors in stroke: New hope in neuroprotection. *Molecular Brain* 11(1): 15.

Wu Y, Hu Y, Zhou H, Zhu J, Tong Z, Qin S, Liu D (2018) Organosulfur compounds induce cytoprotective autophagy against apoptosis by inhibiting mTOR phosphorylation activity in macrophages. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 50(11): 1085-1093.

Xu X, Miao Y, Chen J, Zhang Q, Wang J (2015). Effective production of S-allyl-L-cysteine through a homogeneous reaction with activated endogenous γ -glutamyltranspeptidase in garlic (*Allium Sativum*). *Journal of Food Science and Technology* 52(3): 1724–1729.

Xu Y, Feng J, Zhang D, Zhang B, Luo M, Su D, Lin N (2014) S-allylcysteine, a garlic derivative, suppresses proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica* 35(2): 267–274.

Xu Y, Su D, Zhu L, Zhang S, Ma S, Wu K, Lin N (2018) S-allylcysteine suppresses ovarian cancer cell proliferation by DNA methylation through DNMT1. *Journal of Ovarian Research* 11(1): 39.

Xu Y, Wang J, Song X, Qu L, Wei R, He F, Luo B (2016) RIP3 induces ischemic neuronal DNA degradation and programmed necrosis in rat via AIF. *Scientific Reports* 6: 29362.

Yan C, Zeng F (2005) Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 5(1): 61–69.

Yang M, Lv Y, Tian X, Lou J, An R, Zhang Q, Li M, Xu L, Dong Z (2017a) Neuroprotective effect of β -Caryophyllene on cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of necroptotic neuronal death and inflammation: *In vivo* and *in vitro*. *Frontiers in neuroscience* 11: 583.

Yang X, Yi T, Zhang S, Xu Z, Yu Z, Sun H, Cheng S (2017b) Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury. *Scientific Reports* 7(1): 5818.

Yan S, Yin M (2007) Protective and alleviative effects from 4 cysteine-containing compounds on ethanol-induced acute liver injury through suppression of oxidation and inflammation. *Journal of Food Science* 72(7): 511–515.

Yin B, Xu Y, Wei R, He F, Luo B, Wang J (2015) Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Brain Research* 1609: 63–71.

Yu J, Feng L, Hu Y, Zhou Y (2012) Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: Potential benefits to preeclampsia. *Placenta* 33(6): 487–494.

Zarezadeh M, Baluchnejadmojarad T, Kiasalari Z, Afshin-Majd S, Roghani M (2017) Garlic active constituent S-allyl cysteine protects against lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in the rat: Possible involved mechanisms. *European Journal of Pharmacology* 795: 13–21.

Zeinali H, Baluchnejadmojarad T, Fallah S, Sedighi M, Moradi N, Roghani M (2018) S-allyl cysteine improves clinical and neuropathological features of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 97: 557–563.

Zhang S, Tang M, Luo H, Shi C, Xu Y (2017) Necroptosis in neurodegenerative diseases: A potential therapeutic target. *Cell Death and Disease* 8(6): e2905.

Zhang Z, Chopp M, Gautam S, Zaloga C, Zhang R, Schmidt H, Förstermann U (1994) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Research* 654(1): 85–95.

Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkermann A, Ma D (2015) Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death and Disease* 6: e1975.

Zhou W, Yuan J (2014) Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 35: 14–23.

Zhou Z, Lu J, Liu W, Manaenko A, Hou X, Mei Q, Hu Q (2018) Advances in stroke pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics* 191: 23–42.