



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

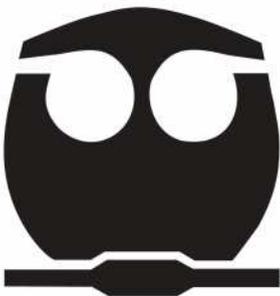
Efecto del consumo crónico de S-alilcisteína (SAC) sobre la memoria, los niveles de neurotrofinas y enzimas antioxidantes en el cerebro de ratas Wistar macho sanas.

TESIS MANCOMUNADA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTAN:**

**MARGARITA GONZÁLEZ MORENO
BRISSA FERNANDA OLVERA RODRÍGUEZ**

CIUDAD DE MÉXICO 2024





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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado *___ Efecto del consumo crónico de S-alilcisteína (SAC) sobre la memoria, los niveles de neurotrofinas y enzimas antioxidantes en el cerebro de ratas Wistar macho sanas___* que presenté para obtener el título/grado de *___Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica___*, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Margarita González Moreno



No. Cuenta: 315180923

Brissa Fernanda Olvera Rodríguez



No. Cuenta: 315345731

(Nombre, firma y número de cuenta de la persona alumna)

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

VOCAL: Profesor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

SECRETARIO: Profesor: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: VICTOR HUGO AVILÉS ROSAS

2° SUPLENTE: Profesor: ULISES MARTINEZ ORTEGA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM Y LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ



SUSTENTANTE (S):

MARGARITA GONZÁLEZ MORENO



BRISSA FERNANDA OLVERA RODRÍGUEZ



Este trabajo fue apoyado parcialmente por CONACYT (No. A1-S-21433 a PDM). Margarita González Moreno recibió una beca como Ayudante del Sistema Nacional de Investigadoras e Investigadores de enero de 2024 a diciembre de 2024

ÍNDICE GENERAL

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Ajo	4
1.1.1 Presentaciones de ajo	4
1.1.2 Extracto de ajo envejecido (EAE)	5
1.2 S-alilcisteína (SAC)	5
1.2.1 Toxicidad	6
1.2.2 Farmacocinética	7
1.2.3 Distribución en tejidos	8
1.2.4 Metabolismo	9
1.3. Estrés oxidante	9
1.3.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN)	9
1.3.2 Sistemas antioxidantes	12
1.3.2.1 Enzimas antioxidantes	12
1.3.3 Consecuencias del estrés oxidante	19
1.3.4 Efecto antioxidante de la SAC	21
1.4. Plasticidad sináptica	25
1.4.1 Factores neurotróficos	26
1.4.2 Síntesis y secreción de neurotrofinas (NT)	26
1.4.3 Señalización de las NT	27
1.5. Memoria	34
1.5.1 Aprendizaje y memoria espacial	35
1.6. Riñón	36
1.6.1 Estructura renal	37
1.6.2 Marcadores bioquímicos de daño renal	38
1.7. Estudios preclínicos y clínicos para el desarrollo de nuevos fármacos	39
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	43
3. HIPÓTESIS	44
4. OBJETIVO GENERAL	45
5. OBJETIVOS PARTICULARES	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1. Reactivos	46
6.2. Síntesis de la SAC	46
6.3. Animales	47
6.4. Diseño experimental	47
6.5. Evaluaciones cognitivas	48
6.5.1 Prueba de memoria a corto y largo plazo.	48
6.5.2 Prueba de memoria espacial y aprendizaje espacial	48
6.6. Obtención de las muestras.	49
6.6.1 Orina	49
6.6.2 Plasma	49
6.6.3 Órganos	50
6.7. Actividad de las enzimas antioxidantes en plasma	50

6.7.1 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).	50
6.7.2 Actividad de la catalasa (CAT)	50
6.7.3 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	50
6.7.4 Actividad de la glutatión S- transferasa (GST).	51
6.8. Proteínas oxidadas	51
6.9. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E).	51
6.10. Inmunohistoquímica	52
6.11. Proteínas urinarias	52
6.12. Análisis estadístico	53
7. RESULTADOS	54
7.1. Evaluaciones cognitivas	54
7.1.1 Memoria a corto y largo plazo	54
7.1.2 Memoria espacial y aprendizaje: Cuadrante de Morris	55
7.2. Expresión de neurotrofinas y enzimas antioxidantes en cerebro	57
7.2.1 Corteza frontal	57
7.2.2 Estriado	59
7.2.3 Hipocampo (CA1, CA2 y GD)	60
7.3 Daño morfológico en cerebro	64
7.4. Expresión de enzimas antioxidantes en riñón	65
7.5. Nivel de proteínas en orina	66
7.6. Daño morfológico en riñón	67
7.7. Actividad de las enzimas antioxidantes y el nivel de proteínas oxidadas en plasma	68
7.8. Peso corporal	69
8. DISCUSIÓN	70
9. CONCLUSIONES	76
10. REFERENCIAS	77

ABREVIATURAS

<p>ADN Ácido desoxirribonucleico.</p> <p>AKT Serina-treonina proteínas cinasa.</p> <p>BDNF Factor neurotrófico derivado del cerebro.</p> <p>CAT Catalasa.</p> <p>CDNB 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno.</p> <p>DNP 2,4 Dinitrofenilhidrazina.</p> <p>EAE Extracto de ajo envejecido.</p> <p>EDTA Ácido etilendiaminotetraacético.</p> <p>ERN Especies reactivas de nitrógeno.</p> <p>ERO Especies reactivas de oxígeno.</p> <p>GD Giro dentado.</p> <p>GDNF Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial.</p> <p>GPx Glutation peroxidasa.</p> <p>GST Glutation S- transferasa.</p> <p>H&E Hematoxilina y eosina.</p> <p>i.g. Intragástrica.</p>	<p>i.p. Intraperitoneal.</p> <p>NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido.</p> <p>NBT Nitroazul de tetrazolio.</p> <p>NF-κB Factor nuclear kappa B.</p> <p>NGF Factor de crecimiento nervioso.</p> <p>NT Neurotrofinas.</p> <p>SAC S-alilcisteína.</p> <p>SSI Solución salina isotónica.</p> <p>SOD Superóxido dismutasa.</p> <p>TCA Ácido tricloroacético.</p> <p>TrK Receptor de tropomiosina cinasa.</p> <p>v.o Vía oral.</p> <p>H_2O_2 Peróxido de hidrógeno.</p> <p>O_2 Oxígeno.</p> <p>$\cdot OH$ Radical hidroxilo.</p> <p>$ONOO^-$ Peroxinitrito.</p>
--	---

RESUMEN

Ya se ha descrito el efecto protector de la S-alilcisteína (SAC), el principal compuesto organosulfurado del extracto de ajo envejecido, en diferentes modelos de daño cerebral, renal, y hepático, entre otros. Dicho efecto se ha asociado a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, que han sido los principales mecanismos de acción estudiados de la SAC. Sin embargo, un mecanismo poco estudiado de la SAC es su efecto neurotrófico, el cuál activa los mecanismos de neuroplasticidad. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto neurotrófico de la SAC, midiendo la memoria y los niveles de neurotrofinas en diferentes regiones cerebrales en animales macho sanos que consumieron el compuesto. Adicionalmente, evaluar su efecto sobre la expresión y/o actividad de algunas enzimas antioxidantes en cerebro, riñón y plasma.

La SAC (100, 200 y 400 mg/Kg) se administró durante 90 días por vía intragástrica (i.g.) en ratas Wistar macho sanas de 10 semanas. Se determinó la memoria a corto y largo plazo, así como la memoria espacial de los animales. En cerebro se cuantificaron los niveles de las neurotrofinas factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), la enzima antioxidante superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2) y se realizó el análisis histológico para descartar el daño morfológico en estriado, corteza frontal e hipocampo. Adicionalmente, se evaluaron los niveles renales de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (SOD1), SOD2 y glutatión peroxidasa (GPx) y se elaboró el análisis histológico para descartar el daño morfológico en riñón; así como la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y GPx en plasma.

La SAC mejoró la memoria a corto plazo (100 y 200 mg/Kg) y la memoria espacial (100 y 400 mg/Kg). No tuvo efecto sobre la memoria a largo plazo. También aumentó el nivel de NGF en corteza frontal (100 y 200 mg/Kg) y en las regiones CA1 (100 y 200 mg/kg) y CA2 (100 mg/Kg) del hipocampo. Además, indujo un incremento de GDNF en corteza frontal (400 mg/Kg) y en la región CA1 del hipocampo (100 y 200 mg/Kg). Adicionalmente, la SAC aumentó el nivel de la enzima antioxidante SOD2 en corteza frontal (100 y 400 mg/Kg) y estriado (100, 200 y 400 mg/Kg). Ninguna de las dosis evaluadas de SAC causó daño en las regiones estudiadas (estriado, corteza frontal e hipocampo).

Por otro lado, la SAC aumentó la cantidad de SOD1 en riñón (200 y 400 mg/Kg) y la excreción de proteínas en la orina (200 mg/Kg). No se observó daño morfológico en riñón con ninguna de las dosis evaluadas.

Finalmente, en plasma la SAC aumentó la actividad de SOD (100 y 200 mg/Kg). No se observaron cambios en la actividad de CAT, GST y GPx, así como el nivel de proteínas oxidadas. Ninguna dosis de SAC modificó el peso corporal de las ratas. Estos resultados indican que el consumo crónico de SAC mejora la memoria a corto plazo y la memoria espacial en animales sanos, efecto que podría estar asociado con el incremento de NGF y GDNF en el hipocampo; y sugirieron que este compuesto podría ser una alternativa terapéutica en aquellos padecimientos que cursan con una disminución de la memoria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ajo

El ajo (*Allium sativum L*) se ha utilizado ampliamente desde la antigüedad en la medicina tradicional basada en plantas (Melguizo-Rodríguez et al., 2022). Diferentes estudios experimentales y clínicos muestran beneficios preventivos y de tratamiento en distintas enfermedades, sugiriendo que el consumo de preparados de ajo puede ser favorable (Amagase, 2006).

El ajo contiene diferentes compuestos bioactivos como: organosulfurados, fenólicos, saponinas y polisacáridos, siendo los compuestos organosulfurados los principales componentes activos (Hernández-Cruz et al., 2022; Shang et al., 2019).

Los bulbos del ajo como medicina tradicional se han utilizado como protector cardiovascular, para reducir la presión arterial, para mantener los niveles de azúcar en sangre, para disminuir los niveles de colesterol en sangre, como antioxidante, antihelmíntico, antimicrobiano, antiinflamatorio, contra el reumatismo, como tratamiento para el resfriado, dolor de muelas y dolor de oído (Hernández-Cruz et al., 2022).

1.1.1 Presentaciones de ajo

Las presentaciones derivadas del ajo más comunes son: el polvo, los aceites, los macerados y el extracto de ajo envejecido (EAE). El contenido de compuestos organosulfurados en cada presentación es diferente y dependerá de las reacciones enzimáticas y las condiciones de extracción a las que se sometan los dientes de ajo (Hernández-Cruz et al., 2022).

La composición del ajo en polvo es igual a la de los dientes de ajo frescos ya que éstos se deshidratan a bajas temperaturas; en cambio, los aceites y el macerado de ajo se obtienen convirtiendo los tiosulfatos solubles en agua en sulfuros liposolubles mediante destilación al vapor o por incubación en aceite vegetal, respectivamente. Finalmente, el EAE se obtiene por extracción prolongada de ajo fresco en etanol a temperatura ambiente, tiempo en el que a través de reacciones enzimáticas se obtienen compuestos organosulfurados polares como la S-alilcisteína (SAC) (Borek, 2001; Hernández-Cruz et al., 2022).

1.1.2 Extracto de ajo envejecido (EAE)

En este producto, los dientes de ajo fresco se añejan en etanol al 15-20% durante 20 meses en tanques de acero inoxidable. Durante el proceso de añejamiento compuestos como la γ -glutamyl-S-alilcisteína y la γ -glutamyl-S-1-propenilcisteína son transformados enzimáticamente en compuestos polares provocando un aumento de los compuestos organosulfurados: SAC, S-1-propenilcisteína y S-alil mercaptocisteína (Tabla 1), los principales componentes en el EAE (Amagase, 2006; Borek, 2001).

Tabla 1. Principales cambios en la composición del Extracto de Ajo Envejecido

Compuesto	Tiempo de incubación (meses)				
	0	1	3	12	24
	(mg/g extracto seco)				
γ -Glutamyl-S-alilcisteína	12.7	5.8	1.1	0	0
S-alilcisteína	0.2	5.9	7.2	7.1	7.2
γ -Glutamyl-S-1-propenilcisteína	15.9	3.4	0.5	0	0
S-1-Propenilcisteína	0.5	6.7	8.1	6.5	4.4
S-alil mercaptocisteína	0.01	0.6	1.2	1.7	1.9

*Los dientes de ajo se cortan en trozos (2x2x1 mm) y se colocan en etanol al 20% (12 mL/g) en recipiente cerrado y se almacenan a temperatura ambiente (Tomada de Colín-González et al., 2012; Lawson, 1998).

1.2 S-alilcisteína (SAC)

La SAC es el compuesto organosulfurado más abundante del EAE, se forma a partir del catabolismo de la γ -glutamyl-S-alilcisteína por la γ -glutamylcisteín transpeptidasa (Figura 1). En el laboratorio la obtenemos mediante síntesis química a partir de la reacción entre la L-cisteína y el bromuro de alilo, seguido de recristalización en etanol-agua (Maldonado et al., 2011, 2003). La SAC es un polvo cristalino blanco

con olor característico, no tiene capacidad higroscópica y su punto de fusión es de 223.3 - 223.7°C (Chen et al., 2022; Colín-González et al., 2012).

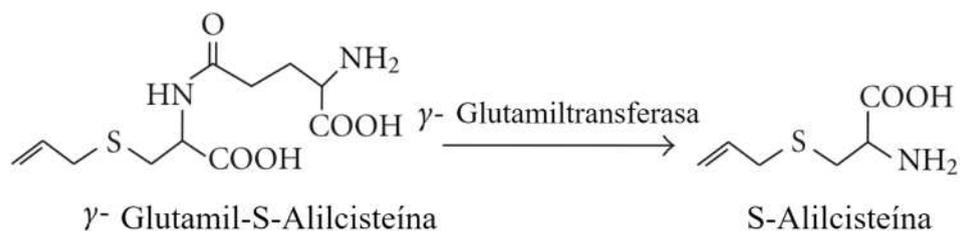


Figura 1. Catabolismo de la S-alilcisteína en el extracto de ajo envejecido (Imagen modificada de Colín-González et al., 2012).

1.2.1 Toxicidad

La SAC es un compuesto 30 veces menos tóxico que otros compuestos presentes en el ajo como la alicina o el dialildisulfuro (Colín-González et al., 2012).

En un estudio realizado para determinar la toxicidad aguda de la SAC en ratones y ratas mediante su administración por vía oral (*v.o.*) e intraperitoneal (*i.p.*) en dosis únicas de 2.1 - 15 g/Kg se encontró que los valores de dosis letal media (Tabla 2) fueron similares a los de otros aminoácidos como la metionina (Kodera et al., 2002).

Tabla 2. Dosis letal media (DL₅₀) de la SAC en ratones y ratas.

		LD50 (g/Kg de peso corporal)	
		V.O	I.P.
Ratones	Macho	8.89	6.91
	Hembra	9.39	3.65
Ratas	Macho	10.94	3.34
	Hembra	9.5	3.34

DL₅₀ de una dosis única (Tomada de Colín-González et al., 2012).

También se evaluó la toxicidad subaguda de la SAC (0.25, 0.5, 1 y 2 g/Kg), tras su administración por *v.o.* durante un mes. Se encontró que dosis mayores a 0.5 g/kg de SAC inducen toxicidad subaguda de forma dosis dependiente (SAC 0.5-2 g/kg). Los cambios observados fueron los siguientes: 1) disminución en el peso corporal y disminución en el consumo de alimentos en roedores macho y hembra; 2) el

examen hematológico reveló una disminución en el volumen corpuscular medio (MCV), el hematocrito (Ht), la hemoglobina (Hb), la hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) en roedores macho y hembra; 3) el uroanálisis reveló aumento del pH y disminución del urobilinógeno en animales macho y disminución de proteínas y urobilinógeno en animales hembra; y 4) los cambios bioquímicos fueron: disminución de los niveles de nitrógeno de urea en sangre, creatinina y proteína total en roedores macho y hembra. Además hubo un incremento en albúmina y K^+ en animales macho y aumento en fosfatasa alcalina, colesterol total, lípidos totales y glucosa en roedores hembra (Colín-González et al., 2012; Koderá et al., 2002).

1.2.2 Farmacocinética

La SAC se absorbe rápida y fácilmente después de su administración oral sin descomposición debido a cambios en el pH del tracto gastrointestinal (Koderá et al., 2002; Nagae et al., 1994). La SAC alcanza el plasma rápidamente y posteriormente se distribuye al hígado y riñón principalmente. Nagae y colaboradores (1994) informaron que la biodisponibilidad de la SAC es alta (87-103%) en ratones, ratas y perros, y sugieren que sufre metabolismo de primer paso y que existe poca diferencia de absorción entre ratas y ratones, mientras que los perros muestran una vida media más larga.

Un estudio farmacocinético realizado en humanos después de la administración oral de una preparación de ajo que contenía SAC reveló que su vida media fue mayor a 10 h y el tiempo de eliminación fue mayor a 30 h (Koderá et al., 2002). Estos resultados son similares a los obtenidos en perros, donde la vida media de la SAC fue de aproximadamente 10 h y el tiempo de eliminación fue mayor a 24 h. El contenido total de SAC en la sangre obtenida de voluntarios sanos al $T_{máx}$ fue de aproximadamente 450 μ g (contenido en $T_{máx}$, 23 ng/mL de plasma; peso corporal: 65 Kg; volumen de sangre total: $\frac{1}{3}$ del peso corporal), sugiriendo una alta biodisponibilidad en humanos (Colín-González et al., 2012; Koderá et al., 2002).

En ratas, la farmacocinética de la SAC después de su administración oral muestra un perfil de concentración de tres fases: dos fases muy rápidas (absorción y distribución) seguidas de una fase lenta de eliminación. Por vía intravenosa (*i.v.*), muestra un perfil de concentración de dos fases: una fase rápida de distribución y una fase lenta de eliminación. Los parámetros farmacocinéticos de la SAC (100

mg/Kg por *v.o* y *i.v.*) se presentan en la Tabla 3 (Colín-González et al., 2012; Nagae et al., 1994).

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos tras la administración oral e *i.v.* de SAC en el suero de ratas.

Parámetro	Administración oral	Administración <i>i.v.</i>
Volumen de distribución (V_d)	1.2 L	1.3 L
Vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$)	2.7 h	2.6 h
Liquidación total	0.3 L/h	0.3 L/h
Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	100.1 mg/L a los 30 min	
Valor ABC_{0-t}	293.5 mg*h/L	322.6 mg*h/L

ABC_{0-t} : área bajo la curva de concentración plasmática vs. tiempo, desde el tiempo cero hasta la última concentración cuantificable (Tomada de Colín-González et al., 2012).

1.2.3 Distribución en tejidos

Después de la administración por *v.o.*, la SAC se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y se detecta en varios tejidos hasta 8 h después de su administración (Colín-González et al., 2012). En ratas, después de una dosis oral única de SAC (50 mg/Kg), el área bajo la curva de concentración plasmática vs. tiempo, desde el tiempo cero hasta la última concentración cuantificable (ABC_{0-t}) es 169.2 mg*h/Kg en el riñón; mientras que la mayor concentración máxima se observa en riñón ($C_{m\acute{a}x} = 65.7$ mg/Kg a los 10 min), seguido del hígado, corazón, bazo, pulmón y cerebro. La vida media de eliminación varía entre los tejidos, siendo el hígado el órgano que muestra el valor de $T_{1/2}$ más largo (2.2 h), mientras que el valor de $T_{1/2}$ más corto (1.2 h) se observa en el cerebro (Tabla 4). Por otro lado, para la administración *i.v.*, el riñón también muestra la exposición más alta ($ABC_{0-8h} = 171.9$ mg*h/Kg), mientras que el corazón muestra el valor de $T_{1/2}$ más largo (2.5 h) (Colín-González et al., 2012; Nagae et al., 1994).

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos después de una dosis oral única de SAC.

Parámetro	$C_{m\acute{a}x}$	ABC_{0-t}	$T_{1/2}$
Tejido	(mg/Kg)	mg*h/Kg	(h)
Riñón	65.7	169.2	2.1
Hígado	58.1	103.5	2.2
Corazón	43.3	118.5	2.1
Bazo	43.3	100.6	1.9
Pulmón	35.1	94.3	1.3
Cerebro	26.7	70.7	1.2

Dosis única de SAC 50 mg/Kg. $C_{m\acute{a}x}$: concentración máxima a los 10 min; ABC_{0-t} : área bajo la curva de concentración plasmática vs. tiempo, desde el tiempo cero hasta la última concentración cuantificable; $T_{1/2}$: tiempo de vida media de eliminación (Tomada de Colín-González et al., 2012).

1.2.4 Metabolismo

La principal vía de eliminación de la SAC es renal, después de su administración oral e i.v. en ratones, ratas y perros; siendo el principal metabolito detectado en ratas, la N-acetil-SAC (Nagae et al., 1994). Se propone que la SAC es transformada en N-acetil-SAC mediante la N-acetiltransferasa hepática; después, una porción de N-acetil-SAC es desacetilada a SAC mediante una acilasa renal, seguido de su reabsorción. Se han observado pequeñas cantidades de SAC (menos del 1%) en la orina de ratas (Colín-González et al., 2012; Nagae et al., 1994).

1.3. Estrés oxidante

El estrés oxidativo se presenta cuando ocurre un desequilibrio entre la producción de moléculas oxidantes (aumentan) y/o los sistemas antioxidantes (disminuyen) de forma progresiva y continua (Murphy, 2009; Wojsiat et al., 2018).

1.3.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN)

En la atmósfera está presente el dióxígeno (O_2) en un 21%. El O_2 en el aire se obtiene de la oxidación del agua por el P680 de las plantas, algas y cianobacterias

empleando la energía solar. Los organismos aeróbicos reducen el O_2 a H_2O y la energía de esta reacción, la emplean para formar ATP (Hansberg, 2008).

El O_2 es tóxico a cualquier concentración, ya que es un radical libre que contiene dos electrones desapareados dentro de su estructura. Un radical libre se forma por ruptura homolítica de un enlace (se requiere energía) o por una reacción de oxidorreducción con la transferencia de un solo electrón (Miranda, 2008). El efecto tóxico del O_2 se debe a la formación de las ERO, que son moléculas parcialmente reducidas y más reactivas que éste (Hansberg, 2008).

Las ERO se generan endógenamente a partir del metabolismo celular, como la fosforilación oxidante en las mitocondrias, la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en los peroxisomas, entre otros o de forma exógena por toxinas ambientales, la radiación ionizante (IR), la radiación ultravioleta (UV) y los agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN. Concentraciones bajas a moderadas de ERO (condiciones fisiológicas) oxidan diferentes proteínas encargadas de activar múltiples vías bioquímicas asociadas con la viabilidad, la proliferación, la diferenciación y la adaptación metabólica de las células. Por otro lado, concentraciones altas de ERO se vuelven tóxicas y causan daño oxidativo a los componentes celulares fundamentales, incluidos lípidos, proteínas y ADN, lo que conlleva a la detención del ciclo celular y la muerte celular (Rizwana et al., 2022; Richardson et al., 2015).

Se consideran ERO (Tabla 5) al: oxígeno atómico (O); radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que se genera por la adición de 1 electrón al O_2 ; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se genera por la adición de 1 electrón al $O_2^{\cdot-}$; radical hidroxilo ($\cdot OH$) que se genera por la adición de 1 electrón al H_2O_2 ; ozono (O_3) que se genera de la unión de una moléculas de O al O_2 ; y oxígeno singulete (1O_2) que se produce de la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 (Hansberg, 2008).

Adicionalmente, el O_2 reacciona con el nitrógeno formando compuestos más reactivos, denominados ERN como (Tabla 5): 1) monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO^{\cdot}), que lo generan las isoformas de la sintasa de óxido nítrico (SON); 2) peroxinitrito ($ONOO^-$), que se forma de la interacción entre el NO^{\cdot} y el $O_2^{\cdot-}$; dióxido

de nitrógeno ($NO_2\cdot$) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). El $NO\cdot$ puede reaccionar con metales de transición, como los encontrados en el grupo hemo o los centros Fe-S de algunas proteínas inactivándolas o bien puede convertirse en una especie más oxidante como el $NO_2\cdot$ o N_2O_3 que nitrar proteínas, las cuales deben ser removidas (Hansberg, 2008).

Tabla 5. Características de las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Tomada de Hansberg, 2008).

Especie	Fuente	Concentración intracelular	Reactividad	Eliminación
O_2	Externa, catalasa	10 a 20 μ M	Hemo, Fe (II), flavinas, pterinas, alcoxilos, $NO\cdot$	Respiración, oxidasa
O_3	Externa	≈ 0	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos y demás compuestos celulares	Ascorbato
1O_2	Fotosensibilización, descomposición H_2O_2 ($HOBr$), dismutación espontánea del $O_2\cdot$, peroxilípidos, $NO_2 + ONOO^-$	pM, $t_{1/2} < 1 \mu$ seg	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos y demás compuestos celulares	Carotenos, tocoferoles, glutatión, ascorbato
$O_2\cdot$	Externa e interna: cadena respiratoria, NADPH oxidasa, xantina oxidasas, lipoxigenasa, P_{450} , hemoglobina, peroxidasas	pM - μ M	$O_2^{\cdot-}$, $NO\cdot$, Fe (III), [4Fe-4S], quinonas, difenoles	Superóxido dismutasa, dismutación espontánea
H_2O_2	Externa e interna: dismutación del $O_2\cdot$, oxidasas	nM a μ M	Ascorbato, hemo, Fe-S	Catalasa, peroxidasas, peroxirredoxinas
$\cdot OH$	Reacción de Fenton	≈ 0	Cualquier compuesto vecino	Glutatión, ascorbato
$NO\cdot$	SON	nM	$O_2^{\cdot-}$, hemo, Fe(III), Fe-S, tioles	Hemoglobina, flavohemoglobina
$ONOO^-$	$NO\cdot + O_2^{\cdot-}$	pM	CO_2 , $NO\cdot$ Fe-S, tioles, lípidos	Espontánea
$NO_2\cdot$	$ONOO^- + CO_2$	pM	Tyr, Trp, Cys, hemo, lípidos	Glutatión, ascorbato

1.3.2 Sistemas antioxidantes

Bajo condiciones fisiológicas, los sistemas antioxidantes endógenos son los responsables de una adecuada remoción de las ERO y ERN (Santamaría del Ángel, 2008). Para esto, los antioxidantes se pueden clasificar en:

- Antioxidantes enzimáticos endógenos principalmente la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Karadag et al., 2009; Rizwana et al., 2022).
- Antioxidantes no enzimáticos endógenos como el glutatión (GSH, tripéptido de bajo peso molecular: γ -glutamil-cisteinil-glicina) o el ácido úrico (Karadag et al., 2009; Rizwana et al., 2022).
- Antioxidantes no enzimáticos exógenos como la vitamina E, el ácido ascórbico, el ácido lipoico, los flavonoides, los polifenoles o los carotenoides.

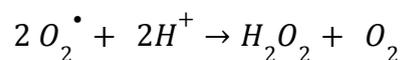
Los antioxidantes ejercen su función a través de diferentes mecanismos como se menciona a continuación:

- 1) Sirven como barreras físicas para prevenir la generación de ERO o el acceso de las ERO a sitios biológicos importantes. Por ejemplo, filtros UV, membranas celulares.
- 2) Funcionan como trampas químicas que “absorben” energía y electrones apagando las ERO. Por ejemplo, carotenoides y antocianidinas.
- 3) Actúan como sistemas catalíticos que neutralizan o desvían las ERO. Por ejemplo, las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx.
- 4) Se unen o inactivan iones metálicos previniendo la generación de ERO. Por ejemplo, ferritina, transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina.

1.3.2.1 Enzimas antioxidantes

Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD se encuentran entre las defensas más importantes contra las ERO (Tabla 6). Las SOD son proteínas que dismutan el anión $O_2^{\bullet -}$, como se observa a continuación:



La SOD1 o Cu/Zn-SOD tiene un cobre y un zinc en su sitio catalítico y se ubica en el citoplasma celular. Su expresión es inducida por factores como el choque térmico, metales pesados, radiaciones UV y estrés oxidante y es regulada por el factor de transcripción nuclear factor 2 relacionado con el factor E2 (Nrf2), factor nuclear 1 (NF1), factor de transcripción (Sp1), proteína activadora 1 y 2 (AP1, AP2), factor de choque térmico (HSF) y factor nuclear kappa B (NF-κB) (Gómez & Cuevas, 2008).

La SOD2 o MnSOD contiene manganeso en su centro catalítico y se encuentra en la mitocondria. Posee regiones ricas en GC (guanina y citosina) y es regulada por NF-κB, SP-1, AP-2, proteína potenciadora de unión a CCAAT (C/EBP) y NF-1. Algunos factores que inducen su expresión son el lipopolisacárido (LPS), metales pesados, factores de crecimiento y diversas citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (*TNF – α*), interleucina-1 (IL-1), IL-6, entre otras (Gómez & Cuevas, 2008).

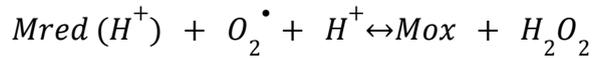
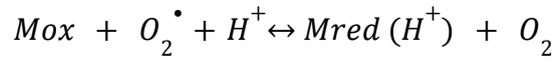
SOD3 o ECSOD contiene un cobre y un zinc en su centro catalítico y se localiza principalmente en el espacio extracelular. En humanos su gen está formado por 3 exones y 2 intrones y posee elementos reguladores como el elemento de respuesta antioxidante (ARE) ya que su expresión es regulada por Nrf2, elementos de respuesta xenobiótica, así como sitios para los factores de transcripción AP1 y NF-κB (Gómez & Cuevas, 2008).

Tabla 6. Características de las SOD en humanos (Tomada de Gómez & Cuevas, 2008).

Nombre	Ubicación	Metal en centro catalítico	Peso total (Kda)	Ubicación del gen en humanos	Características
SOD1, CuZnSOD	Citoplasma, núcleo, peroxisomas y membrana externa mitocondrial	Cu y Zn	32	Cromosoma 21	Dímero
SOD2, MnSOD	Membrana interna mitocondrial	Mn	89	Cromosoma 6	Homotetrámero
SOD3, ECSOD	Extracelular, asociada a heparina, sangre entre otros	Cu y Zn	135	Cromosoma 4	Glucoproteína tetramérica

Reacción catalítica de las SOD. El $O_2^{\bullet -}$ mitocondrial o citosólico es dismutado por las SOD en H_2O_2 que a su vez es metabolizado en H_2O por la CAT o la GPx (Figura 2).

La reacción ocurre en 2 pasos enzimáticos de primer orden con respecto a $O_2^{\bullet -}$:



Mox: estado oxidado del metal ($Cu^{2+} Zn^{2+}$ o Mn^{3+})

Mred: estado reducido del metal (Gómez & Cuevas, 2008).

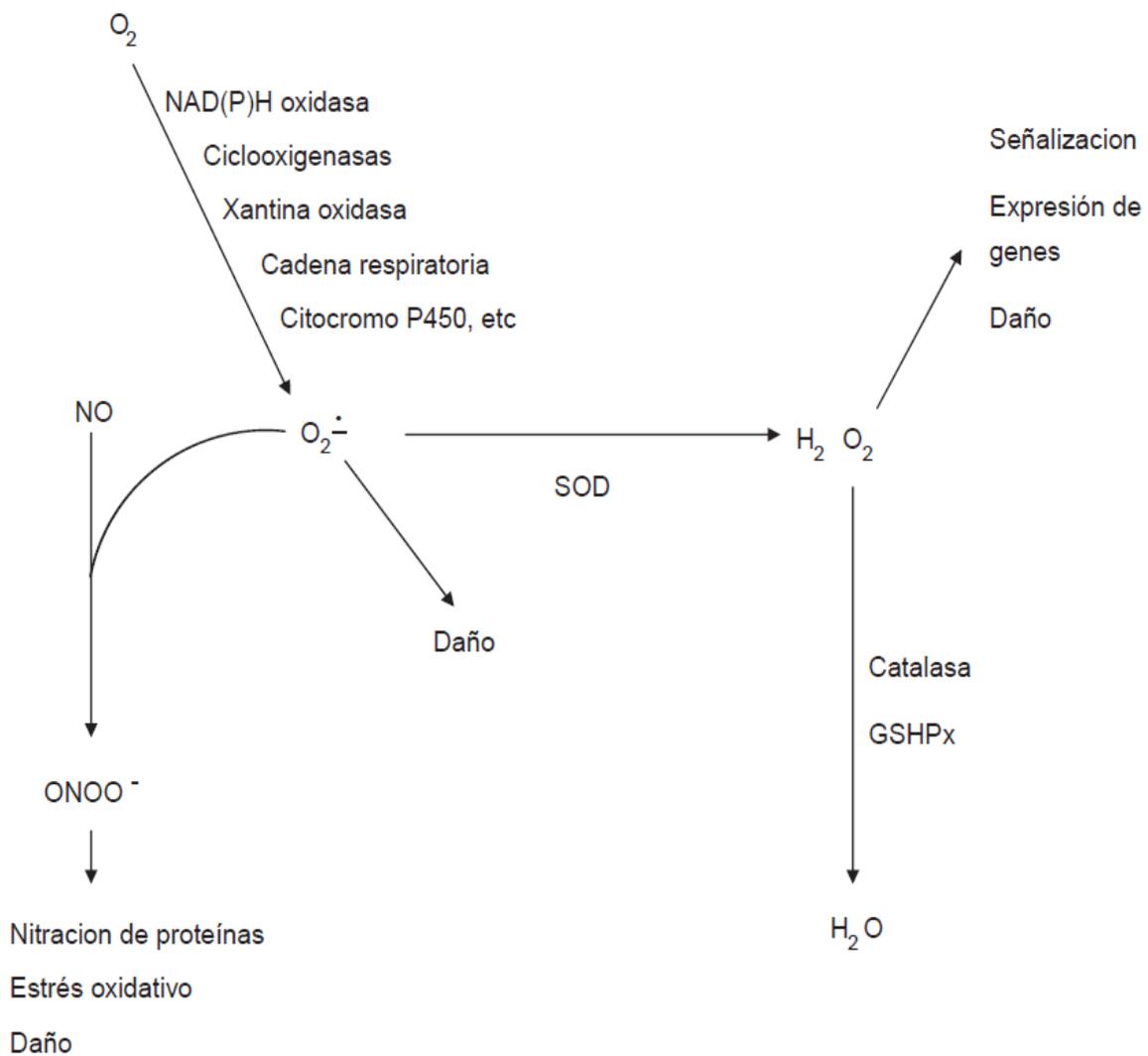


Figura 2. Destoxificación del anión superóxido, posibles interacciones y efectos celulares (Tomada de Gómez & Cuevas, 2008).

Mecanismo tomando como modelo a la SO1: el O_2^\bullet llega al sitio activo de la enzima, donde se une electrostáticamente a la Arg143. El O_2^\bullet dona su electrón desapareado al Cu^{2+} pasando a Cu^+ . Esta transferencia ocasiona que el enlace Cu-His63 se rompa, provocando que el nitrógeno de la His63 se protone. El O_2 formado se disocia de la Arg143 y se libera. La segunda parte de la reacción inicia con otra molécula de O_2^\bullet que llega al centro catalítico y se une electrostáticamente con la Arg143. A la par ocurre la protonación de una molécula de H_2O (H_3O^+) en la proximidad del centro catalítico. El electrón que recibió el Cu en la primera parte de la reacción es ahora transferido a la segunda molécula de O_2^\bullet , permitiendo la oxidación del metal a Cu^{2+} . El O_2^\bullet posee ahora dos electrones y puede formar dos enlaces con $2 H^+$ (donados por el H_3O^+) restableciendo el sitio activo para otro ciclo catalítico (Gómez & Cuevas, 2008).

Expresión de SOD en cerebro. Las ERO desempeñan funciones importantes como moléculas mensajeras en eventos fisiológicos como la plasticidad sináptica y la memoria, pero también pueden ser tóxicas en eventos patológicos, como isquemia, lesión cerebral y daño celular (Hu et al., 2007). En ratones envejecidos que sobreexpresan SOD1 y SOD3, se mejora la potenciación a largo plazo en el hipocampo. Pero la sobreexpresión de SOD2 no tiene efecto sobre la plasticidad sináptica y la formación de la memoria en ratones jóvenes. Tampoco rescata deficiencias relacionadas con la edad y no tiene efecto sobre la plasticidad sináptica y la memoria en ratones viejos. Sin embargo, puede proteger contra la toxicidad aguda y los factores estresantes en regiones del cerebro, disminuyendo el O_2^\bullet mitocondrial en las neuronas del hipocampo y aumentando la vida útil de los ratones.

Expresión de SOD en riñón. El riñón es un órgano altamente metabólico. El tejido renal tiene una gran demanda de energía, lo que implica altos niveles de oxidación dentro de las mitocondrias celulares sobre todo dentro de las células del túbulo proximal. Esto por su relación con la reabsorción de nutrientes críticos después de

la filtración glomerular (He et al., 2017; Kitada et al., 2020). SOD1 representa del 60 al 80% de la actividad de la SOD en riñón, es la isoforma predominante en la pared vascular y representa la mayor parte de la actividad de SOD en el riñón. Un aumento de esta enzima reduce los niveles de O_2^{\bullet} (Carlström et al., 2010). Por otro lado, la disfunción de SOD2 produce estrés oxidativo mitocondrial y esta enzima está disminuida en la enfermedad renal; sin embargo, no es la única enzima implicada en esta patología (Kitada et al., 2020).

Catalasa (CAT)

Las peroxidasas (catalasa y peroxidasas) son enzimas tetraméricas que eliminan hidroperóxidos a través de una reacción de oxidorreducción, empleando diferentes agentes reductores.

La CAT es una hemoproteína que evita la formación de $\cdot OH$ al descomponer H_2O_2 en O_2 y H_2O . Para ello, requiere dos moléculas de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante (Peraza, 2008).

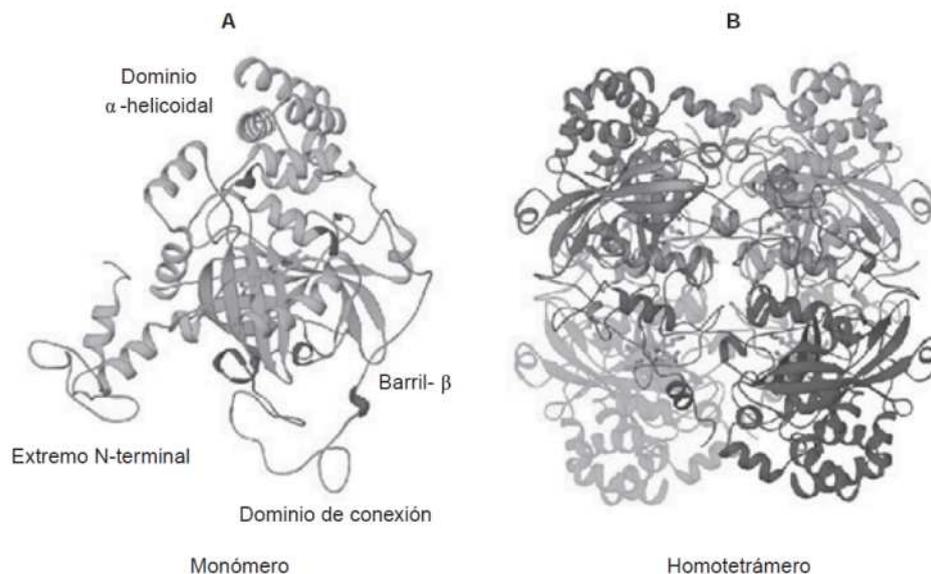
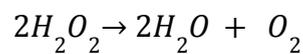
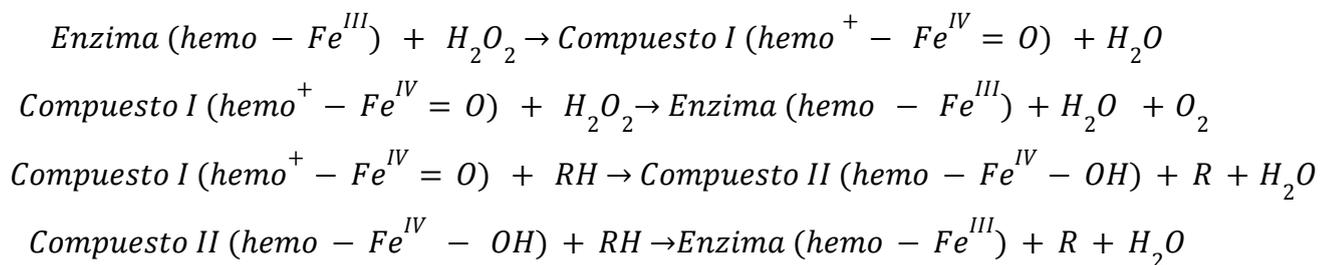


Figura 3. Representación del monómero (A) y del tetrámero (B) de catalasa (CAT) de eritrocitos humanos en la que se observa las α -hélices y hojas β plegada (Tomada de Peraza, 2008).

Reacción catalítica de la CAT. Es una de las enzimas más rápidas que existen. Una sola molécula cataliza alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo. La reacción inicia con el rompimiento del enlace O-O del H_2O_2 , liberando H_2O y el átomo de O queda unido al Fe del grupo hemo. En esta reacción se transfieren dos electrones de la enzima a un O y se forma H_2O . Uno de los electrones proviene del Fe ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{4+}$) y el segundo de la porfirina. A esta se le denomina compuesto I y está formada por un ferroxilo y un radical catiónico de porfirina. El compuesto I puede ser reducido por otra molécula de H_2O_2 (mediante la transferencia simultánea de dos electrones) regenerando a la enzima para iniciar otro ciclo catalítico; o bien puede ser reducido por un compuesto (RH: fenoles o aminas aromáticas) que transfiere un electrón en dos reacciones secuenciales. Las dos reacciones forman un intermediario parcialmente reducido llamado compuesto II (Peraza, 2008).



Glutación peroxidasa (GPx)

Selenoproteína que fue descubierta 1957 en tejidos animales (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008). La GPx requiere de GSH para reducir H_2O_2 a H_2O . El GSH es el donador de H^+ , de esta manera ocurre simultáneamente la reducción del H_2O_2 a H_2O y la oxidación del GSH a glutación oxidado (GSSG) (Figura 4) (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008).

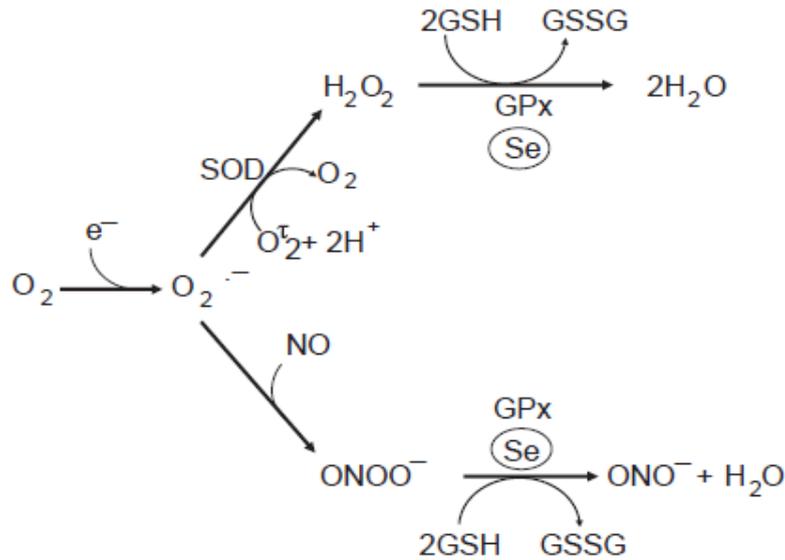


Figura 4. Participación del Se en la defensa citosólica contra especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Tomada de Cárdenas-Rodríguez et al., 2008).

La GPx pertenece a una familia que se caracteriza por poseer una tríada catalítica compuesta por selenocisteína, glutamina y triptófano, donde la actividad depende del Se. Se han reportado cuatro isoenzimas en mamíferos : GPx clásica o citosólica (GPx-1 o cGPx), GPx gastrointestinal (GPx-2 o GPx-GI), GPx plasmática (GPx-3 o pGPx) y GPx de fosfolípidos (GPx-4 o PHGPx) (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008). La GPx-1 es abundante en hígado, riñón, pulmón y eritrocitos sometidos a estrés oxidante. GPx modula la activación de NF- κ B, ya que en su activación se inhibe en células tratadas con Se y se induce en ausencia de Se. También se ha visto involucrada en la modulación de la apoptosis ya que su incremento inhibe la apoptosis (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008).

Glutatión S-transferasa (GST)

Las GST son la familia de enzimas desintoxicantes más importantes de la naturaleza. La reacción más importante catalizada por esta superfamilia es la conjugación del GSH a un co-sustrato hidrófobo que posee un centro electrófilo. La conjugación con GSH hace que estos compuestos sean más solubles, facilitando su excreción del organismo (Oakley, 2011). Otras funciones de las GST son: 1) la biosíntesis de hormonas, 2) la degradación de la tirosina y del peróxido, 3) la

reducción de deshidroascorbato y 4) la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos, incluidos carcinógenos y algunos medicamentos (Díaz et al., 2004).

1.3.3 Consecuencias del estrés oxidante

Todos los órganos son susceptibles al daño oxidativo debido a las ERO y ERN que se generan del metabolismo. Sin embargo, tejidos como el cerebro, el riñón o el hígado que presentan un alto metabolismo pueden ser más susceptibles en condiciones de estrés oxidante. A continuación se describe el daño oxidativo que ocurre a diferentes moléculas como lípidos, proteínas y ADN (Ferroni et al., 2023).

Oxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos biológicos es uno de los principales *resultados* del daño tisular mediado por el estrés oxidativo. En el caso de las células cerebrales, estas tienen un alto contenido de lípidos insaturados que las hacen muy susceptibles a las modificaciones oxidativas. La peroxidación lipídica mediada por el $\cdot\text{OH}$ daña las membranas celulares o genera varios productos secundarios altamente reactivos como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2 hexenal (HHE), el 4-hidroxil-2-non-enal (HNE), la acroleína, los isoprostanos y los neuroprostanos (Singh et al., 2022).

Oxidación de proteínas. El aumento de ERO conduce a la oxidación de proteínas. La edad y la presencia de enfermedades agudas y crónicas aumenta la oxidación de proteínas que ejercen diferentes efectos según el sitio de daño (Griffiths et al., 2014).

Las proteínas oxidadas deben ser reparadas o eliminadas y esto dependerá de los sistemas de reparación. Algunas proteínas oxidadas resiste la proteólisis debido a que inhiben a las proteasas que las degradan (Zentella de Piña & Piña, 2008) o bien pueden actuar como un inhibidor endógeno de la actividad proteasomal provocando su acumulación (Figura 5) (Singh et al., 2022).

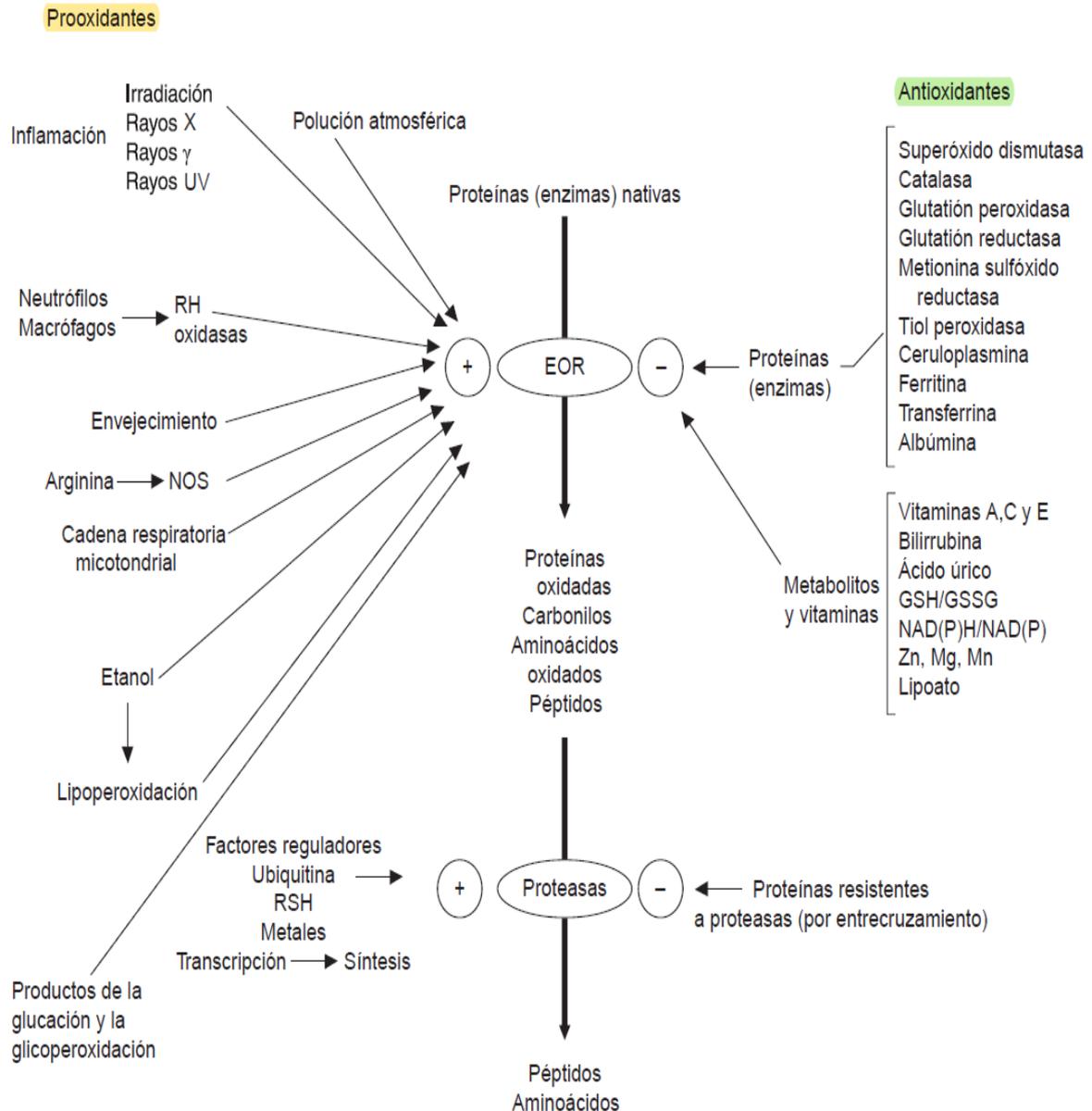


Figura 5. Agentes prooxidantes y activadores de proteasas que favorecen la oxidación y degradación de proteínas (panel izquierdo). Además agentes antioxidantes que evitan la oxidación de proteínas y el caso de las proteínas resistentes a degradación (panel derecho) (Tomada de Zentella de Piña & Piña, 2008).

La acumulación de proteínas oxidadas da lugar a procesos de envejecimiento y a la aparición de múltiples enfermedades (del Arenal-Mena et al., 2020).

Oxidación del ADN. Se refiere a cambios físico-químicos en el ADN, los cuales pueden afectar la interpretación y transmisión de la información genética. El daño al ADN puede ser causado por las ERO provenientes de fuentes endógenas o

exógenas. Las ERO reaccionan con las bases nitrogenadas y la desoxirribosa, causando reacciones oxidativas significativas. Uno de los marcadores que indica daño al ADN es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Esto puede conducir a mutaciones, carcinogénesis, apoptosis, necrosis y enfermedades hereditarias (Juan et al., 2021).

Diversos estudios celulares, moleculares y de comportamiento sugieren que el estrés oxidativo acumulado es uno de los principales factores causales implicados en el inicio y la progresión de los déficits cognitivos durante el envejecimiento o las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad. El hipocampo y el lóbulo frontal del cerebro son más propensos a sufrir daño oxidativo, lo que sugiere un vínculo íntimo con la disminución de las capacidades cognitivas asociadas con la edad, como la adquisición de información, la recuperación de recuerdos declarativos, la atención y las habilidades del lenguaje. Se cree que el deterioro de la memoria asociado a la edad es consecuencia del deterioro funcional de las neuronas y su degeneración. El estrés oxidativo daña las terminales nerviosas mediante disfunción mitocondrial, acumulación anormal de vesículas sinápticas y disminución de la liberación de neurotransmisores, lo que en última instancia induce un déficit de despolarización de la membrana sináptica y causa el deterioro del sistema de neurotransmisión (Mecocci et al., 2018; Singh et al., 2022).

La relación entre ERO y el envejecimiento se ha centrado en la función del hipocampo, porque se sabe que la disminución de la función del hipocampo se correlaciona con biomarcadores de envejecimiento y una serie de trastornos neurodegenerativos (Hu et al., 2006). Los resultados más frecuentes del envejecimiento cerebral son el deterioro de la memoria y el conocimiento; el deterioro del sistema sensorial (ej, pérdida del olfato) y las disfunciones motoras (Ferroni et al., 2023).

1.3.4 Efecto antioxidante de la SAC

El efecto protector de la SAC se ha asociado a su capacidad de actuar como un antioxidante directo e indirecto, a través de los siguientes mecanismos (Colín-González et al., 2012):

- Neutraliza radicales libres, ERO y ERN: antioxidante directo (Figura 6).

- Activa el factor de transcripción nuclear factor 2 relacionado con el factor E2 (Nrf2): antioxidante indirecto (Reyes-Soto et al., 2020., Franco-Enzástiga et al., 2017).
- Aumenta los niveles de enzimas antioxidantes y GSH: antioxidante indirecto.
- Quelata iones Fe^{2+} y Cu^{2+} , evitando la formación de $\cdot OH$, la especie más reactiva de las ERO: antioxidante indirecto (Figura 6).
- Inhibe la producción de ON en cultivos de macrófagos y hepatocitos estimulados con lipopolisacárido o citocinas, efecto asociado con la supresión de la expresión de la SON inducible (SONi).
- Disminuye la expresión de la NADPH oxidasa un complejo enzimático que cataliza la formación de $O_2^{\cdot -}$ en ratas sometidas a nefrectomía 5/6.

Antioxidante directo. La SAC neutraliza especies oxidantes como el $\cdot OH$, el radical peroxilo ($ROO\cdot$), el H_2O_2 , el $ONOO^-$, el $O_2^{\cdot -}$, el ácido hipocloroso (HOCl) y el 1O_2 (Figura 6). Este efecto ha sido asociado al grupo tioalilo que posee la molécula, ya que si el grupo alilo es sustituido por un grupo propilo, la capacidad antioxidante disminuye (Colín-González et al., 2012; Maldonado et al., 2011).

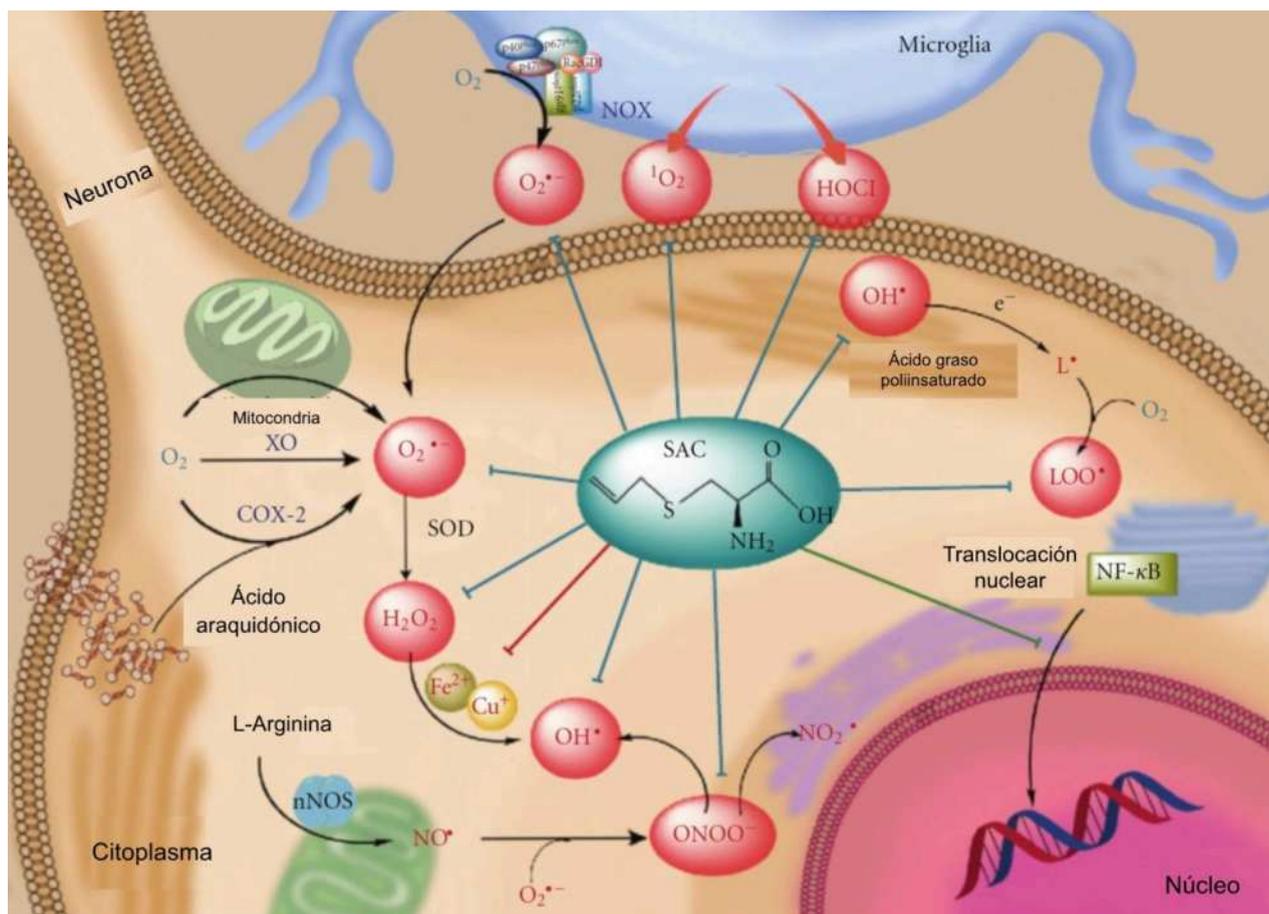


Figura 6. Efecto de la SAC como antioxidante directo al atrapar especies oxidantes e indirecto al quelar hierro (Fe) y cobre (Cu) (Imagen modificada de Colín-González et al., 2012).

Antioxidante indirecto. La SAC activa el factor Nrf2, conocido como el regulador “maestro” del estado redox celular, debido a que regula la expresión de genes antioxidantes (SOD, GPx, CAT, GR, entre otros) y detoxificantes (GST), que protegen a las células contra el daño oxidante generado por las especies oxidantes (Colín-González et al., 2012; Reyes-Soto et al., 2020; Franco-Enzástiga et al., 2017). Se ha encontrado que la SAC aumenta el nivel de GSH y la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GR, y GPx en diferentes tejidos (Colín-González et al., 2012; Gómez-Sierra et al., 2014).

El factor Nrf2 se expresa altamente en órganos detoxificantes como hígado y riñón, así como en órganos comúnmente expuestos a condiciones ambientales externas como la piel, los pulmones y el tracto digestivo, mientras que en cerebro sus niveles son bajos (Colín-González et al., 2012). La SAC (100 mg/Kg, *i.p.*, durante 3 días) es

capaz de activar el factor Nrf2 en hepatocitos de ratas Wistar expuestas a cromo (Colín-González et al., 2012; Kalayarasan et al., 2008). Además, un estudio describió que la administración crónica de SAC (25, 50, 100 y 200 mg/Kg. i.g., durante 90 días) en ratas Wistar macho sanas indujo un incremento significativo en la activación del factor Nrf2 en el hipocampo a partir de la dosis 25 mg/kg y un ligero aumento en estriado con la dosis de 100 mg/kg (Franco-Enzástiga et al., 2017).

En condiciones homeostáticas, el nivel de Nrf2 está controlado principalmente por la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1). Keap1 es reconocido por el complejo ubiquitina ligasa E3 basado en cullin (CUL3). En ausencia de estrés, Nrf2 es ubiquitinado por el complejo Keap1-CUL3 y es degradado a través del proteosoma (Figura 7) (Crisman et al., 2023; Silva-Islas & Maldonado, 2018; Suzuki et al., 2023).

En condiciones de estrés oxidante o en presencia de compuestos electrófilos, Nrf2 se libera de Keap1 por oxidación de algunas de sus Cys (151, 273, 288, 489 o 583) y se transloca al núcleo, donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de los genes de proteínas de fase II y antioxidantes activando su expresión (Figura 7). Estas enzimas ayudan a eliminar las sustancias tóxicas y neutralizar los radicales libres del organismo, protegiendo a las células contra el estrés oxidativo (Crisman et al., 2023; Silva-Islas & Maldonado, 2018; Suzuki et al., 2023).

Actualmente no se conoce el mecanismo por el cual la SAC es capaz de inducir la activación del factor Nrf2; sin embargo, este efecto podría estar relacionado con lo que hacen otros compuestos sulfurados que inducen Nrf2, como el sulforafano.

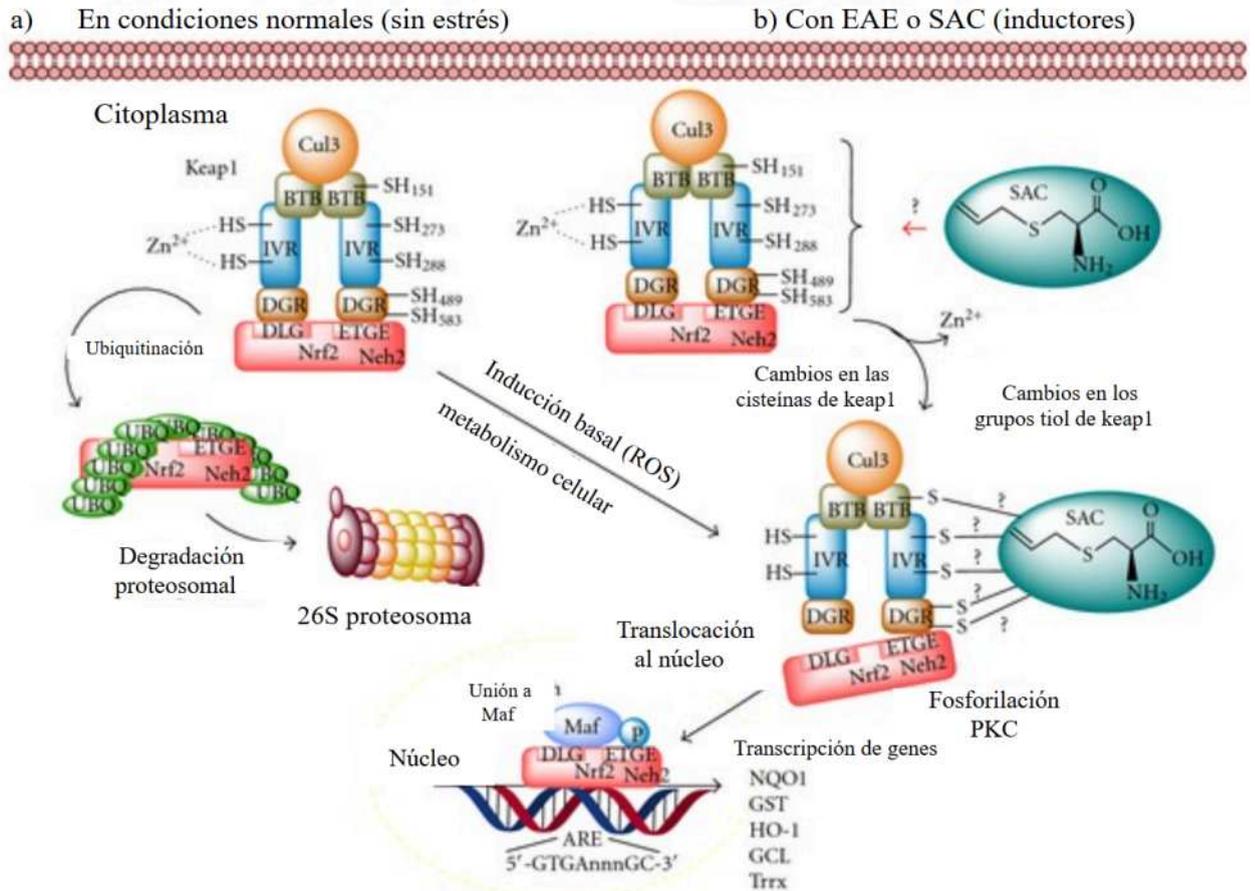


Figura 7. Nrf2 en condiciones basales y en estrés oxidante. Efecto de la SAC sobre el complejo Nrf2/Keap1 (Imagen modificada de Colín-González et al., 2012).

1.4 Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica o plasticidad neuronal se refiere a la posibilidad de alterar la fuerza de las conexiones dentro del sistema nervioso a través de una experiencia o lesión. La plasticidad reorganiza la estructura y/o la función de las neuronas y es necesaria no sólo para que las redes neuronales adquieran nuevas capacidades, sino para que se mantengan robustas y estables en el tiempo. La plasticidad sináptica es intrínseca al desarrollo y función del cerebro, confiriendo adaptabilidad ambiental, aprendizaje y bienestar general. Sin embargo, la exposición a factores ambientales como el estrés, el trauma psicológico, el uso de sustancias o factores socioculturales pueden alterar la plasticidad del cerebro y provocar una serie de trastornos psiquiátricos y de salud mental (Appelbaum et al., 2023).

1.4.1 Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos son un grupo de polipéptidos solubles con funciones dentro del sistema nervioso central y periférico, como la regulación de la diferenciación neuronal, la proliferación, la migración y la plasticidad sináptica. Estos se dividen según su estructura y función en (Lanni et al., 2010; Rocha & Teixeira, 2017):

- Neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y NT-4. En este trabajo nos centraremos en estas moléculas.
- Superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que incluye al factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF).
- Superfamilia de neuroquinas que comprende al factor neurotrófico ciliar (CNTF), la interleucina-6 (IL-6) e IL-11, entre otros.
- Factores no neuronales, como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

1.4.2 Síntesis y secreción de neurotrofinas (NT)

Las NT se sintetizan como pre-pro-neurotrofinas (proteínas más grandes que se escinden para producir NT maduras) en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y se trasladan al aparato de Golgi para acumularse en la red trans-Golgi (RTG). En la RTG, las NT se secretan a través de dos tipos de vesículas: las vesículas secretoras constitutivas o en gránulos secretores regulados (Figura 8) (Al-Qudah & Al-Dwairi, 2016). La vía constitutiva de secreción es independiente de calcio (Ca^{2+}), ocurre en ausencia de cualquier estímulo desencadenante y se liberan continuamente gránulos de pequeño diámetro (50-100 nm). Las NT que tienen principalmente esta vía de secreción son NGF y NT-4. Mientras que en la vía regulada de secreción las vesículas son más grandes (100-300 nm), brotan de la RTG y se fusionan con la membrana plasmática de manera dependiente de Ca^{2+} y se secretan en respuesta a un evento desencadenante extracelular. Las NT que se secretan por esta vía son BDNF y NT-3 (Al-Qudah & Al-Dwairi, 2016).

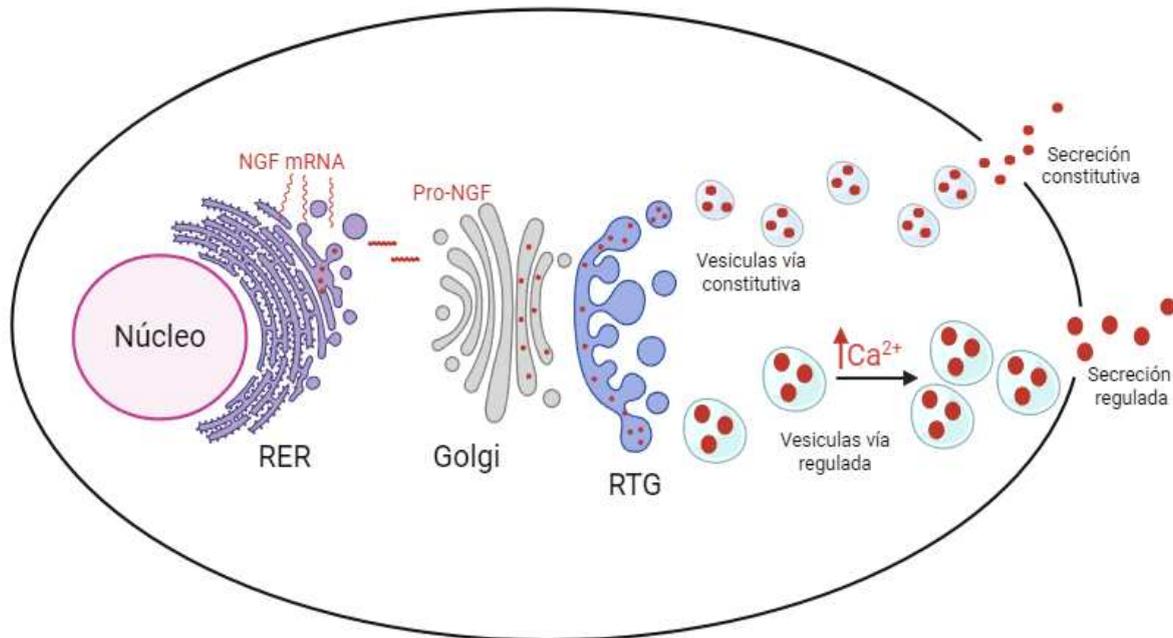


Figura 8. Síntesis y secreción de neurotrofinas por la vía constitutiva independiente de calcio a través de gránulos secretores (NGF, factor de crecimiento nervioso y NT-4, neurotrofina-4) y) y la vía regulada dependiente de calcio a través de vesículas secretoras constitutivas (BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro y NT-3, neurotrofina-3) (Imagen modificada de Al-Qudah & Al-Dwairi, 2016 y creada en BioRender.com)

1.4.3 Señalización de las NT

Las formas maduras de NT se unen selectivamente a los receptores TrK (cinasa relacionada con tropomiosina) (Rocha & Teixeira, 2017), activando diferentes vías de señalización (Figura 9) como se menciona a continuación (Bautista-Perez et al., 2023):

- Proteína cinasa activada por mitogenos/cinasa regulada por señales extracelulares (MEK/ERK): la proteína adaptadora proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2) se une al receptor Trk fosforilado. Posteriormente, GRB2 se asocia con la proteína son of sevenless (SOS), que promueve la activación de la proteína RAS, iniciando la cascada de cinasas que incluye RAF/MEK/ERK. Finalmente, ERK puede ingresar al núcleo donde activa factores de transcripción como CREB (proteína de unión a elementos de respuesta al AMP cíclico), promoviendo la diferenciación neuronal y la maduración de las sinapsis.
- Fosfolipasa C gamma ($PLC\gamma$): el receptor TrK fosforilado activa $PLC\gamma$, que hidroliza PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato) en dos mensajeros secundarios:

inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El primero se une a su receptor en el retículo endoplásmico, provocando la liberación de Ca^{2+} al citoplasma, mientras que DAG activa la proteína cinasa C (PKC). El calcio y PKC regulan los canales iónicos, afectando el potencial de membrana y la excitabilidad modulando la plasticidad sináptica.

- Fosfatidilinositol 3-cinasa/serina-treonina proteína cinasa (PI3K/AKT): el receptor Trk fosforilado recluta a PI3K, que a su vez, fosforila a PIP2 para generar fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). PIP3 sirve como segundo mensajero reclutando a AKT, quien activa la vía de mTOR, que desempeña un papel en la síntesis de proteínas e impacta en el crecimiento axonal. AKT también puede fosforilar a glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK3 β), inhibiendo su actividad de cinasa, lo que favorece la supervivencia y diferenciación de los oligodendrocitos, células críticas para mielinización, o bien puede afectar la estructura neuronal, estimulando el cono de crecimiento axonal.

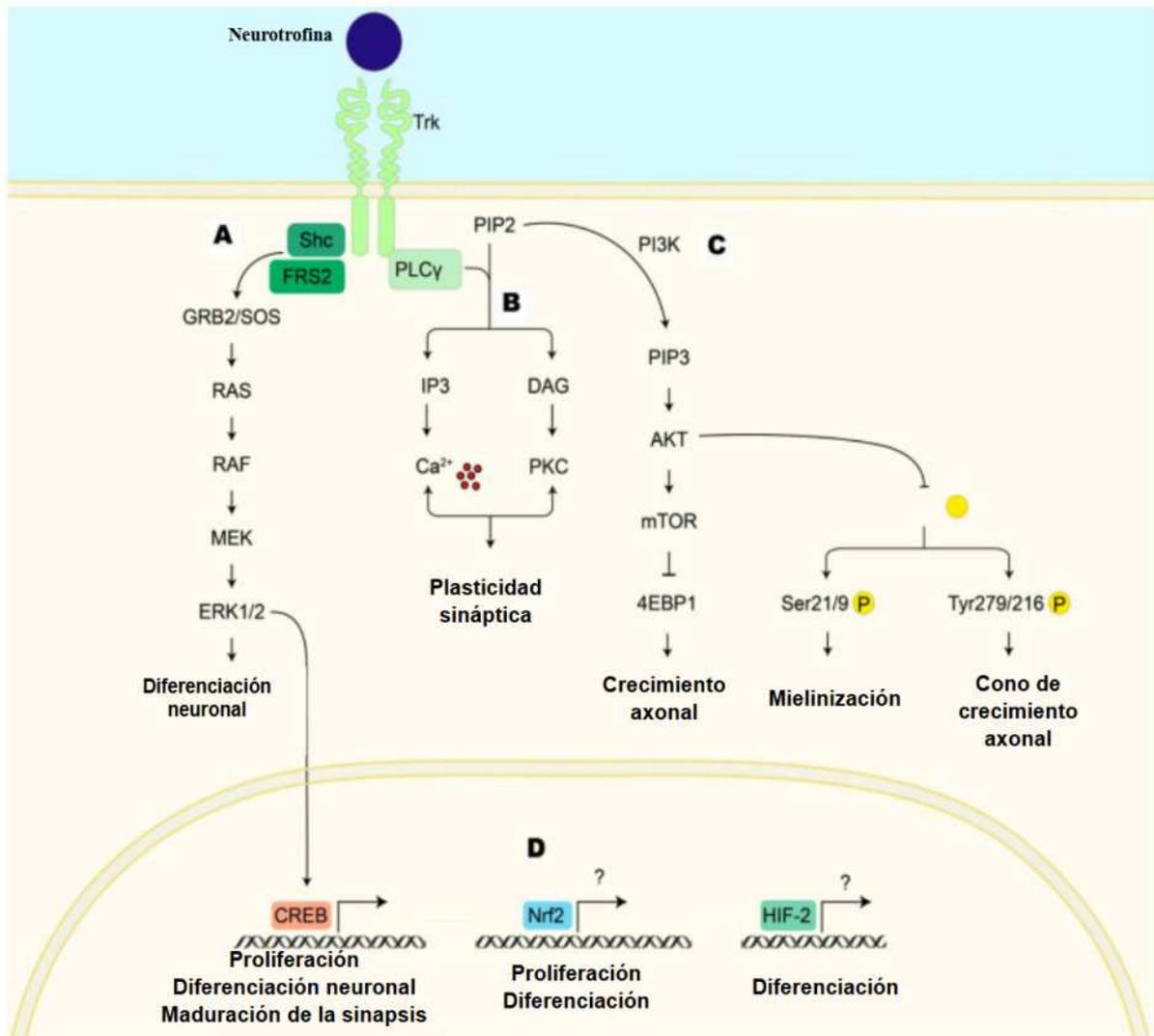


Figura 9. Vías celulares activadas por la unión de neurotrofina al receptor de cinasa relacionada con tropomiosina (**Trk**) (Imagen tomada de Bautista-Perez et al., 2023). Proteína transformante (**Shc**), Sustrato 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (**FRS2**), Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (**GRB2**), Son of sevenless (**SOS**), Proteínas del virus del sarcoma de rata (**RAS**), Cinasa de fibrosarcoma (**RAF**), Cinasa activada por mitógenos (**MEK**), Cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (**ERK1/2**), Fosfolipasa C gamma (**PLC gamma**), Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (**PIP2**), Inositol trifosfato (**IP3**), Diacilglicerol (**DAG**), Calcio (**Ca**), Proteína cinasa C (**PKC**), Fosfatidilinositol 3-cinasa (**PI3K**), Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (**PIP3**), Serina-treonina proteínas cinasa (**AKT**), Objetivo de la rapamicina (**mTOR**), Proteína de unión 1 del factor de iniciación de la traducción eucariota 4E 1 (**4EBP1**), Proteína de unión a elementos de respuesta al AMPc (**CREB**), Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (**Nrf2**) y Factor inducible por hipoxia 2 (**HIF-2**).

NGF se une selectivamente al receptor TrkA, mientras que BDNF y NT-4 son selectivos para TrkB. NT-3 se une al receptor TrkC y es capaz de activar de manera menos eficiente a otros receptores Trk. Todas las NT pueden unirse al receptor de

neurotrofina p75 (p75NTR) con baja afinidad y las pro-neurotrofinas (proNT) también pueden unirse a p75NTR (Rocha & Teixeira, 2017).

Cuando se activan las vías de los receptores Trk por la unión de NT maduras se activa la señalización de supervivencia de las neuronas; pero si las NT se unen al receptor p75NTR, la señalización promueve la muerte celular por apoptosis (Huang & Reichardt, 2001; Lanni et al., 2010; Rocha & Teixeira, 2017). Las proNT como proNGF y proBDNF pueden unirse a p75NTR con alta afinidad y provocar muerte celular (Figura 10) (Rocha & Teixeira, 2017). Sin embargo, un estudio describió que la unión de NGF a p75NTR en embriones de ratones knockout disminuyó la muerte celular en retina y médula espinal (Frade & Barde, 1999; Rocha & Teixeira, 2017).

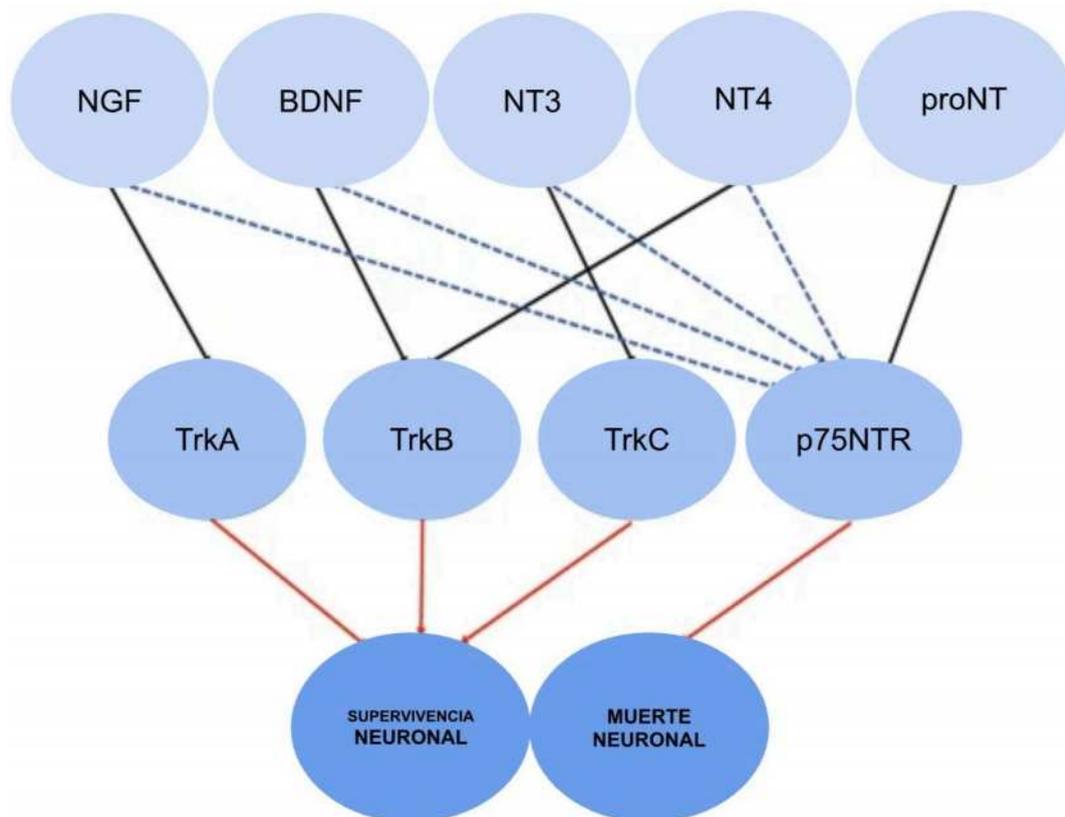


Figura 10. Ilustración esquemática de las neurotrofinas, sus respectivos receptores y los efectos finales que se observan dependiendo del receptor al que se unan. Líneas azules punteadas indican unión de baja afinidad. Líneas negras indican unión de alta afinidad (Imagen tomada de Rocha & Teixeira, 2017). NGF: factor de crecimiento nervioso, BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, NT-3: neurotrofina-3, NT-4: neurotrofina-4, pro-NT: pro-neurotrofina, Trk: receptor de cinasa relacionado con tropomiosina y p75NTR: receptor de neurotrofina p75.

NGF

El NGF es una proteína perteneciente a la superfamilia de nudos de cisteína, caracterizada por su formación de bucles con tres puentes disulfuro. Fue la primera neurotrofina en descubrirse dentro de la familia de factores promotores del crecimiento nervioso. Se sintetiza como precursor (proNGF), que se escinde para formar la NT madura, un homodímero unido no covalentemente (Allen et al., 2013).

Vías de señalización. NGF se une al receptor TrkA, activando las vías de MEK/ERK, PLC γ y PI3K/AKT; induciendo factores de transcripción como CREB, que aumentan la expresión de proteínas involucradas en la promoción de la supervivencia neuronal, la diferenciación, el reordenamiento del citoesqueleto, la formación de la sinapsis y la plasticidad sináptica (Bautista-Perez et al., 2023; Pramanik et al., 2017; Rocha & Teixeira, 2017).

Los niveles más altos de NGF se encuentran en el hipocampo y en las regiones corticales, donde es producido principalmente por las neuronas y es transportado retrógradamente a los cuerpos celulares de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (NCPB). Las NCPB expresan receptores TrkA y p75NTR y NGF regula la supervivencia y el mantenimiento de estas células. Las NCPB y sus proyecciones al hipocampo y la corteza están involucradas en las funciones de aprendizaje y memoria. Alteraciones en los niveles de NGF se asocian con cambios cognitivos durante el envejecimiento y con el deterioro cognitivo en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Rocha & Teixeira, 2017).

GDNF

Es el polipéptido principal de los ligandos de la familia GDNF (LFG) y un miembro distante de la superfamilia de TGF- β (Piña et al., 2014; Rocha & Teixeira, 2017). Los LFG se producen en forma de precursores como pre-pro-LFG, la secuencia señal se escinde durante la secreción y la activación de los proLFG probablemente se produce mediante escisión proteolítica (Airaksinen & Saarma, 2002).

Vías de señalización. GDNF ejerce sus efectos biológicos a través de la unión al receptor alfa 1 de la familia de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GFR α 1), (isoformas: anclada a la membrana celular mediante un glicosil-fosfatidil-inositol (GIP) y soluble), que se une al receptor de reordenamiento durante la transfección (RET), activando vías de señalización como MEK/ERK y

AKT (Piña et al., 2014; Rocha & Teixeira, 2017). RET está relacionado con la supervivencia, la diferenciación, la proliferación, el crecimiento de neuritas y la plasticidad sináptica (Figura 11) (Zhang et al., 2021).

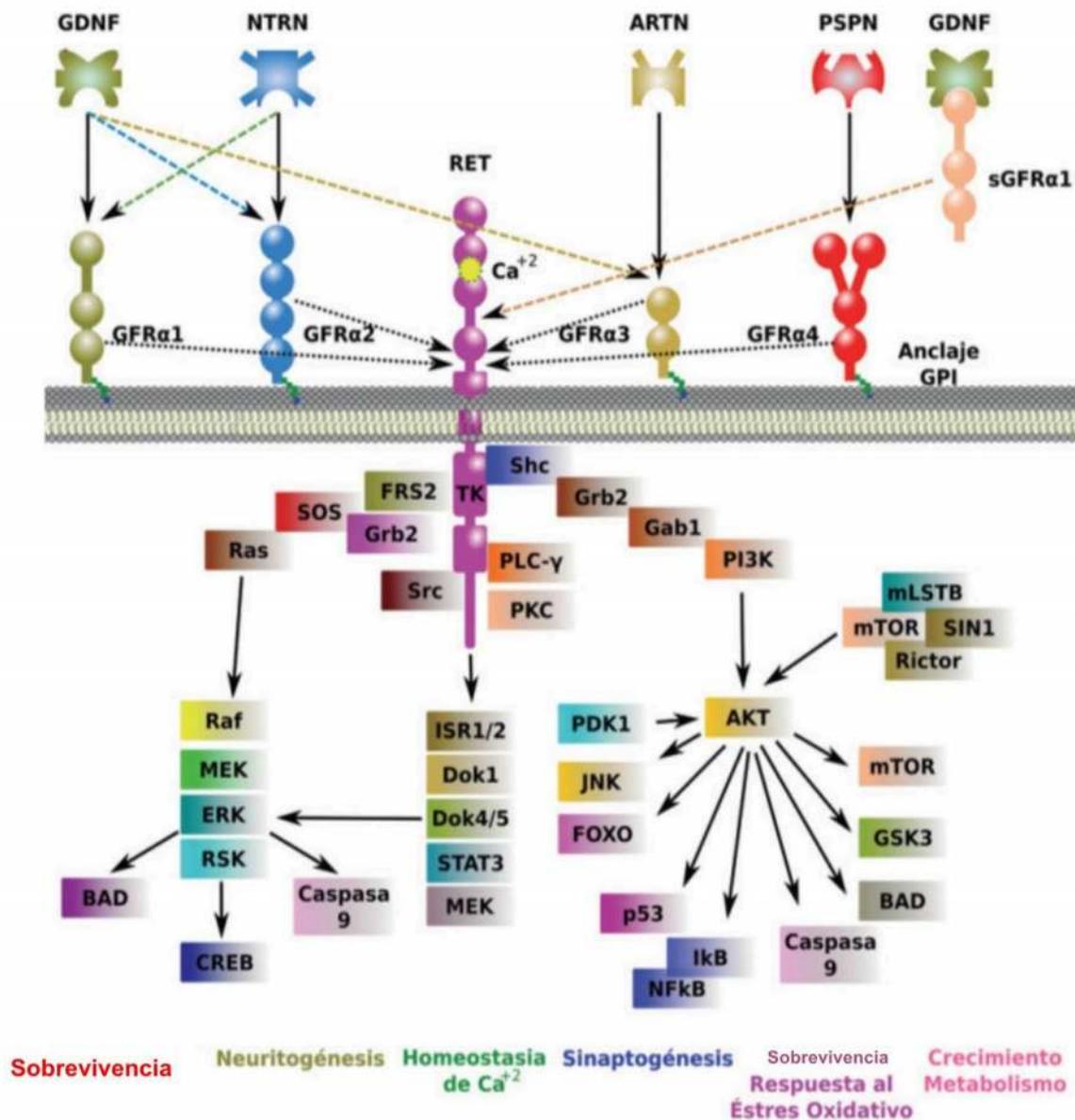


Figura 11. Miembros que conforman la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la glía (LFG) y sus receptores. En la imagen se observan las vías de señalización de Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) al unirse a su receptor alfa 1 de la familia de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GFR α 1) y activar a Receptor de tirosina-cinasa (RET) (Imagen tomada de Piña et al., 2014).

GDNF puede desencadenar cascadas de señalización intracelulares independientes de RET a través de la familia de cinasas de cadena de respuesta almacenada (Src). La molécula de adhesión de células neuronales (NCAM) se ha identificado como un segundo receptor de señalización para ligandos de la familia GDNF (Figura 12). Por tanto, la unión de GDNF a NCAM da como resultado la migración de células de Schwann y el crecimiento axonal en el hipocampo y la corteza (Allen et al., 2013).

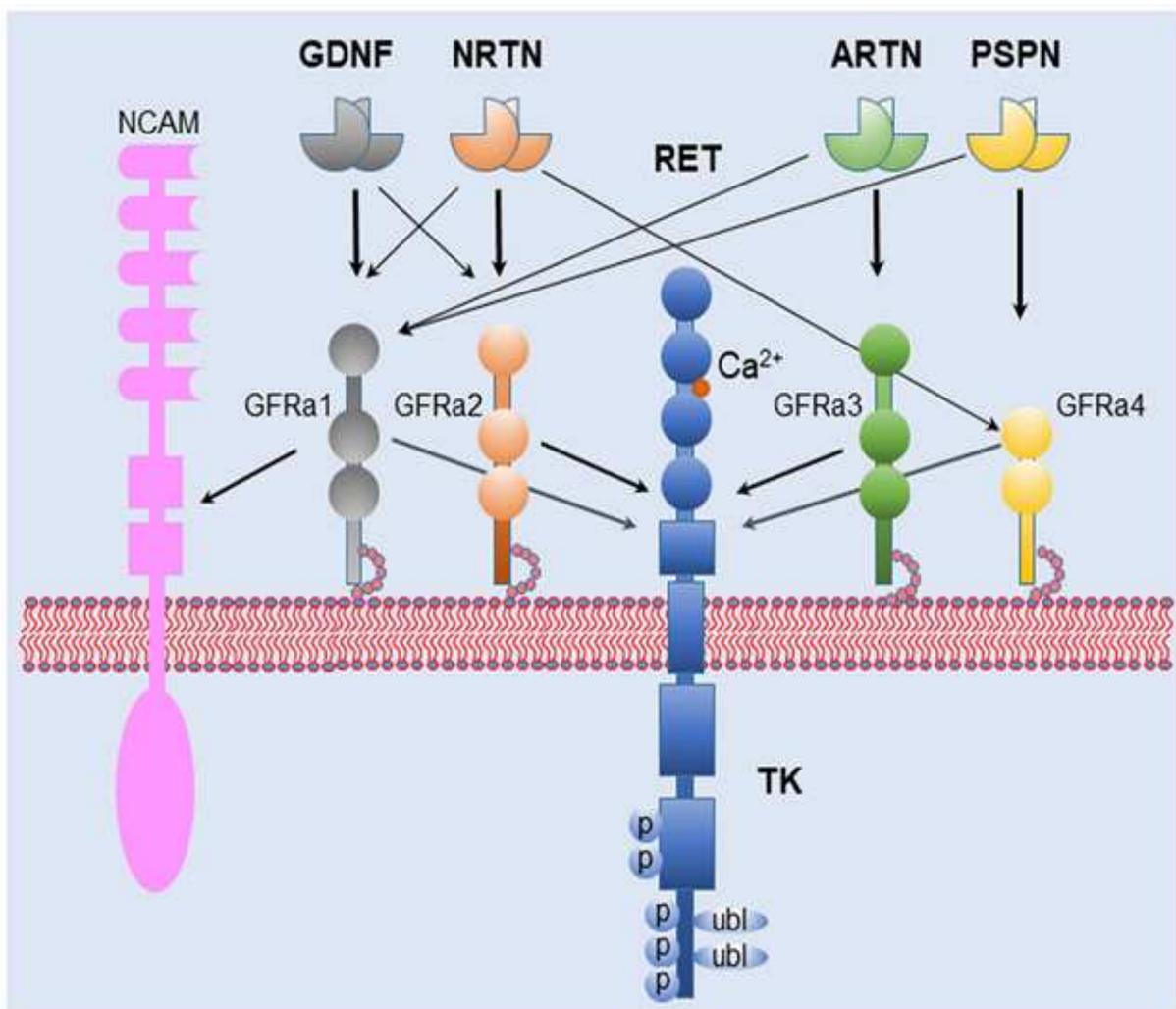


Figura 12. Ligandos de la familia del Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) y sus receptores. En la imagen se puede apreciar la unión de GDNF al receptor alfa 1 de la familia de factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GFR α 1) y a la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM) (Imagen tomada de Zhang et al., 2021).

y en las motoneuronas espinales (Piña et al., 2014). Se sabe que GDNF y sus receptores se expresan ampliamente en el hipocampo, donde apoya la transmisión

sináptica y participa en los procesos de aprendizaje y memoria (Rocha & Teixeira, 2017).

GDNF tiene una especificidad relativamente alta para las neuronas dopaminérgicas, teniendo un potencial significativo en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson que se caracteriza por el agotamiento progresivo de las poblaciones de células dopaminérgicas del mesencéfalo. También se ha descrito que tiene efectos tróficos y protectores en las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, así como en las neuronas motoras periféricas, sugiriendo un potencial terapéutico en la enfermedad de Huntington y de Alzheimer (Allen et al., 2013). Finalmente, GDNF es importante en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas embrionarias y para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Rocha & Teixeira, 2017).

1.5 Memoria

La memoria es una capacidad mental cuya función es codificar, almacenar y recuperar información. Esta función es esencial para el aprendizaje y la supervivencia (*La memoria*, 2022). La memoria se caracteriza por la adquisición, almacenamiento y reposición de la información que ingresan a través de alguna vía sensorial. Dentro de las regiones cerebrales asociadas con la memoria se encuentran el hipocampo, el tálamo, la amígdala del lóbulo temporal, los cuerpos mamilares y el cerebelo (Solís, 2009). Existen tres tipos de almacenamiento de memoria: sensorial, a corto y largo plazo.

Memoria sensorial. Adquiere la información mediante los sentidos y es de corta duración. Procesa los estímulos exteriores para su posterior identificación y procesamiento (*La memoria*, 2022). Hay tres tipos de memoria sensorial: 1) ecóica, retiene información que recopilamos a través de estímulos auditivos; 2) icónica, retiene la información que recopilamos a través de la vista y 3) háptica: retiene los datos que adquirimos a través del tacto (Cloke, 2023).

Memoria a corto y largo plazo. Se diferencian en la duración del almacenamiento. En la memoria a corto plazo, la información se almacena de manera transitoria; mientras que en la memoria a largo plazo es más duradera (Missaire et al., 2017). Hay dos tipos de memoria a largo plazo: la memoria explícita e implícita. La memoria explícita se divide en episódica (memoria de eventos y experiencias) y

semántica (memoria de hechos y conceptos). La memoria implícita incluye habilidades y hábitos que adquirimos mediante la repetición y la práctica (Cloke, 2023).

En roedores se puede medir la memoria a corto y largo plazo empleando la prueba de reconocimiento de objetos (Bevins & Besheer, 2006). Esta se sustenta en la tendencia innata de los roedores a explorar nuevos estímulos en un entorno conocido y que estos tienden a pasar más tiempo explorando un estímulo novedoso a uno conocido (Lian et al., 2018).

1.5.1 Aprendizaje y memoria espacial

Los seres vivos se orientan en el espacio para interactuar con su entorno. En los animales este proceso se requiere para la búsqueda de alimento, la conducta parental y reproductiva o huir a un lugar seguro (Vicens et al, 2003).

El aprendizaje espacial se refiere al conocimiento en la disposición y organización del entorno físico, es decir, forma una representación de su entorno (mapa cognitivo) mediante el que localizan la meta (Vicens et al, 2003). Mientras que la memoria espacial consta de múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Vicens et al, 2003). La memoria espacial puede verse afectada por diferentes factores externos e internos como el estrés. Se ha demostrado que el estrés puede mejorar o deteriorar la memoria relacionada con diversas tareas como el reconocimiento de objetos, el condicionamiento o la navegación espacial. La intensidad de la respuesta al estrés dependerá del tipo estresante y del tipo de memoria evaluada (Troncoso et al, 2010).

Al igual que la memoria a corto y largo plazo, el aprendizaje y la memoria espacial pueden ser evaluados en roedores empleando la prueba de Morris. Esta prueba es una de las herramientas más utilizada en la neurociencia del comportamiento (Brandeis et al., 1989; D'Hooge & De Deyn, 2001; McNamara & Skelton, 1993), para evaluar terapias neurocognitivas como intervenciones conductuales, farmacológicas y neuroquirúrgicas (D'Hooge & De Deyn, 2001).

La edad afecta el rendimiento de los animales en esta prueba debido a cambios relacionados con la edad (alteraciones en el rendimiento cognitivo) y con sus habilidades de natación, locomoción y exploración (D'Hooge & De Deyn, 2001).

Esta prueba consiste en una piscina circular llena de agua en la que se coloca una plataforma de escape y señales de referencia para el roedor. Se realizan una serie de pruebas de entrenamiento para que los animales aprendan a encontrar la plataforma. El día de la prueba, la plataforma se retira y se mide el tiempo que los roedores pasan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma (D'Hooge & De Deyn, 2001). Las ratas con un comportamiento normal aprenden muy rápido y nadan directamente hacia la plataforma desde cualquier posición inicial. La dirección precisa hacia la plataforma de escape proporciona evidencia de que las ratas aprenden la posición de la plataforma (Brandeis et al., 1989; Rapp et al., 1987).

1.6 Riñón

Los riñones son un órgano par que se encuentran en la parte posterior del peritoneo, a ambos lados de la columna vertebral. Tienen forma de frijol y su superficie es lisa. En el adulto su tamaño es de 10-12 cm de longitud, 5.7 cm de ancho y 3 cm de espesor y tiene un peso aproximado de 115-155 g en mujeres y 125-170 g en hombres (Cachofeiro et al., 2005).

Algunas funciones renales son:

1. Regula el equilibrio electrolítico, ácido-base e hídrico para mantener el volumen y la osmolaridad de los líquidos corporales.
2. Excreta productos derivados del metabolismo celular y de agentes exógenos del organismo.
3. Produce factores vasoactivos como la renina (implicada en la formación de angiotensina II) que regulan la presión arterial.
4. Secreta eritropoyetina para regular la eritropoyesis
5. Regula el nivel de vitamina D3 ya que produce su forma más activa, la 1,25-dihidroxitamina D3, que participa en el metabolismo del calcio y el fósforo.
6. Es un órgano con actividad gluconeogénica al sintetizar glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores en situaciones de ayuno prolongado.

1.6.1 Estructura renal

Un corte sagital muestra dos regiones: la corteza de aspecto rojizo y granuloso, comparado con la médula que tiene aspecto pálido y estriado. La médula se divide en externa (próxima a la corteza) e interna (Cachofeiro et al., 2005).

La corteza se ubica debajo de la cápsula y se proyecta hacia la médula mediante las columnas renales o de Bertín. Por otro lado, la médula está formada por 12 y 18 pirámides renales, que son unidades cónicas, con la base dirigida hacia la corteza y el vértice dirigido hacia el hilio. El riñón es multilobulado debido a que la pirámide medular y la corteza renal forman un lóbulo renal. El vértice de cada pirámide forma una papila renal situada dentro de un cáliz menor y la unión de varios forma un cáliz mayor, estos cálices forman la pelvis renal donde se recoge la orina (Figura 13) (Cachofeiro et al., 2005).

La unidad funcional del riñón es la nefrona y es responsable de la formación de la orina. Cada riñón contiene alrededor de 1 millón de nefronas. La nefrona está formada por células especializadas que filtran la sangre y modifican selectivamente el líquido filtrado mediante procesos de reabsorción y secreción de diferentes sustancias. La nefrona está formada por un corpúsculo renal y un sistema tubular.

El corpúsculo renal es esférico, está formado por una red de capilares interconectados que forman el glomérulo y están ubicados dentro de la cápsula de Bowman (parte inicial del sistema tubular). Estos capilares se originan en la arteriola aferente y se reúnen para formar la arteriola eferente (Cachofeiro et al., 2005).

La cápsula de Bowman se invagina para englobar el glomérulo, generando en su interior el espacio de Bowman o espacio urinario. Su capa interna (visceral) está formada por podocitos.

El sistema tubular está formado por una sola capa de células epiteliales y diferentes segmentos como túbulo proximal (con una zona cortical y medular), asa de Henle (con células aplanadas), túbulo distal (formado por células cúbicas), túbulo colector cortical (drenan de 8 a 10 nefronas que continúan hacia la médula) (Cachofeiro et al., 2005):

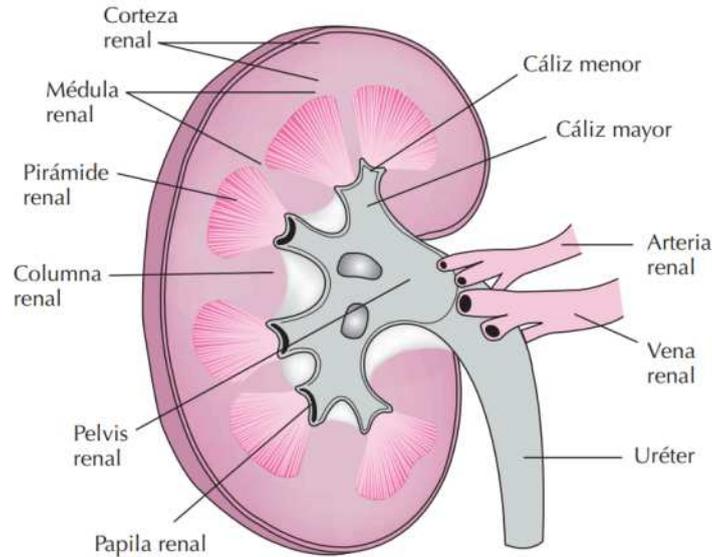


Figura 13. Estructura interna del riñón (Imagen tomada de Cachofeiro et al., 2005).

Es un órgano altamente metabólico con altos niveles de oxidación dentro de las mitocondrias celulares. Los tejidos renales tienen una gran demanda de energía, en especial las células del tubo proximal, esto se debe a la reabsorción de nutrientes después de la filtración glomerular. El riñón es particularmente vulnerable al daño oxidativo mitocondrial, ya que puede estar relacionado con la aparición y progresión de la enfermedad renal crónica y la insuficiencia renal aguda (Kitada et al., 2020).

1.6.2 Marcadores bioquímicos de daño renal

La alteración de algunos parámetros como el nivel de proteínas y el pH en la orina indican la presencia de diversas afecciones (Bilbao et al., 1995). La orina en condiciones normales contiene una baja concentración de proteínas, en su mayoría de origen tubular como la proteína Tamm-Horsfall y en menor cantidad albúmina. Con daño renal el nivel de proteínas séricas disminuye, porque éstas son excretadas en la orina, por lo que la determinación de proteínas tanto en suero como en orina es de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades renales (Peña-Esparragoza et al., 2023). En el caso del pH, las personas sanas tienen un valor entre 5-6. Valores alcalinos indican una infección en las vías urinarias, mientras que valores más ácidos indican la presencia de ácido úrico (Bilbao et al., 1995).

1.7. Estudios preclínicos y clínicos para el desarrollo de nuevos fármacos

El desarrollo de un nuevo fármaco requiere una importante inversión de capital, recursos y experiencia tecnológica (Dickson & Gagnon, 2004). El gasto en desarrollo de nuevos fármacos aumenta constantemente y actualmente supera los 1500 millones de dólares por fármaco, con un cronograma que abarca entre 10 y 15 años, dependiendo de la complejidad de la enfermedad y su proceso (Issa et al., 2017).

La farmacoterapia se ha desarrollado en respuesta a las necesidades de atención sanitaria de la población en la medida que lo permiten los recursos y la tecnología. La tendencia más reciente ha sido buscar medicamentos para el tratamiento de enfermedades crónicas, especialmente aquellas que comúnmente afectan a las personas de edad avanzada. Las tres principales causas de muerte son: las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y los accidentes cerebrovasculares (Dickson & Gagnon, 2004).

El éxito de un producto se logra al realizar estudios preclínicos y clínicos validados por un sistema de gestión de calidad, en los que la molécula de estudio debe demostrar seguridad y eficacia para ser autorizada y comercializada. Previo a presentar una solicitud para un nuevo producto ante las autoridades regulatorias, es necesario realizar la etapa de investigación preclínica que van desde una prueba de concepto en animales, hasta demostrar su posible uso terapéutico, así como su seguridad tóxica (Ramos, 2016). Se considera que el desarrollo de un producto inicia cuando esta molécula se encuentra en ensayos clínicos (Fase I-IV) (Ramos, 2016).

Cuando un fármaco nuevo posee la autorización gubernamental para su investigación en humanos, se inicia el estudio clínico a través de las siguientes fases de investigación (Dickson & Gagnon, 2004; Magos & Lorenzana-Jiménez, 2009):

Fase I. Los ensayos clínicos se llevan a cabo en un pequeño número de voluntarios sanos para determinar el rango de dosificación segura y la toxicidad de un compuesto.

Fase II. Se prueba en una muestra más grande de voluntarios que padecen la afección médica que el producto pretende tratar.

Fase III. Se ocupa una muestra más grande de sujetos con la enfermedad de interés en diferentes centros y se prueban cantidades o programas de dosificación diferentes a los utilizados en la Fase II. En esta fase el objetivo principal es demostrar eficacia.

Fase IV: Esta fase se refiere a la vigilancia continua de la seguridad del nuevo medicamento en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes (población general).

Seguridad y toxicología. Los estudios preclínicos definen los efectos farmacológicos y toxicológicos antes de su uso en humanos. Para ello, los estudios de toxicidad deben cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) como: la correcta elección de la especie animal a usar, la edad, el estado fisiológico, la dosis, vía de administración, régimen de tratamiento y la estabilidad del material que se empleará en las determinaciones (Ramos, 2016).

Los estudios de toxicidad deben mostrar evidencia experimental de la dosis y el nivel de exposición a partir de la cual aparecen efectos tóxicos y adversos, así como esclarecer órganos diana con el objetivo de extrapolar los resultados al ser humano, considerando las diferencias cualitativas y cuantitativas entre especies (Gaméz & Más, 2007).

En terapéutica, cada fármaco produce varios efectos, pero normalmente sólo uno de ellos está asociado con el objetivo principal de la terapia; todos los demás efectos se denominan efectos indeseables o secundarios. Algunos de estos efectos secundarios pueden ser perjudiciales para el bienestar de los seres humanos y se conocen como efectos adversos, nocivos o tóxicos del fármaco (Eaton & Gilbert, 2010).

La alergia química a una sustancia es una reacción adversa mediada por el sistema inmune que resulta de una sensibilización previa a esa sustancia o a otra estructuralmente similar. Para describir esta situación se utilizan los términos hipersensibilidad, reacción alérgica y reacción de sensibilización. Una vez ocurrida la sensibilización, pueden producirse reacciones alérgicas por la exposición a dosis relativamente muy bajas de una sustancia. Las reacciones de sensibilización son a veces graves y pueden resultar mortales (Eaton & Gilbert, 2010).

La idiosincrasia química es una respuesta normal a una sustancia química y está determinada genéticamente. Esta respuesta suele ser similar en individuos, sin embargo algunos pueden presentar una forma de sensibilidad extrema a dosis bajas o insensibilidad extrema a dosis altas de la sustancia (Eaton & Gilbert, 2010).

Los efectos tóxicos inmediatos ocurren o se desarrollan rápidamente después de una sola administración de una sustancia, mientras que los efectos tóxicos retardados pueden ocurrir después de un tiempo. Algunos efectos tóxicos pueden ser reversibles o irreversibles, por ejemplo, si una sustancia química produce una lesión patológica en un tejido, la capacidad de ese tejido para regenerarse determina si el efecto es reversible o irreversible, las mayoría de las lesiones son reversibles, sin embargo en el SNC son en gran medida irreversibles porque sus células diferenciadas no pueden reemplazarse (Eaton & Gilbert, 2010).

Otra distinción de los efectos tóxicos se relaciona con el sitio de acción. Los efectos locales ocurren en el sitio del primer contacto entre el sistema biológico y el tóxico, mientras que los efectos sistémicos requieren la absorción y distribución de una sustancia tóxica desde un punto de entrada hasta un sitio distante en el que se producen los efectos nocivos. La mayoría de sustancias que producen toxicidad sistémica generalmente provocan toxicidad en solo uno o dos órganos (órganos diana). El órgano objetivo de la toxicidad no necesariamente es el lugar con mayor concentración del compuesto (Eaton & Gilbert, 2010).

Un agente químico no produce efectos tóxicos en un sistema biológico a menos que ese agente o sus productos de degradación metabólica (biotransformación) lleguen a lugares apropiados del cuerpo en una concentración y durante un periodo de tiempo suficiente para producir una manifestación tóxica. El que se produzca una respuesta tóxica dependerá de: las propiedades químicas y físicas de la sustancia, la situación de exposición, el metabolismo del agente y la susceptibilidad general del sistema biológico del sujeto (Eaton & Gilbert, 2010).

La vía de administración puede influir en la toxicidad de las sustancias. Por ejemplo un agente que actúa sobre el SNC y que se desintoxica eficientemente en el hígado, es menos tóxico cuando se administra por vía oral que cuando se inhala, porque la vía oral requiere que la dosis pase por el hígado antes de llegar al cerebro, después a la circulación sistémica y finalmente al SNC (Eaton & Gilbert, 2010).

En animales de experimentación la exposición a sustancias químicas se dividen en cuatro categorías: aguda, subaguda, subcrónica y crónica. La exposición aguda se

define como la exposición a una sustancia química hasta 24 h, esta exposición generalmente se refiere a una sola administración, se pueden administrar exposiciones repetidas dentro de un periodo de 24 h para algunas sustancias químicas ligeramente tóxicas o prácticamente no tóxicas. La exposición repetida se divide en tres categorías: subaguda, subcrónica y crónica. La exposición subaguda se refiere a la exposición repetida a una sustancia química durante 1 mes o menos, subcrónica durante 1 a 3 meses y crónica durante más de 3 meses (Eaton & Gilbert, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La SAC es el compuesto organosulfurado más abundante en el EAE. Entre sus múltiples beneficios, se ha encontrado que en diferentes modelos de daño ejerce un efecto protector debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Esto se relaciona con su capacidad de actuar como una molécula antioxidante al eliminar radicales libres, ERO y ERN, además de restaurar los niveles de enzimas antioxidantes e inducir la activación del factor de transcripción Nrf2, por mencionar algunos. Sin embargo, un mecanismo poco estudiado de la SAC es su efecto neurotrófico.

Estudios que emplean diferentes preparaciones del ajo han demostrado tener efecto sobre la neuroplasticidad in vivo mejorando la memoria en animales jóvenes sanos o con algún déficit cognitivo (Bautista-Perez et al., 2023). Además, la SAC es capaz de mejorar el aprendizaje y la formación de la memoria en ratones con senescencia acelerada (Hashimoto et al., 2020). Sin embargo, no hay estudios que evalúen el efecto de la administración crónica de la SAC sobre la memoria (memoria a corto y largo plazo, así como memoria espacial), el nivel de neurotrofinas (NGF y GDNF) y el posible efecto tóxico en diferentes regiones cerebrales (estriado, corteza frontal y las regiones CA1, CA2 y giro dentado del hipocampo) de animales adultos jóvenes sanos.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración crónica de la SAC (100, 200 y 400 mg/Kg, por vía oral) sobre la memoria, la expresión de neurotrofinas y el daño morfológico en diferentes regiones cerebrales; así como, evaluar la expresión y/o actividad de algunas enzimas antioxidantes en el cerebro, plasma y riñón de ratas macho adultas jóvenes sanas.

Los resultados derivados de este estudio generaran conocimiento que sustente el consumo de la SAC como un suplemento alimenticio durante en el envejecimiento o bien que apoye su uso como terapia coadyuvante en diferentes padecimientos que cursen con deterioro de la memoria como las demencias, la enfermedad de Alzheimer y el accidente cerebrovascular, entre otras (Colín-González et al., 2012).

3. HIPÓTESIS

Si la SAC es un aminoácido con propiedades antioxidantes, capaz de mejorar el aprendizaje y la memoria en ratones con senescencia acelerada, entonces:

1. Su administración crónica en animales adultos jóvenes sanos, mejorará la memoria y aumentará los niveles de neurotrofinas (NGF y GDNF) en cerebro.
2. Su administración crónica en animales adultos jóvenes sanos, incrementará el nivel de la enzima antioxidante SOD2 en cerebro y SOD1, SOD2 y GPx en riñón y la actividad plasmática de SOD, CAT, GPx y GST.
3. Su administración crónica en animales adultos jóvenes sanos, no inducirá alteraciones histológicas en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (estriado, corteza frontal y las regiones CA1, CA2 y giro dentado del hipocampo), ni en el riñón.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración crónica de la SAC sobre la memoria, el nivel de neurotrofinas en cerebro, el nivel de enzimas antioxidantes en riñón y cerebro, la actividad plasmática de enzimas antioxidantes, así como los cambios morfológicos cerebrales y renales posteriores a su administración oral en ratas adultas jóvenes sanas.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar en animales adultos jóvenes sanos, el efecto de la administración crónica (90 días) de la SAC (100, 200 y 400 mg/Kg, por vía oral) sobre:

- la memoria a corto y largo plazo.
- la memoria espacial.
- la expresión de neurotrofinas (NGF y GDNF) y la enzima antioxidante SOD1 y SOD2 en las regiones cerebrales de estriado, corteza frontal e hipocampo.
- las alteraciones histológicas en las regiones cerebrales estriado, corteza frontal e hipocampo (toxicidad).
- la expresión de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2 y GPx en riñón.
- las alteraciones histológicas en riñón (toxicidad).
- el nivel de proteínas urinarias (marcador de daño renal).
- la actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GST en plasma.
- el nivel de proteínas oxidadas en plasma (marcador de daño oxidativo en proteínas).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Para la síntesis de la SAC y la actividad de las enzimas antioxidantes se emplearon los siguientes reactivos de Sigma-Aldrich Company (St Louis, MO, EUA): clorhidrato de L-cisteína monohidratada, sodio, bromuro de alilo, xantina, xantina oxidasa, H₂O₂, nitroazul de tetrazolio (NBT), albúmina sérica bovina, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), glutatión reductasa, GSH, azida de sodio, 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), guanidina y 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH).

El ácido tricloroacético (TCA) y el etanol absoluto fueron de Reactivos Química Meyer (CDMX, México). El xilol y el carbonato de litio (LiCO₃) fueron de Golden Bell Reactivos (San José del Arenal, AGS, México).

Para la inmunohistoquímica se utilizó el Kit Vectastain® Elite® ABC-HRP, Peroxidasa estándar (PK6100) de Vector Laboratories, Inc (Newark, CA, EUA), los anticuerpos anti-SOD1 y anti-SOD2 de ENZO (Farmingdale, NY, EUA), anti-GPx de Abcam (Grove Street Waltham, MA, EUA), anti-NGF y anti-GDNF de Bioss (West Cummings Park, MA, EUA).

Los demás reactivos fueron de grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

6.2 Síntesis de la SAC

La síntesis química de la SAC se realizó en un matraz bola, a partir de clorhidrato de L-cisteína monohidratada (5.25 g) y bromuro de alilo (2.7 mL) en medio de etanol absoluto (90 mL) utilizando sodio metálico (2.76 g) como catalizador. Este procedimiento se realizó en baño de hielo (reacción exotérmica) con agitación constante durante 1 h (Figura 14).

Al concluir la agitación se adicionó agua destilada fría a la solución (25-30 mL) ocasionando que la solución cambiará de color blanco a una tonalidad ligeramente amarilla y continuó en agitación 1 h más. Finalmente, la solución se colocó en un vaso de precipitados donde se calentó a 70°C con agitación constante para evaporar el etanol, todo el procedimiento se realizó en una campana de extracción. Por último, el vaso se colocó en un baño de hielo y se adiciono ácido acético glacial

(5 mL) para precipitar la SAC. Al precipitado obtenido se le adiciono una pequeña cantidad de etanol absoluto frío para limpiar de impurezas, se filtró al vacío y se dejó secar. Para identificar el compuesto se determinó el punto de fusión (220°C) y se analizó por espectroscopía infrarrojo (IR), comparando con un estándar.

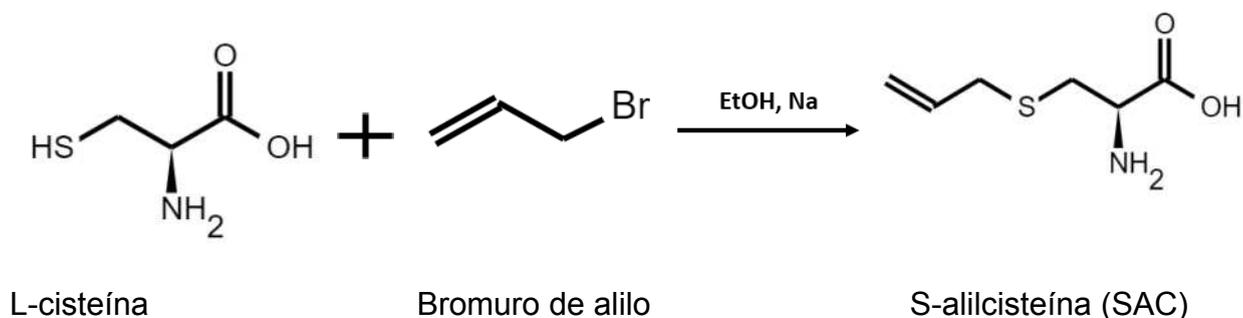


Figura 14. Reacción química de la síntesis de la SAC.

6.3 Animales

Se emplearon ratas macho Wistar con 10 semanas de edad y un peso de 280-320 g, del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Se colocaron 4 animales/grupo en cajas de acrílico con alimento y agua *ad libitum*. Se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (25±3°C), humedad (50±10%) e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad). El estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-INNN) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” proyecto 07/13.

6.4 Diseño experimental

Los animales se dividieron al azar en 4 grupos experimentales:

- Grupo control (CT).
- Grupo SAC 100, se les administró SAC 100 mg/Kg peso.
- Grupo SAC 200, se les administró SAC 200 mg/Kg peso.
- Grupo SAC 400, se les administró SAC 400 mg/Kg peso.

Los animales fueron administrados por vía *i.g.* cada 24 h durante 90 días con solución salina isotónica (SSI) para el grupo CT o son SAC (100, 200 y 400 mg/Kg) para los grupos de SAC.

En el día 90 se recolectó la orina de 24 h. Después los animales fueron eutanizados con pentobarbital sódico (120 mg/Kg, *i.p.*) para obtener sangre intracardiaca (plasma) y extraer el cerebro y riñón para su posterior estudio.

6.5 Evaluaciones cognitivas

6.5.1 Prueba de memoria a corto y largo plazo

Se realizó mediante la prueba de reconocimiento de objetos, empleando una caja gris con las siguientes dimensiones: 80 cm de altura, 60 cm de ancho y 80 cm de largo. La fase de aclimatación se realizó en el día 88 y se realizó en dos partes; primero se colocó cada animal en la caja sin objetos durante 5 min para que reconocieran el entorno y después cada animal se colocó en la caja que ahora contenía 2 esferas (objetos conocidos) durante 5 min. La prueba de memoria a corto plazo se realizó 1 h después de la aclimatación en el día 88. Para ello, se reemplazó uno de los objetos conocidos (esfera) por un objeto desconocido (caja azul) y los animales se colocaron en la caja durante 5 min. La prueba de memoria a largo plazo se realizó 24 h después de la aclimatación en el día 89. Para ello, se reemplazó el objeto desconocido por un objeto desconocido (cilindro) y los animales se colocaron en la caja durante 5 min. Se cuantificó el tiempo que el animal interacciona con el objeto conocido y el desconocido. Finalmente, se calculó el índice de reconocimiento (%) con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Índice de reconocimiento} = \frac{(t)_{\text{desconocido}}}{(t)_{\text{desconocido}} + (t)_{\text{conocido}}} * 100$$

$(t) = \text{tiempo en segundos}$

6.5.2 Prueba de memoria espacial y aprendizaje espacial

Se realizó mediante la prueba de laberinto de Morris, empleando una alberca circular azul de 160 cm de diámetro y 50 cm de profundidad, que contenía aproximadamente 400 L de agua teñida con colorante vegetal azul. Dentro de la alberca se colocó una plataforma circular azul de 11.3 cm de diámetro. Dicha plataforma se colocó a 28 cm de altura, 2 cm por debajo del nivel del agua y a 30

cm de la pared de la alberca. Se colocaron 4 figuras geométricas amarillas en la pared azul como puntos de referencia para los animales.

Entrenamiento: se llevó a cabo durante 5 días (día 83-88). Se realizaron 4 ensayos/día, con la finalidad de que los animales identificarán el lugar en el que se encontraba la plataforma. Cada ensayo duró 1 min. Los animales se introdujeron a la alberca desde cuatro puntos diferentes y se cuantificó el tiempo (s) que los animales tardaron en ubicar la plataforma. Si un animal no encontraba la plataforma al concluir el minuto, se le guiaba para llegar a ella y se dejaba durante 5 s. Para la construcción de la gráfica, no se incluyó el tiempo del primer ensayo de cada día. Este ensayo lo consideramos como periodo de aclimatación, ya que los animales estaban en su caja con ciertas condiciones ambientales y se metían al agua. Solo se utilizó el tiempo de los tres ensayos posteriores para realizar el análisis.

Prueba final: se realizó en el día 89 y duró 1 min. Para ello, se retiró la plataforma y se cuantificó el tiempo (s) que los animales tardaron en llegar al cuadrante donde se encontraba la plataforma.

6.6 Obtención de las muestras

6.6.1 Orina

La orina se recolectó el día 90. Para ello, los animales ingresaron 24 h antes (día 89) a las cajas metabólicas que se encontraban en la Sala de Experimentos Agudos, Subagudos y Crónicos de la Facultad de Medicina, UNAM.

Se midió el volumen urinario, se guardó y se congeló en tubos Falcon a -80°C hasta su uso.

6.6.2 Plasma

La sangre se extrajo por punción intracardiaca obteniendo aproximadamente 2 mL en tubos eppendorf. Se centrifugó a 835 g (Centrífuga eppendorf Modelo 5415 D), durante 10 min a temperatura ambiente para obtener el plasma que se guardó y congeló a -80°C hasta su uso.

6.6.3 Órganos

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (120 mg/Kg, *i.p.*), después se perfundieron con 150 mL de SSI 0.9% con heparina fría (500 mL SSI + 2.5 mL heparina 5,000 UI/mL), seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% en amortiguador PBS. Los órganos (cerebro y riñón) se extrajeron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 28 h, posteriormente se incluyeron en parafina.

6.7 Actividad de las enzimas antioxidantes en plasma

6.7.1 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La actividad fue determinada empleando una mezcla de reacción que contenía xantina 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 mM, carbonato de sodio 400 mM y albúmina sérica bovina 0.1%. Se incubaron 15 μ L de muestra + 81.5 μ L de la mezcla de reacción durante 15 min a 27°C. El ensayo inició al adicionar 2 μ L de XO y transcurridos 10 min se detuvo la reacción con 33 μ L de cloruro de cobre 0.8 mM. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. La cantidad de proteína que inhibe un 50% de la reducción del NBT, se consideró como 1 U de actividad de SOD y los resultados se expresaron en U/mL.

6.7.2 Actividad de la catalasa (CAT)

La actividad fue determinada empleando una mezcla de reacción que contenía H₂O₂ 30 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 7.0. Se adicionaron 10 μ L de muestra (diluida 1:10 con agua destilada) a 750 μ L de la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 240 nm cada 15 s, durante 1.5 min. La actividad se expresó en U/mL.

6.7.3 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad fue determinada empleando una mezcla de reacción que contenía EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutatión reductasa 219 U/mg y GSH 1 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM. Se adicionaron 50 μ L de la muestra sin diluir a 400 μ L de la mezcla de reacción y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 50 μ L de sustrato H₂O₂ 30 mM. Se midió la absorbancia a 340 nm cada 15 s durante 2 min. La actividad se

expresó en U/mL, empleando el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.7.4 Actividad de la glutatión S-transferasa (GST)

La actividad fue determinada colocando 40 μL de la muestra sin diluir, 425 μL amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y 10 μL de GSH 50 mM. La reacción inició al adicionar 25 μL de CDNB 20 mM. Se midió la formación del complejo GSH-dinitrobenzeno a una absorbancia a 340 nm cada 15 s durante 2 min. La actividad se expresó en U/mL, empleando el coeficiente de extinción molar del CDNB ($\epsilon = 9.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.8 Proteínas oxidadas

Se emplearon dos tubos: a) problema con 20 μL de muestra y 80 μL de DNPH 10 mM en HCl 2.5 M y b) blanco con 20 μL de muestra y 80 μL de HCl 2.5 M. A ambos tubos se les adicionó 100 μL de TCA al 20% y se centrifugaron 10 min a 4°C a 2310 g. Se decantó el sobrenadante, al botón se le adicionaron 100 μL de TCA al 10% y se centrifugó 10 min a 4°C a 2310 g. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 60 μL con acetato de etilo-EtOH 1:1, en cada lavado los tubos se centrifugaron 10 min a 4°C a 2310 g (Centrífuga eppendorf Modelo 5415 D). Finalmente, se evaporó el acetato de etilo-EtOH y el botón se resuspendió en 133 μL de guanidina 6 M. El tubo problema se leyó a 370 nm y el blanco a 280 nm. El nivel de proteínas oxidadas se expresó en nmol/mg de proteína, empleando el coeficiente de extinción molar del DNPH ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración de proteína en cada muestra se expresó en mg/mL y se obtuvo empleando el coeficiente de extinción molar de la albúmina ($\epsilon = 97680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el peso molecular (66000 g/mol).

6.9 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

Los tejidos (riñón y cerebro) incluidos en parafina se cortaron en un microtomo 820 Histo-Stat (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, USA) para obtener cortes de 4 μm de grosor, que fueron desparafinados con dos lavados de xilol seguido de diferentes grados de etanol y finalmente agua. La tinción se realizó con hematoxilina, seguido de LiCO_3 al 1% y por último eosina 0.1% con lavados de agua entre cada reactivo. Por último los tejidos se deshidrataron con volúmenes

crecientes de etanol (96° y absoluto) y xilol, se montaron con resina y se dejaron secar. Los cortes se visualizaron en un microscopio Nikon E200 (Nikon, Melville, NY, EUA) utilizando el objetivo 40X, para cerebro se tomaron 2 fotografías de 3 regiones cerebrales diferentes (estriado, corteza e hipocampo) y de riñón se tomaron 3 fotografías de 3 zonas diferentes de la corteza.

6.10 Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes de cerebro y riñón de 4 µm de grosor, se desparafinaron con xilol y se hidrataron con soluciones decrecientes de etanol y lavados con PBS y agua destilada. Los cortes se hirvieron en amortiguador de citrato 10 mM, pH 6.0 que contenía tritón X-100 al 0.2% y Tween 20 al 0.05% durante 30 min y se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min.

La actividad de la peroxidasa endógena se inactivó en los cortes con H₂O₂ al 1% durante 15 min. Después, los cortes se bloquearon con suero normal de caballo del Kit Vectastain y se incubaron con el anticuerpo primario anti-NGF (1:50), anti-GDNF (1:50) y anti-SOD 2 (1:50) para cerebro y con anti-SOD1 (1:100), anti-SOD2 (1:100) y anti-GPx (1:100) para riñón durante 24 h a 20°C. Los cortes se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron con el Kit Vectastain siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los cortes se incubaron con 3'3-diaminobencidina y se contrañieron con hematoxilina. Los cortes se visualizaron en un microscopio Nikon E200 (Nikon, Melville, NY, EUA) utilizando el objetivo 40X, del cerebro se tomaron 2 fotografías de 3 zonas diferentes (estriado, corteza frontal e hipocampo) y del riñón se tomaron 3 fotografías de 3 zonas diferentes de la corteza (Silva-Islas et al., 2019).

6.11 Proteínas urinarias

Se empleó el método de turbidimetría donde se precipitan las proteínas al adicionar TCA al 12.5%. La lectura fotométrica de la turbidez fue realizada en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, Inc., Modelo DU 730) a una longitud de onda de 420 nm.

La orina se diluyó (1:5 con SSI 0.9%) y centrifugó 10 min a 835 g (Centrífuga eppendorf Modelo 5415 D) a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó 1 mL

de orina diluida con 250 μ L de TCA al 12.5% y se leyó la absorbencia a 420 nm. A la par, se realizó un blanco para cada muestra adicionando 1 mL de orina diluida y 250 μ L de SSI. Se empleó una curva estándar de albúmina (0.04 - 0.8 mg/mL), donde se interpolaron los valores de las absorbencias obtenidas. Los resultados se expresaron en mg de proteína/24h.

6.12 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (ESM). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnet y en algunos casos se empleó la prueba de t de student pareada. Todos los datos se analizaron utilizando el software Graph Pad Prism 9.4.1.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluaciones cognitivas

7.1.1 Memoria a corto y largo plazo

La administración de SAC 100 y 200 mg/Kg mejoró la memoria a corto plazo un 56 y 60% con respecto al grupo CT, respectivamente. Sin embargo, la prueba de memoria a largo plazo no presentó cambios con ninguna de las dosis estudiadas (Figura 15).

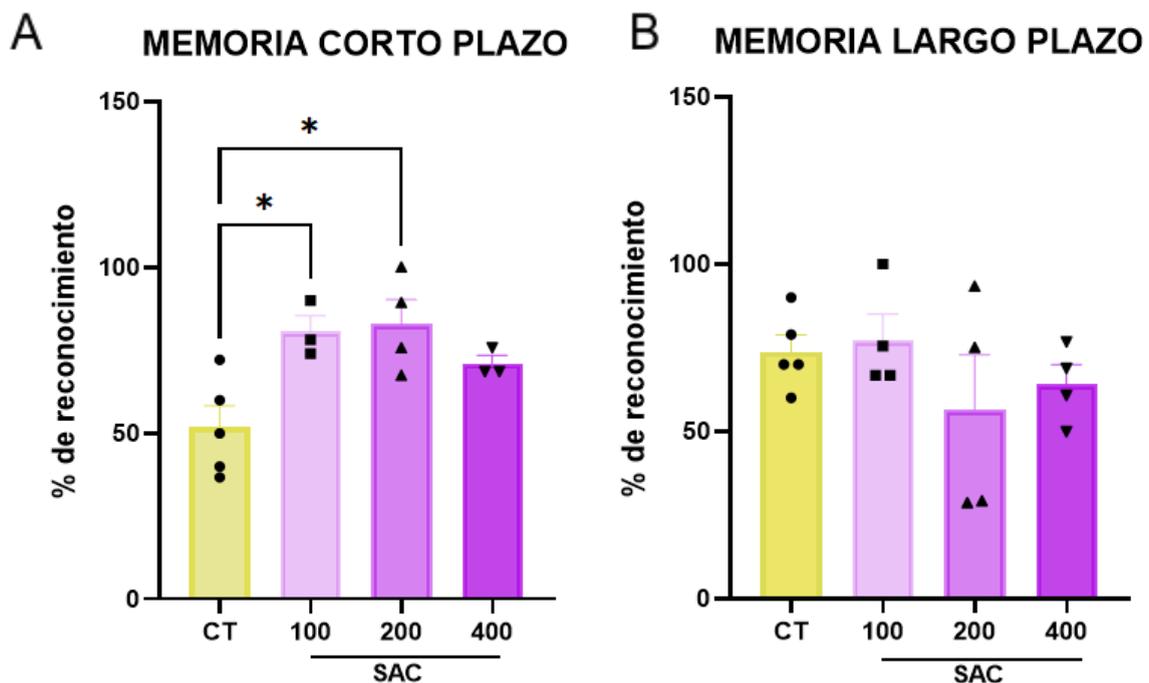


Figura 15. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la memoria a corto (A) y largo (B) plazo, empleando la prueba de reconocimiento de objetos. Se presenta el porcentaje de reconocimiento del objeto nuevo en los animales del grupo control (CT) y los grupos tratados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet ($*p < 0.05$), $n = 3-5$.

7.1.2 Memoria espacial y aprendizaje: Cuadrante de Morris

Los animales se entrenaron para que aprendieran a encontrar la plataforma durante 5 días previos (día 84 - 88) al día de la prueba final (día 90), realizando 4 ensayos por día. En todos los grupos, el tiempo que los animales tardaron en encontrar la plataforma disminuyó con respecto al día 1 de entrenamiento. En el día 4 (ensayo 14 -16), las 3 dosis de SAC (100, 200 y 400 mg/Kg) evaluadas presentaron un menor tiempo con respecto al grupo CT; sin embargo, solo las dosis de SAC 100 y 400 mg/kg fueron estadísticamente diferentes (Figura 16).

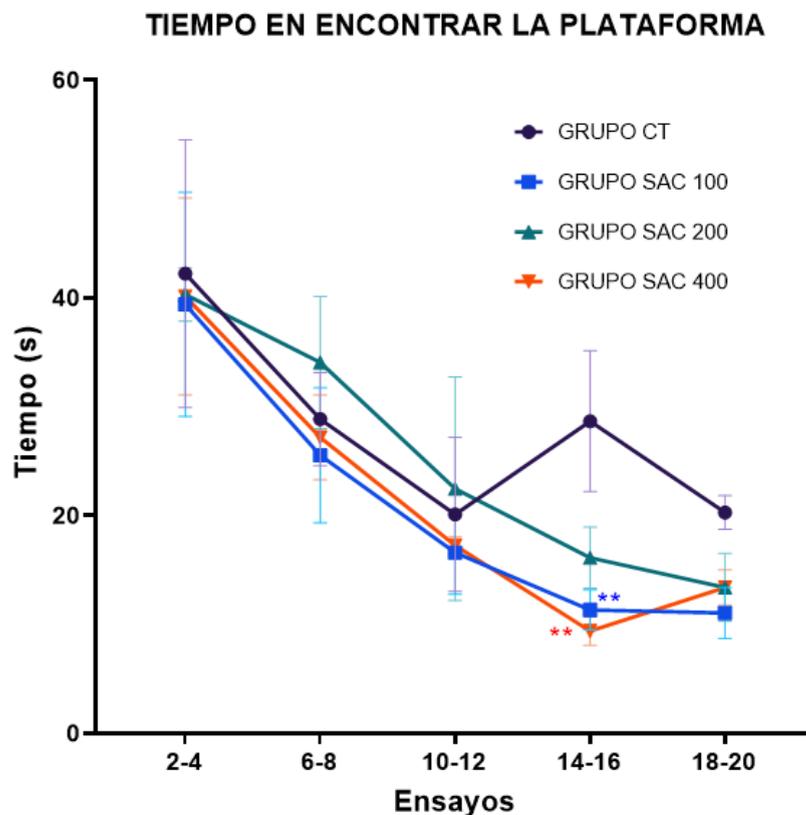


Figura 16. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la memoria espacial y el aprendizaje, empleando el Laberinto de Morris. Se presenta el tiempo (s) que los animales del grupo control (CT) y los grupos tratados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) tardaron en encontrar la plataforma en los ensayos de entrenamiento de la prueba de Laberinto de Morris. Se realizaron 4 ensayos/día durante 5 días previos (día 84-88), al día de la prueba final (día 89). En cada uno de los animales, cada ensayo se realizó dejando un intervalo de 20 min. Para construir la gráfica y realizar el análisis estadístico se excluyó el primer ensayo (aclimatación) de todos los días de entrenamiento (ver material y métodos) y sólo se emplearon los tres ensayos posteriores. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet (** $p < 0.01$), $n = 2-6$.

El día de la prueba final empleando el Laberinto de Morris, la plataforma fue retirada como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos. Inicialmente se calculó el tiempo que los animales pasaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, ya que este parámetro es el que comúnmente se describe en los artículos. Sin embargo, con dicho parámetro no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los grupos CT (34.17 ± 5.023) y los que recibieron SAC 100 mg/Kg (35.00 ± 3.873), SAC 200 mg/Kg (25.83 ± 3.670) y SAC 400 mg/Kg (27.08 ± 4.429). A pesar de que en los videos fue muy evidente como al colocar los animales en algún punto de la piscina, estos inmediatamente se dirigen al cuadrante en donde se encontraba localizada la plataforma. Por ello, decidimos informar el tiempo en el que los animales de cada grupo se dirigieron al cuadrante donde se encontraba la plataforma. Con este parámetro, los animales de los 3 grupos que recibieron SAC presentaron un menor tiempo con respecto al grupo CT; sin embargo, solo las diferencias observadas en los grupos SAC 100 y 400 mg/kg fueron estadísticamente significativas (Figura 17).

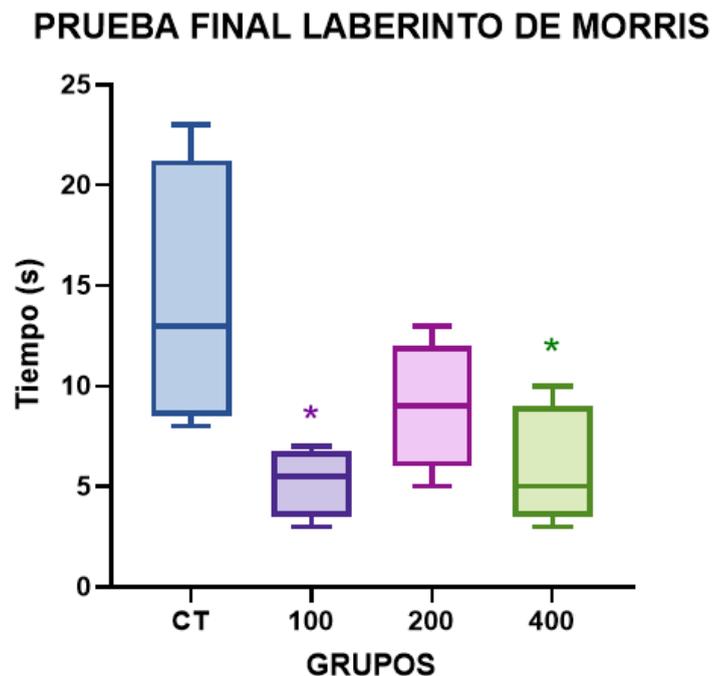


Figura 17. Efecto de la S-allicisteína (SAC) sobre la memoria espacial y el aprendizaje, empleando la prueba de Laberinto de Morris. Se presenta el tiempo en el que los animales del grupo control (CT) y los grupos tratados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) se dirigieron al cuadrante donde se encontraba la plataforma. La prueba se realizó el día 89 durante 1 min. Los datos se representan mediante el gráfico de cajas y bigotes, que muestran la mediana, rango el intercuartil y los valores atípicos. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet (* $p < 0.05$), $n = 2-6$.

7.2 Expresión de NT y enzimas antioxidantes en cerebro

Se empleó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar los niveles de GDNF y NGF en corteza frontal, estriado e hipocampo. Se consideraron células positivas a las NT, aquellas células que presentaron un inmunomarcaje de color café en el citoplasma. Mientras que el inmunomarcaje positivo para SOD2 se apreció como puntos localizados de forma perinuclear evidenciando la presencia de esta enzima en la mitocondria (Figura 18A).

7.2.1 Corteza frontal

Se presentan imágenes representativas de la corteza frontal del grupo CT y los grupos tratados con SAC 100, 200 y 400 mg/Kg. Con flechas rojas se señalan las células positivas para GDNF (Figura 18A, panel superior), NGF (Figura 18A, panel medio) y SOD2 (Figura 18A, panel inferior).

Se observó un aumento en la expresión de GDNF con las tres dosis de SAC evaluadas; sin embargo, este aumento (15%) solo fue significativo en el grupo que recibió 400 mg/Kg de SAC con respecto al grupo CT (Figura 18B, panel izquierdo).

En el caso de NGF se observó un aumento significativo en la expresión de esta NT en los grupos administrados con SAC 100 y 200 mg/Kg con respecto al grupo CT. El aumento observado en estos grupos fue de 79% (grupo SAC 100) y 73% (grupo SAC 200). A pesar de que el grupo que recibió SAC 400 mg/Kg presentó un aumento, este no fue estadísticamente significativo (Figura 18B, panel central).

Finalmente, SOD2 aumentó con las tres dosis de SAC; sin embargo, el aumento en la expresión de esta enzima sólo fue significativo en los grupos tratados con 100 y 400 mg/Kg de SAC con respecto al grupo CT. El tratamiento con SAC 100 aumentó un 82% la expresión de SOD2, mientras que en grupo SAC 400 el aumento fue del 84% (Figura 18B, panel derecho).

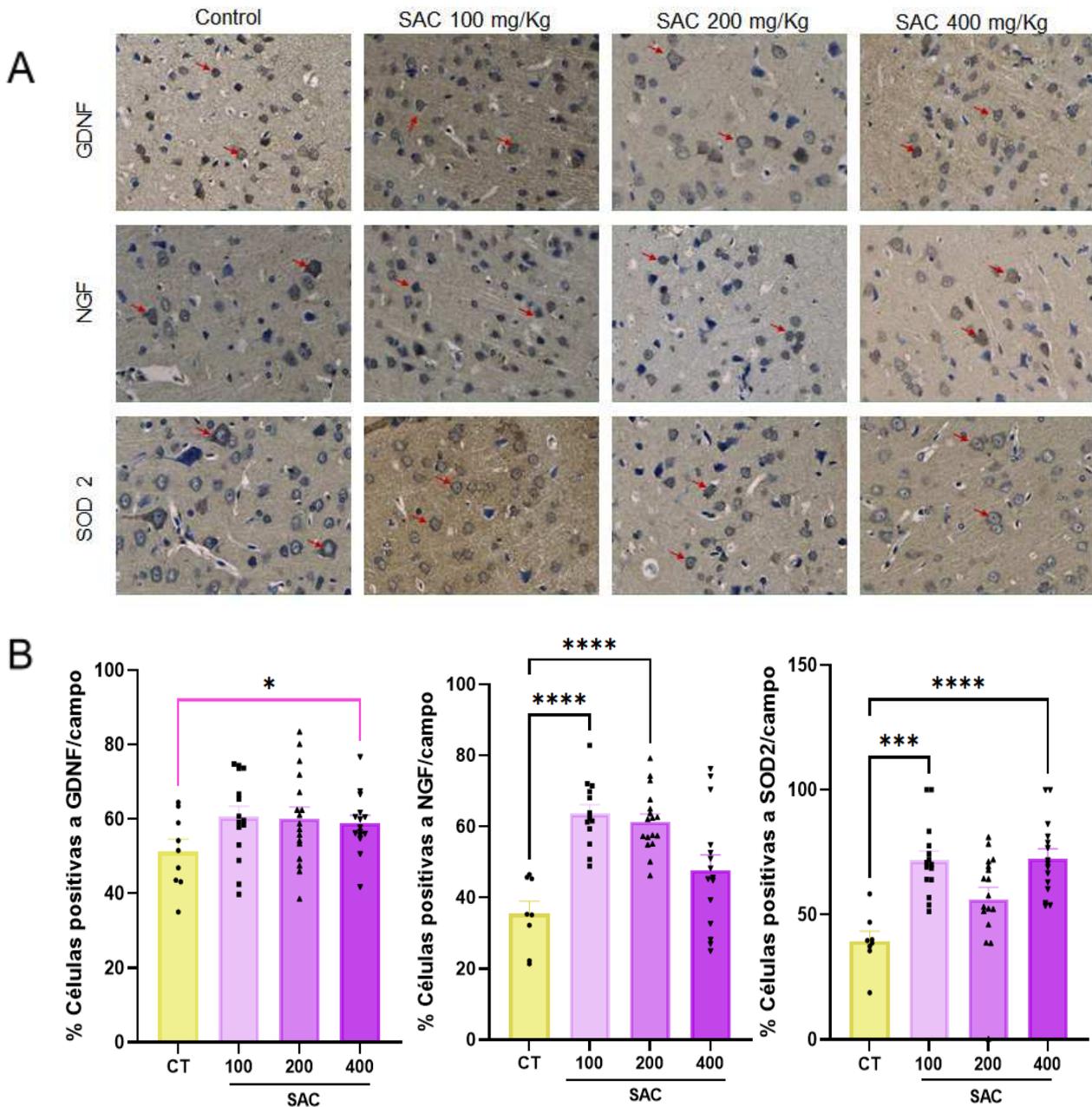


Figura 18. Efecto de la S-alicisteína (SAC) sobre los niveles de expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), NGF (factor de crecimiento nervioso) y SOD2 (superóxido dismutasa 2) en corteza frontal cerebral. Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. **(A)** Células positivas de color café se indican con flechas rojas, 40X. **(B)** Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas a GDNF, NGF y SOD2/campo. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet (** $p=0.001$, **** $p<0.0001$) y t-student (* $p<0.05$), $n=3-6$.

7.2.2 Estriado

Se presentan imágenes representativas del estriado para el grupo CT y los grupos tratados con SAC 100, 200 y 400 mg/Kg, señalando con flechas rojas las células positivas para GDNF (Figura 19A, panel superior), NGF (Figura 19A, panel medio) y SOD2 (Figura 19A, panel inferior). No se observaron diferencias en la expresión de GDNF (Figura 19A, panel superior) y NGF (Figura 19A, panel medio), ya que no se observaron células positivas en ninguno de los grupos.

Solo se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de la SOD2 con las tres dosis de SAC administradas con respecto al grupo CT. El mayor aumento en la expresión de SOD2 (382%) se observó en el grupo que recibió SAC 100 mg/Kg. Mientras que los grupos que recibieron SAC 200 y 400 mg/Kg presentaron un aumento del 198% y 218%, respectivamente (Figura 19B).

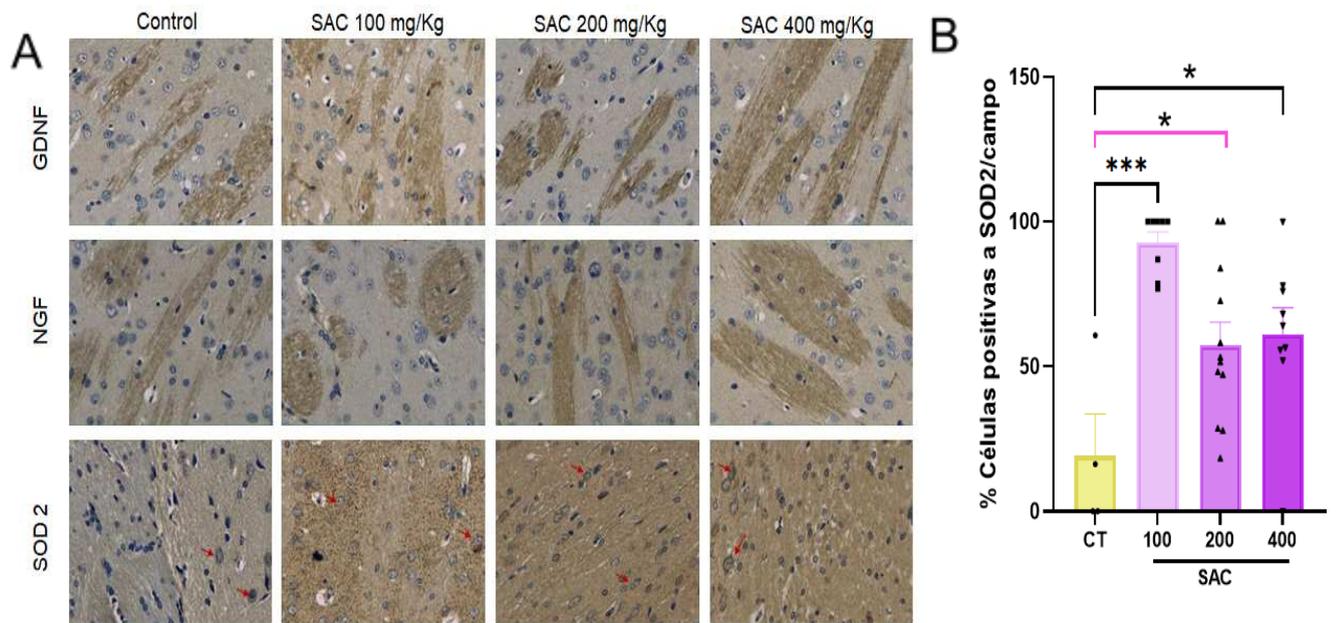


Figura 19. Efecto de la S-alicisteína (SAC) sobre la expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), NGF (factor de crecimiento nervioso) y SOD2 (superóxido dismutasa 2) en estriado cerebral. **(A)** Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. Células positivas de color café se indican con flechas rojas, 40X. **(B)** La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a SOD2/campo. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) y t-student (* $p < 0.05$, línea rosa), $n = 3-6$.

7.2.3 Hipocampo, regiones CA1, CA2 y giro dentado (GD)

Región CA1

Se presentan imágenes representativas de la región CA1 del hipocampo para el grupo CT y los grupos tratados con SAC 100, 200 y 400 mg/Kg, señalando con flechas rojas las células positivas para GDNF (Figura 20A, panel superior), NGF (Figura 20A, panel medio) y SOD2 (Figura 20A, panel inferior).

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de GDNF en los grupos tratados con SAC 100 y 200 mg/Kg con respecto al grupo CT (Figura 20B, panel izquierdo). El aumento en el grupo SAC 100 mg/Kg fue del 28%, mientras que en el grupo SAC 200 mg/Kg fue del 31%.

Por otro lado, se observó un incremento en la expresión de NGF en los grupos que recibieron SAC 100 y 200 mg/Kg un 38% y 24%, respectivamente con respecto al grupo CT (Figura 20B, panel central).

Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SOD2 en la región CA1 del hipocampo, en ninguno de los grupos estudiados (Figura 20B, panel derecho).

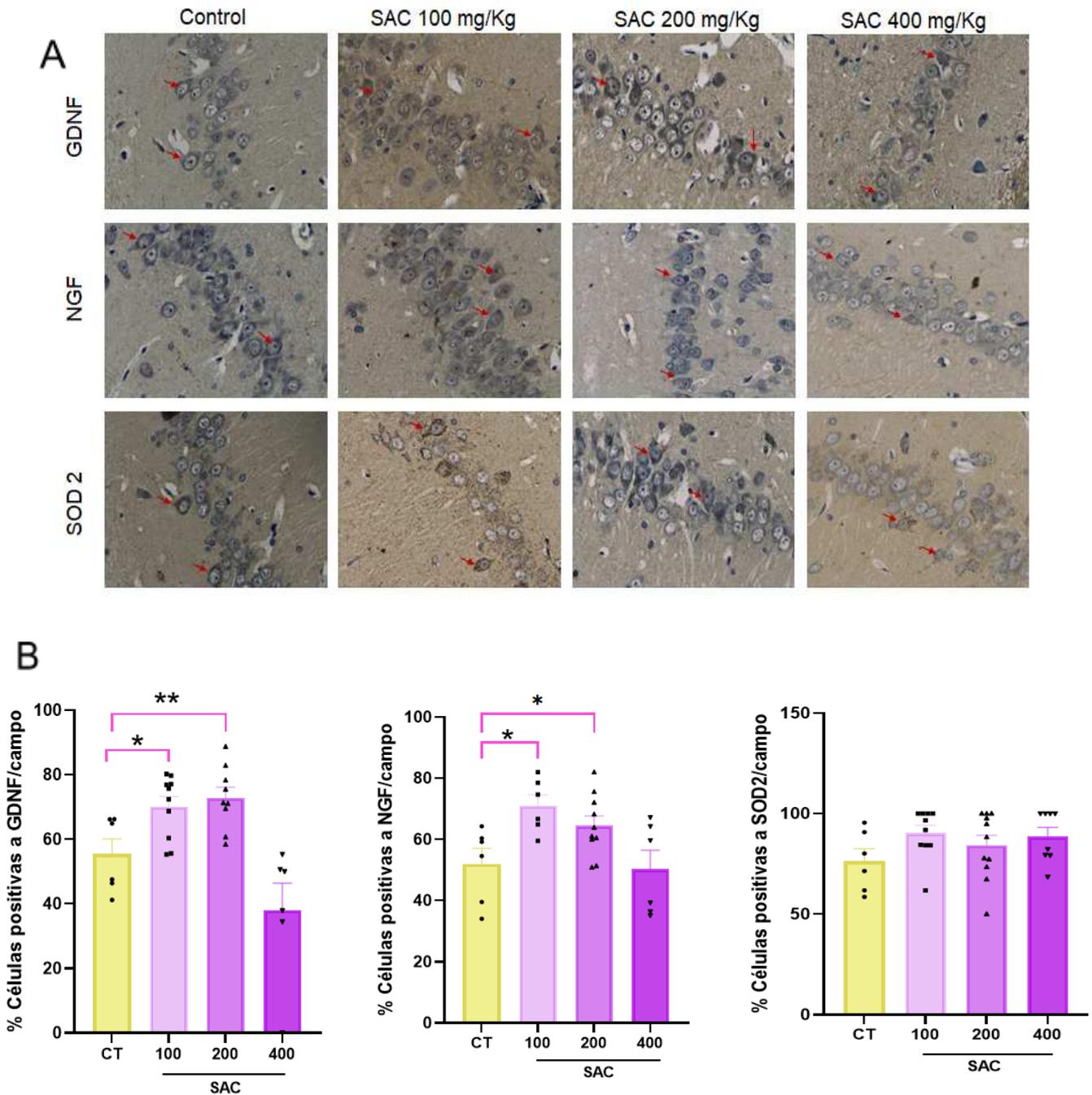


Figura 20. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), NGF (factor de crecimiento nervioso) y SOD2 (superóxido dismutasa 2) en la región CA1 del hipocampo. **(A)** Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. Células positivas de color café se indican con flechas rojas, 40X. **(B)** Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas a GDNF, NGF y SOD2/campo. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba t-student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), $n = 2-6$.

Región CA2

Se presentan imágenes representativas de la región CA2 del hipocampo para el grupo CT y los grupos tratados con SAC 100, 200 y 400 mg/Kg, señalando con flechas rojas las células positivas para GDNF (Figura 21A, panel superior), NGF (Figura 21A, panel medio) y SOD2 (Figura 21A, panel inferior).

Solo la expresión de NGF presentó un aumento significativo del 33% en el grupo tratado con SAC 100 mg/Kg comparado con el grupo CT (Figura 21B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de GDNF y SOD2 en la región CA2 del hipocampo (Figura 21A).

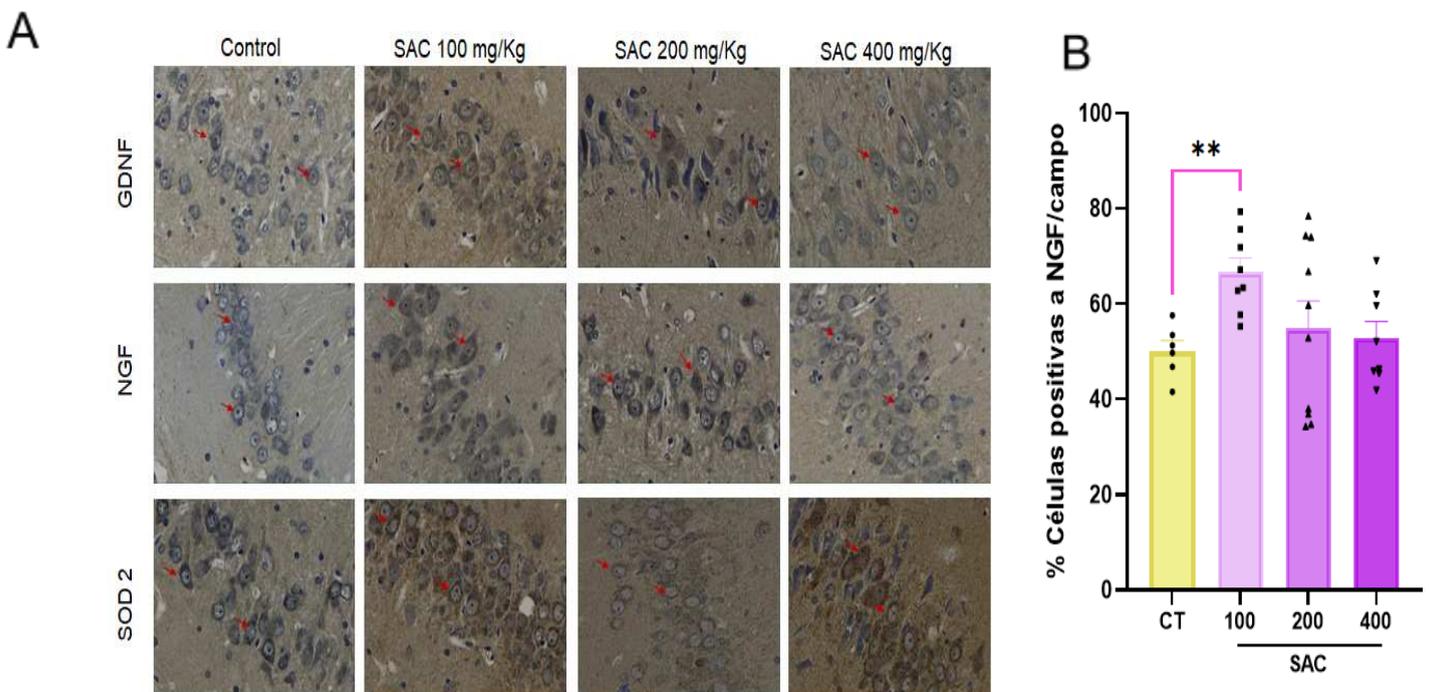


Figura 21. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), NGF (factor de crecimiento nervioso) y SOD2 (superóxido dismutasa 2) en la región CA2 del hipocampo. **(A)** Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. **(B)** Células positivas de color café se indican con flechas rojas, 40X. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a NGF/campo. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba t-student (** $p < 0.01$), $n = 2-6$.

Giro dentado

Se presentan imágenes representativas del GD del hipocampo para el grupo CT y los grupos tratados con SAC 100, 200 y 400 mg/Kg, señalando con flechas rojas las células positivas para GDNF (Figura 22, panel superior), NGF (Figura 22, panel medio) y SOD2 (Figura 22, panel inferior).

No se observaron diferencias en la expresión de GDNF, NGF y SOD2, en ninguno de los grupos estudiados.

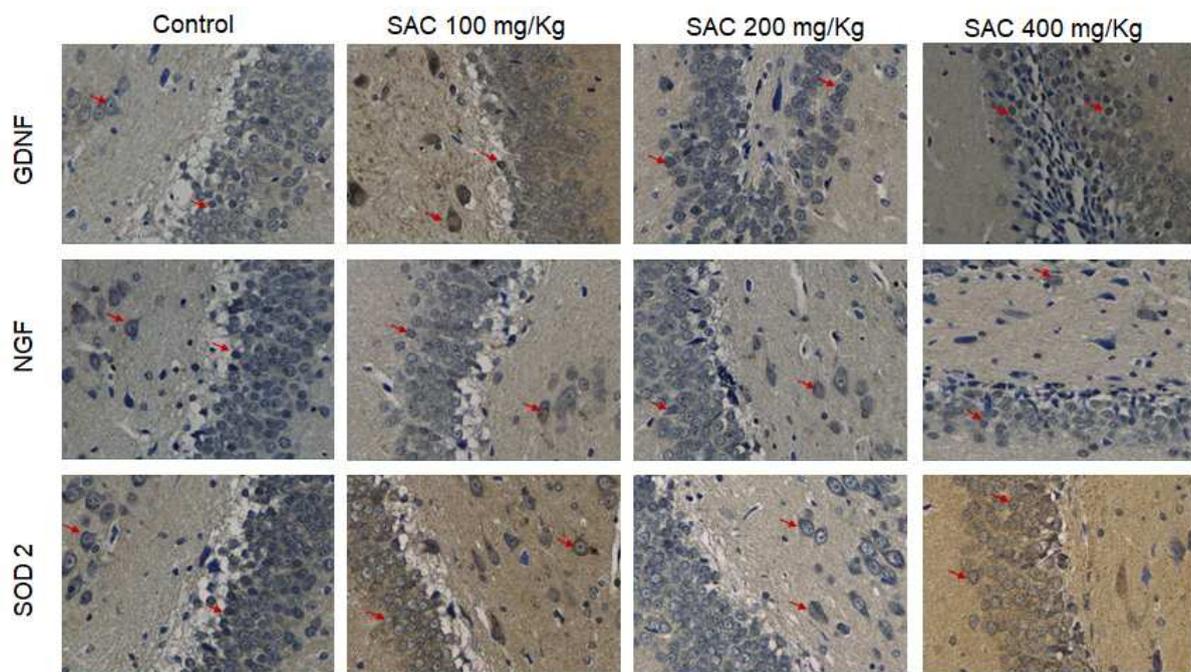


Figura 22. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), NGF (factor de crecimiento nervioso) y SOD2 (superóxido dismutasa 2) en el GD del hipocampo. Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. Células positivas de color café se indican con flechas rojas, 40X. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $*p < 0.05$, $n = 2-6$.

7.3 Daño morfológico en cerebro

Se muestran imágenes representativas de la corteza frontal (Cx), el estriado (St) y el hipocampo (regiones CA1, CA2 y GD). La administración crónica de SAC no indujo alteraciones morfológicas en ninguna de las regiones estudiadas. En todas se observa una morfología celular intacta: células redondas con un núcleo definido y el neuropilo eosinófilo se encuentra preservado (Figura 23).

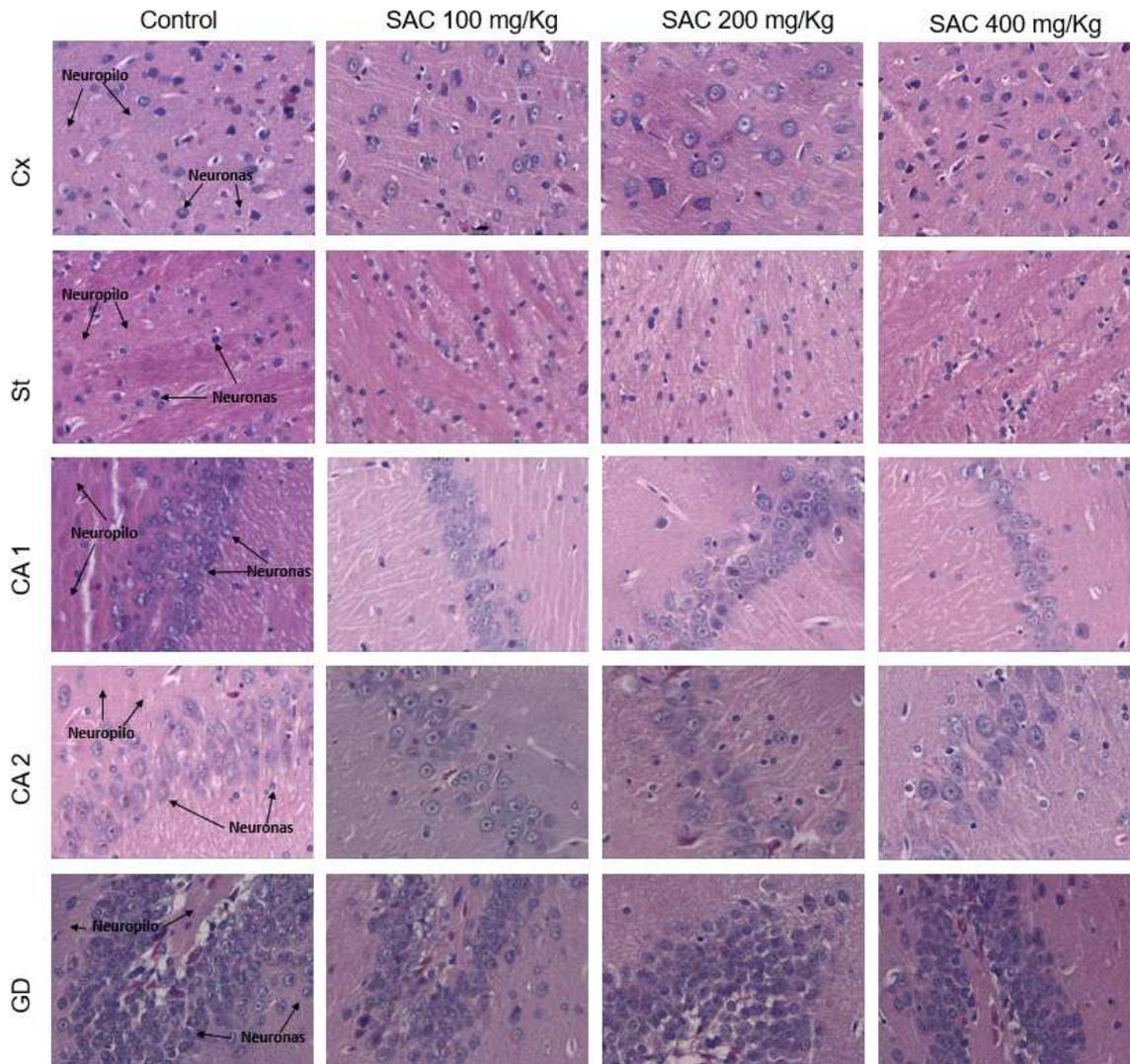


Figura 23. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre las alteraciones morfológicas en corteza frontal (Cx), estriado (St) y en la región CA1, CA2 y GD del hipocampo. Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. Se observa que las células (color púrpura) y el neuropilo (tejido eosinófilo) están intactos. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E), 40X. n= 3-6.

7.4 Expresión de enzimas antioxidantes en riñón

Se presentan imágenes representativas de la corteza renal de los animales del grupo CT y los grupos tratados con SAC 100, 200 y 400 mg/Kg. Se señalan con flechas rojas las células positivas para SOD1 en el citosol de color café (Figura 24A, panel superior), para SOD2 en las mitocondrias como puntos de color café alrededor del núcleo (Figura 24A, panel medio) y para GPx en el citosol de color café (Figura 24A, panel inferior).

Solo se observó un aumento en la expresión de la SOD1 en los grupos tratados con 200 y 400 mg/Kg de SAC, con respecto al grupo CT. El aumento en el grupo SAC 200 fue del 34%, mientras que en el grupo SAC 400 fue del 26% (Figura 24B).

No se observaron cambios en la expresión de SOD2 (Figura 24A, panel medio) y GPx (Figura 24A, panel inferior) en ninguno de los grupos estudiados.

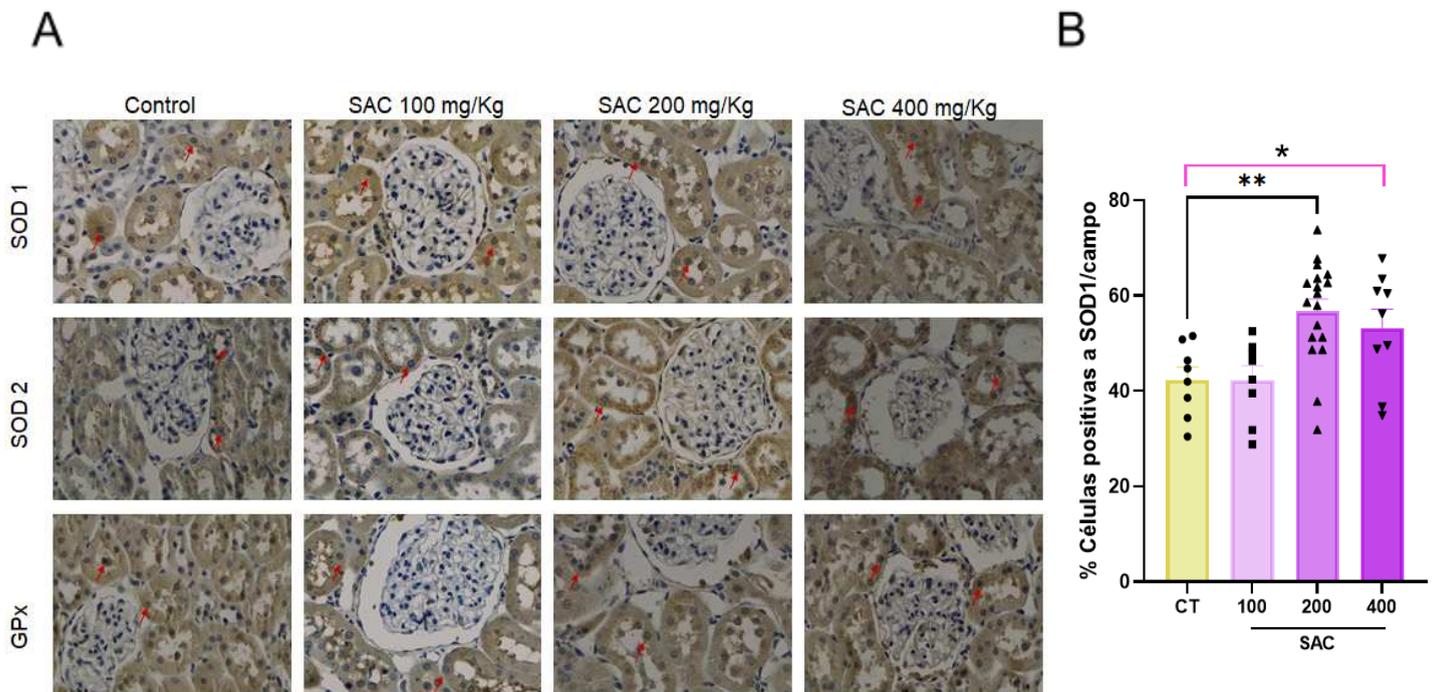


Figura 24. Efecto de la S-alicisteína (SAC) sobre la expresión de SOD1 (superóxido dismutasa 1), SOD2 (superóxido dismutasa 2) y GPx (glutación peroxidasa) en riñón. Se muestran imágenes representativas de la corteza renal del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. (A) Células positivas de color café se indican con flechas rojas, 40X. (B) La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a SOD1/campo. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnett (** $p < 0.01$) y t-student (* $p < 0.05$, línea rosa), $n = 2-6$.

7.5 Nivel de proteínas en orina

La administración de SAC 200 mg/Kg aumentó significativamente un 73% la excreción de proteínas en orina con respecto al grupo CT (Figura 25).

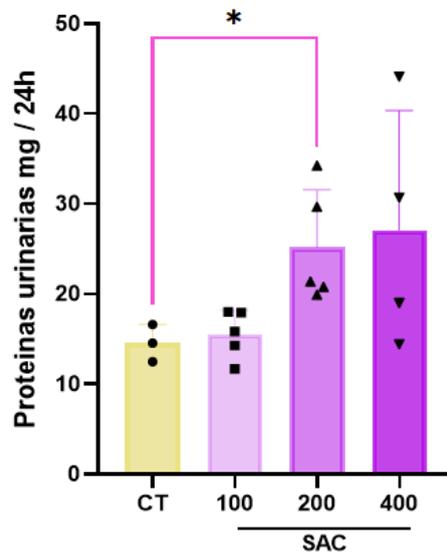


Figura 25. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la excreción de proteínas urinarias. Se presentan los mg de proteína excretados en 24 h en los animales del grupo control (CT) y los grupos administrados SAC (100, 200 y 400 mg/Kg). Los datos se presentan como la media±error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba t-student (* $p < 0.05$), $n = 3-5$.

7.6 Daño morfológico en riñón

No se observó daño histológico en el grupo CT ni en ninguno de los grupos tratados con SAC. En los cuatro grupos se observó una morfología renal normal con el glomérulo intacto y una cápsula de Bowman evidente. Además, los túbulos proximales y distales presentaron una morfología característica. En los túbulos proximales las células son cúbicas y gruesas y se distingue el borde en cepillo. Tienen un abundante citoplasma eosinófilo y por ello su lumen es discreto. A diferencia de los túbulos proximales, los túbulos distales tienen un lumen mayor debido a que sus células son en forma de tubo (delgadas). En ambos casos el núcleo de estas células es evidente (Figura 26).

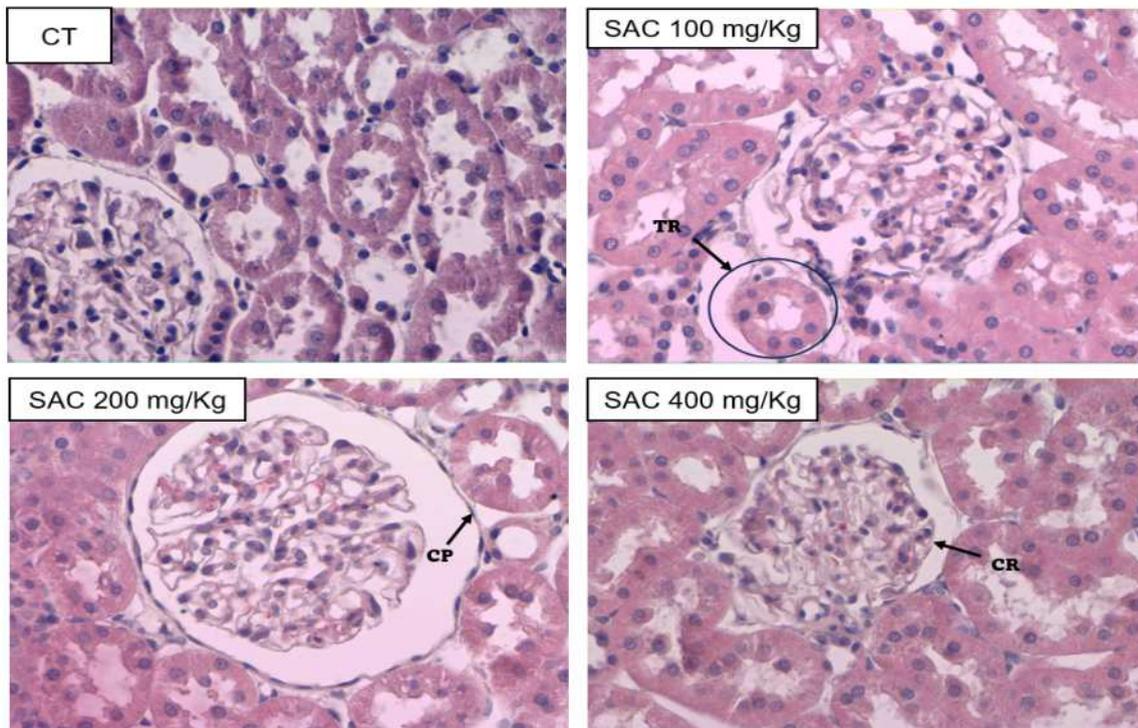


Figura 26. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre las alteraciones morfológicas en riñón. Se muestran imágenes representativas del grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg de peso) por 90 días. Se señalan las siguientes estructuras: Corpúsculo renal (CR), Capa parietal de la capsula de Bowman y Túbulos renales (TR). Tinción de H&E, 40X. n= 2-6.

7.7 Actividad de las enzimas antioxidantes y el nivel de proteínas oxidadas en plasma

La administración crónica de SAC 100 y 200 mg/Kg aumentó la actividad plasmática de la SOD con respecto al grupo CT (42% y 55%, respectivamente) (Figura 27).

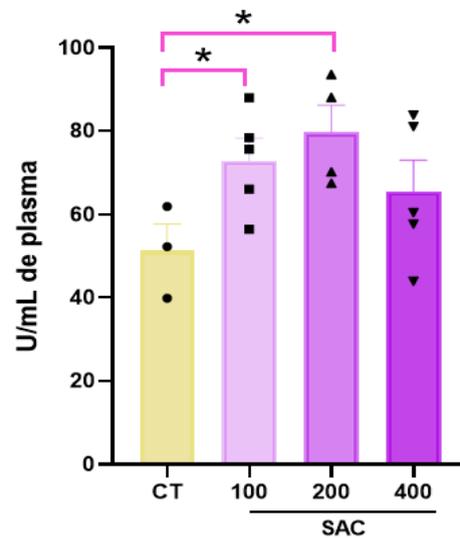


Figura 27. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la actividad de SOD en plasma. Se presenta la actividad en U/ml en el grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC (100, 200 y 400 mg/Kg). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba t-student (* $p < 0.05$), $n = 4-5$.

No se observaron cambios en la actividad de las enzimas CAT, GPx y GST, así como en el nivel de proteínas oxidadas en el plasma de los grupos estudiados (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx, GST y nivel de proteínas oxidadas en plasma.

	Control (CT)	SAC 100 mg/Kg	SAC 200 mg/Kg	SAC 400 mg/Kg
CAT (U/mL)	3.592 ± 0.8529	3.554 ± 0.4268	4.564 ± 0.7474	2.776 ± 0.4191
GPx (U/mL)	0.7296 ± 0.05207	0.7581 ± 0.05467	0.8917 ± 0.04313	0.863 ± 0.09176
GST (U/mL)	0.05599 ± 0.003054	0.06568 ± 0.003600	0.06078 ± 0.008814	0.0472 ± 0.004139
Proteínas oxidadas (nmol/mg proteína)	6.563 ± 0.6782	7.357 ± 0.6762	5.797 ± 0.3687	7.763 ± 1.144

Los datos se presentan como la media ± error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Dunnet. No se observaron diferencias estadísticas, n=4-5.

7.8 Peso corporal

Los animales iniciaron con un peso promedio de 324.94 g y llegaron a peso promedio de 460.5 g (día 90); se observó un aumento progresivo a lo largo del tratamiento en todos los grupos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se administraron diferentes dosis de SAC en ratas macho Wistar sanas durante tres meses, para evaluar su efecto sobre la memoria, los niveles de NT y enzimas antioxidantes, así como la toxicidad en diferentes regiones cerebrales, con la finalidad de proponer su uso como un suplemento alimenticio en el envejecimiento o como coadyuvante neuroprotector en padecimientos neurológicos que cursen con alteraciones de la memoria como el infarto cerebral, la enfermedad de Alzheimer, entre otros padecimientos (Colín-González et al., 2012). Además, se cuantificó el nivel y la actividad de enzimas antioxidantes en riñón y plasma, respectivamente. Debido a que es la principal vía de eliminación de este compuesto.

Las pruebas conductuales son una herramienta útil en investigación para la evaluación y tamizaje de moléculas, con potencial efecto neuroprotector en modelos preclínicos de diferentes padecimientos (D'Hooge & De Deyn, 2001). En este trabajo, las dosis de SAC 100 y 200 mg/Kg mejoraron la memoria a corto plazo (**Figura 15**), ya que los animales pasaron más tiempo explorando el objeto novedoso, en la prueba de reconocimiento de objetos (Lian et al., 2018). Sin embargo, ninguna de las dosis de SAC mejoró la memoria a largo plazo (**Figura 15**).

La exposición a un objeto novedoso activa vías de señalización intracelular en el hipocampo; como las vías MEK/ERK y PI3K/Akt, las cuales pueden ser inducidas por NT como VEGF, BDNF, NGF, GDNF, entre otras, promoviendo la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica, dos procesos necesarios para la memoria (Massaad & Klann, 2011).

Se ha descrito que los niveles del factor de transcripción CREB fosforilado (pCREB) aumenta 1 o 2 h después de la exposición única durante 5 min a un ambiente novedoso (campo abierto), pero regresan a niveles normales después de 3 h de la exposición (Justel & Psyrdellis, 2014). Los cambios observados en la memoria a corto plazo podrían estar relacionados con el incremento de pCREB y con la activación rápida y reversible de las cascadas de señalización en los grupos tratados con SAC, pero no con la consolidación de la memoria a largo plazo.

Por otro lado, Hashimoto y colaboradores (2020) encontraron que la SAC aumentó el largo y el número de dendritas en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Además, en ratones senescentes este compuesto mejoró la memoria a corto plazo debido a que evitó la disminución de los receptores Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) y la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) en hipocampo. La formación de la memoria comienza con la estimulación de las neuronas presinápticas, lo que provoca la liberación de glutamato, el cual activa los receptores AMPA y NMDA en la neurona postsináptica. Esto permite la entrada excesiva de Ca^{2+} , desencadenando la producción de AMPc y guanosina monofosfato cíclico/óxido nítrico. Estos mensajeros activan vías de señalización como CaMKII, PKA, PKC y ERK las cuales llevan a la fosforilación de CREB, que a su vez recluta coactivadores para iniciar la transcripción y traducción (Massaad & Klann, 2011). Lo anterior podría estar ocurriendo en los animales tratados con SAC durante tres meses empleados en este trabajo.

Adicionalmente la prueba de Morris se usó para evaluar el aprendizaje espacial, así como la consolidación/almacenamiento de la memoria (D'Hooge & De Deyn, 2001). En la evaluación del aprendizaje espacial se observó una disminución del tiempo en el que los animales encontraron la plataforma en los ensayos (**Figura 16**). Además, el día de la prueba final el tratamiento con SAC (100 y 400) mejoró la memoria y el aprendizaje comparado con el grupo control (**Figura 17**). Durante los ensayos la activación sostenida y repetida de los receptores AMPA y NMDA, inducen factores de transcripción (CREB) que inducen la expresión de nuevas proteínas. Estas modulan la fuerza y eficacia sinápticas modificando las propiedades eléctricas de las membranas, aumentando la expresión de los receptores AMPA y NMDA, alterando la morfología sináptica y aumentando la sinapsis. Lo anterior es necesario para la potenciación a largo plazo (PLP) y formación de recuerdos (Massaad & Klann, 2011). La PLP es una forma de plasticidad sináptica que se ha relacionado con el aprendizaje y la memoria espacial (Massaad & Klann, 2011). En este trabajo la SAC demostró ser capaz de consolidar la memoria a largo plazo después de los ensayos, probablemente debido a que estimula la síntesis de nuevas proteínas que ayudaron a los animales a adquirir y recuperar conocimiento sobre su entorno. Esto permitió a

los animales localizar de manera más rápida y eficiente el cuadrante donde se encontraba la plataforma (**Figura 17**).

El efecto observado sobre la memoria y el aprendizaje en los animales administrados con SAC podría estar asociado con cambios en los niveles de neurotrofinas. Debido a esto en este trabajo se cuantificaron los niveles de NGF y GDNF. La administración de SAC incrementó los niveles de NGF en corteza (SAC 100 y 200) en las regiones CA1 (SAC 100 y 200) y CA2 (SAC 100) del hipocampo (**Figuras 18, 20 y 21**). Además, GDNF (SAC 400) aumentó en corteza y la región CA1 (SAC 100 y 200) del hipocampo (**Figuras 18 y 20**). El estriado no presentó células positivas a NGF y GDNF con ninguna de las dosis usadas de SAC (**Figura 19**). En la región de giro dentado del hipocampo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estas NT (**Figura 22**).

En condiciones fisiológicas los niveles más altos de NGF y GDNF se encuentran en el hipocampo y en corteza, apoyando la transmisión sináptica y participando en procesos de aprendizaje y memoria (Rocha & Teixeira, 2017). Los resultados de este trabajo muestran que la SAC incrementa el nivel de proteína de NGF y GDNF en estas dos regiones, debido a que aumenta su expresión o disminuye su eliminación. Sin embargo, más estudios son necesarios para contestar esta pregunta.

Los cambios observados en la memoria y el aprendizaje podrían estar relacionados con el aumento de NGF y GDNF en el hipocampo que llevarían al aumento de los niveles de pCREB, que regula la expresión de novo de proteínas involucradas en la adaptabilidad del animal a la situación experimental a la cual fue sometido. La fosforilación de CREB se incrementa por la activación de las vías de señalización CaMKII, PKA, PKC y ERK (Massaad & Klann, 2011). También otras regiones del cerebro como el tálamo (principal estación de relevo) y la corteza prefrontal (planificación y adaptación a condiciones cambiantes) participan en el aprendizaje espacial (Vicens et al, 2003).

Adicionalmente, el incremento en los niveles de NGF y GDNF en el cerebro de animales tratados con SAC podría contribuir a la supervivencia, el crecimiento y el

mantenimiento de neuronas específicas en el SNC y SNP (Allen et al., 2013). En el caso de GDNF, este está asociado principalmente con la función motora y podría ser eficaz en padecimientos que cursen con déficits cognitivos y motores o bien en el envejecimiento. Comparado con otras neurotrofinas, GDNF es un candidato prometedor para detener la pérdida de la función, la degeneración y la muerte de las motoneuronas en enfermedades como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofas musculares espinales (AME) y enfermedad de Parkinson (EP) (Rocha & Teixeira, 2017).

La presencia del factor transcripción CREB también protege a las neuronas por medio de la regulación de las ERO. Se ha demostrado que CREB estimula la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD y GPx, lo que contribuye a mitigar el daño celular al incrementar los factores antioxidantes (Sakamoto, et al., 2010).

El aumento de NGF y GDNF está relacionado con la actividad de enzimas antioxidantes, lo podría favorecer el aprendizaje y la memoria. La reducción del daño oxidativo, junto con la generación y fortalecimiento de plasticidad sináptica, contribuyen a crear un ambiente enriquecedor o neuroprotector en el cerebro.

Diversos estudios han demostrado que las ERO desempeñan un papel importante en la inducción de la PLP. En condiciones normales las ERO son importantes para la plasticidad y la señalización. Sin embargo, cuando se acumulan en exceso en el cerebro pueden resultar perjudiciales, ya que modifican la función neuronal y la memoria. Las ERO como moduladores de la función de la memoria, actúan regulando moléculas de señalización, receptores y canales relacionados con la plasticidad sináptica; estos incluyen a los receptores NMDA, canales de calcio (Ca^{2+}), canales de potasio, la Ca^{2+} /calmodulina cinasa II (CaMKII), la ERK, el AMPc y el factor de transcripción CREB (Massaad & Klann, 2011). Las ERO son reguladas por enzimas antioxidantes como la SOD y los animales administrados con SAC presentaron un incremento en la cantidad de SOD2 (isoforma mitocondrial) en corteza (SAC 100 y 400) y estriado (SAC 100, 200 y 400), comparado con el grupo control (**Figura 18 y 19**). Estos resultados sugieren que el consumo de SAC podría otorgar grandes beneficios en el envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas y los eventos cerebrovasculares, que muestran un aumento en

la producción de ERO y una disminución en las defensas antioxidantes, ocasionando estrés oxidativo neuronal que puede causar déficit en la memoria espacial (Massaad & Klann, 2011).

Durante el envejecimiento y en los padecimientos neurodegenerativos, se requieren tratamientos crónicos. Por ello, en este trabajo se evaluó si la administración crónica con SAC presentaba un efecto tóxico en corteza, estriado e hipocampo. El tratamiento con este compuesto no causó daño en ninguna zona del cerebro estudiada. Los paneles de imágenes muestran neuropilos intactos y células bien definidas en los diferentes grupos con tratamiento al igual que en el grupo control (**Figura 23**). Lo que refuerza el uso de la SAC en este tipo de padecimientos.

Debido a que la SAC se administró por vía intragástrica, nos interesó evaluar el efecto de este compuesto en otros tejidos, como la sangre y el riñón ya que este es la principal vía de eliminación.

En riñón se observó un incremento en los niveles de SOD 1 (SAC 200 y 400), mientras SOD 2 y GPx no presentaron cambios (**Figura 24**). Se ha descrito que la SAC aumenta el factor de transcripción Nrf2 en hígado y cerebro. Este factor regula la expresión de proteínas antioxidantes (Colín-González et al., 2012). Este mecanismo podría ser el responsable del aumento de los niveles de SOD 1 en riñón de los animales tratados con SAC de manera crónica. Un aumento en la expresión de SOD1 sugiere una reducción en los niveles de anión superóxido renal; por lo tanto, proporciona una defensa importante contra la acumulación de ERO (Carlström et al., 2010). La administración de la SAC puede ser beneficiosa para el riñón al detener o mitigar este daño oxidativo asociado con el envejecimiento preservando su función durante mucho tiempo.

Además, se observó un incremento en los niveles de proteínas urinarias (SAC 200) (**Figura 25**). Este resultado es contrario al observado por Kodera y colaboradores (2002) quienes encontraron una disminución en los niveles de proteínas urinarias con dosis de 1000 mg/Kg. Estas diferencias pueden deberse a la edad de los animales y al esquema de administración. En este trabajo se emplearon animales con un peso inicial de 300 g y un esquema de administración de tres meses con

dosis de 100, 200 y 400 mg, mientras que el llevado a cabo por Koderá emplearon animales de 150 g administrados durante un mes con dosis de 250-2000 mg/Kg de SAC.

A pesar del incremento de proteínas urinarias, no se observaron cambios morfológicos con ninguna de las dosis de SAC empleadas ya que se observó una morfología normal de glomérulos y túbulos renales comparado con el grupo control (**Figura 26**).

Finalmente, en plasma sólo se observó un aumento en la actividad de la SOD (**Figura 27**), mientras que CAT, GPx y GST no presentaron cambios (**Tabla 7**). La presencia de SOD en plasma es relevante para protección, ya que niveles bajos de esta enzima pueden estar relacionados con enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Adicionalmente, no se observaron cambios en los niveles de proteínas oxidadas en plasma (**Tabla 7**), debido probablemente al incremento en los niveles de SOD inducidos por la SAC.

CONCLUSIONES

El consumo crónico de la SAC mejoró la memoria a corto plazo y el aprendizaje en ratas Wistar macho sanas, este efecto podría estar asociado con el incremento de GDNF y NGF en corteza e hipocampo.

El consumo crónico de SAC no indujo alteraciones morfológicas en corteza frontal, estriado e hipocampo, así como en el riñón (principal vía de eliminación de la SAC).

Con base a los hallazgos mencionados anteriormente, se acepta la hipótesis, ya que estos resultados sugieren que la SAC podría ser consumida de forma crónica como un suplemento alimenticio en adultos jóvenes sanos o bien podría ser usado como un coadyuvante o un agente neuroprotector en aquellos padecimientos neurodegenerativos en los que se ve afectada la memoria.

REFERENCIAS

Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), Article 5.

Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(2), 155-175.

Al-Qudah, M. A., & Al-Dwairi, A. (2016). Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion. *Neurosciences*, 21(4), 306-313.

Amagase, H. (2006). Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic¹. *The Journal of Nutrition*, 136(3), 716S-725S.

Appelbaum, L. G., Shenasa, M. A., Stolz, L., & Daskalakis, Z. (2023). Synaptic plasticity and mental health: Methods, challenges and opportunities. *Neuropsychopharmacology*, 48(1), 113-120.

Bautista-Perez, S. M., Silva-Islas, C. A., Sandoval-Marquez, O. U., Toledo-Toledo, J., Bello-Martínez, J. M., Barrera-Oviedo, D., & Maldonado, P. D. (2023). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Garlic in Ischemic Stroke: Proposal of a New Mechanism of Protection through Regulation of Neuroplasticity. *Antioxidants*, 12(12), 2126.

Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study «recognition memory». *Nature Protocols*, 1(3), Article 3.

Bilbao Abraham, Y., Russeaux Guía, N., Valdés Díez, L., & Bueno Ruiz, M. del C. (1995). Evaluación de una tira reactiva biparamétrica para determinar pH y proteínas en orina. *Revista Cubana de Enfermería*, 11(3), 11-12.

Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *The Journal of Nutrition*, 131(3s), 1010S-5S.

Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The Use of the Morris Water Maze in the Study of Memory and Learning. *International Journal of Neuroscience*, 48(1-2),

29-69.

Cachofeiro, V., Lahera, V., Tresguerres, J. (2005). Aspectos anatomofuncionales del riñón. Fisiología Humana. Tresguerres J.A.F. Editorial Mc Graw Hi. Interamericana. pp. 375-378.

Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O., Pedraza-Chaverrí, J. (2008). Glutación peroxidasas: una familia de enzimas. Radicales y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 201-202.

Carlström M, Yin E, Ma Z, Steege A, Patzak A, Eriksson U, Lundberg J, Wilcox C, Persson A. (2010). SOD1 Limits Renal Microvascular Remodeling and Attenuates Arteriole and Blood Pressure Responses to Angiotensin II via Modulation of Nitric Oxide Bioavailability, *Hypertension*, 56(5), 907-913. vol. 10, pp. 18

Chen, P.-H., Chang, C.-H., Lin, W.-S., Nagabhushanam, K., Ho, C.-T., & Pan, M.-H. (2022). S-Allylcysteine Ameliorates Aging Features via Regulating Mitochondrial Dynamics in Naturally Aged C57BL/6J Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(7), 2101077.

Cloke, H. (2023, 28 marzo). *The Neuroscience of Memory*. Growth Engineering. <https://www.growthengineering.co.uk/the-neuroscience-of-memory/>

Colín-González, A. L., Santana, R. A., Silva-Islas, C. A., Chánez-Cárdenas, M. E., Santamaría, A., & Maldonado, P. D. (2012). The Antioxidant Mechanisms Underlying the Aged Garlic Extract- and S-Allylcysteine-Induced Protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, pp. 1-16

Crisman, E., Duarte, P., Dauden, E., Cuadrado, A., Rodríguez-Franco, M., G., López, M., León, R. (2023). KEAP1-NRF2 protein-protein interaction inhibitors: Design, pharmacological properties and therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews*, 43(1): 237-287.

Del Arenal-Mena, I., Guevara-Flores, A., Martínez-González, J. (2020). Homeostasis redox. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM, pp. 72-86.

D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, 36(1), 60-90.

Díaz, C., Rodríguez, M. M., Fresneda, M., & Bisset, J. A. (2004). Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(2), 111-116.

Dickson, M., & Gagnon, J. P. (2004). Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(5), Article 5.

Eaton D, Gilbert S. (2010). Chapter 2. Principles of Toxicology. Klaassen C. D. & Watkins J.B. III (Eds.) *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology*, 2e. The McGraw-Hill Companies.

Ferroni, N., Chertoff, M. J., Alberca, C.D., Barardina, B. G., Gianatiempo, O., Brahamian, M., Levi, V., Urrutia, L., Falasco, G., Cánepa, E.T., Sonzogni, S.V. (2023). Oxidative stress associated with spatial memory impairment and social olfactory deterioration in female mice reveals premature aging aroused by perinatal protein malnutrition. *Experimental Neurology*, Vol. 368, 114481.

Frade J., Barde Y., (1999). Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development*, 126(4) pp 683-690.

Franco-Enzástiga, Ú., Santana-Martínez, R., Silva-Islas, C. A., Barrera-Oviedo, D., Chánez-Cárdenas, M. E., & Maldonado, P. D. (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*, Vol. 42, pág. 3041-3051.

Gámez R, Más R. (2007). Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC ciencias biológicas*, vol 38, pp. 204-208.

Gómez-Quiroz, L., Cuevas-Bahena, D. (2008). Superóxido dismutasa. Radicales y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 170-176.

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

Griffiths, H. R., Dias, I. H. K., Willetts, R. S., & Devitt, A. (2014). Redox regulation of protein damage in plasma. *Redox Biology*, 2, 430-435.

Hansberg, W. (2008). El dioxígeno y sus especies reactivas. Radicales y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 25 -44.

Hashimoto, M., Nakai, T., Masutani, T., Unno, K., & Akao, Y. (2020). Improvement of Learning and Memory in Senescence-Accelerated Mice by S-Allylcysteine in Mature Garlic Extract. *Nutrients*, 12(6).

He, L., Wei, Q., Liu, J., Yi, M., Liu, Y., Liu, H., Sun, L., Peng, Y., Liu, F., Venkatachalam, M.A., Dong, Z. (2017). AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms. *Kidney International*, Vol. 92, pág. 1072-1083.

Hernández-Cruz, E. Y., Silva-Islas, C. A., Maldonado, P. D., Pedraza-Chaverri, J., & Carballo-Villalobos, A. I. (2022). Antinociceptive effect of garlic, garlic preparations and derivative compounds. *European Journal of Pain*, 26(5), 947-964.

Hu, D., Cao, P., Thiels, E., Chu, C.T., Wu, G., Oury, T.D., Klann, E. (2007). Hippocampal long-term potentiation, memory, and longevity in mice that overexpress mitochondrial superoxide dismutase. *Neurobiology Of Learning And Memory*, Vol. 87, pág. 372-384.

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual review of neuroscience*, 24, 677-736.

Issa, N. T., Wathieu, H., Ojo, A., Byers, S. W., & Dakshanamurthy, S. (2017). Drug Metabolism in Preclinical Drug Development: A Survey of the Discovery Process, Toxicology, and Computational Tools. *Current drug metabolism*, 18(6), 556-565.

Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F.J., & Pérez- Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642.

Justel, N., & Psydellis, M. (2014). Novedad y modulación de la memoria: Mecanismos neurobiológicos implicados. *Interdisciplinaria Revista de Psicología y Ciencias Afines*, 31(2).

Kalayarasan, S., Sriram, N., Sureshkumar, A., & Sudhandiran, G. (2008). Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 28(7), 908-919.

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.

Kitada M., Xu J., Ogura Y., Monno I., Koya D. (2020). Manganese superoxide dismutase dysfunction and the pathogenesis of kidney disease. *Frontiers In Physiology*, 11:755.

Kodera, Y., Suzuki, A., Imada, O., Kasuga, S., Sumioka, I., Kanezawa, A., Taru, N., Fujikawa, M., Nagae, S., Masamoto, K., Maeshige, K., & Ono, K. (2002). Physical, Chemical, and Biological Properties of S-Allylcysteine, an Amino Acid Derived from Garlic. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 50(3), 622-632.

La memoria: Definición, tipos, ejercicios y evaluación. (2022, junio 14). <https://www.neuronup.com/neurociencia/neuropsicologia/memoria/la-memoria-definicion-tipos-ejercicios-y-evaluacion/>

Lanni, C., Stanga, S., Racchi, M., & Govoni, S. (2010). The Expanding Universe of Neurotrophic Factors: Therapeutic Potential in Aging and Age-Associated Disorders. *Current pharmaceutical design*, 16, 698-717.

Lawson, L. D. (1998). Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds. En *Phytomedicines of Europe* (Vol. 691, pp. 176-209). American Chemical Society.

Lian, B., Gao, J., Sui, N., Feng, T., & Li, M. (2018). Object, spatial and social recognition testing in a single test paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, 152, 39-49.

Magos G, Lorenzana-Jiménez M. (2009) Las fases en el desarrollo de los nuevos medicamentos. *Revista facultad de medicina UNAM*, vol. 52, pp 260-264.

Maldonado, P. D., Alvarez-Idaboy, J. R., Aguilar-González, A., Lira-Rocha, A., Jung-Cook, H., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., & Galano, A. (2011). Role of Allyl Group in the Hydroxyl and Peroxyl Radical Scavenging Activity of S-Allylcysteine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(45), 13408-13417.

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

Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxidants And Redox Signaling*, 14(10), 2013-2054.

McNamara, R. K., & Skelton, R. W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research Reviews*, 18(1), 33-49.

Mecocci, P., Boccardi, V., Cecchetti, R., Bastiani, P., Scamosci, M., Ruggiero, C., &

Baroni, M. (2018). A Long Journey into Aging, Brain Aging, and Alzheimer's Disease Following the Oxidative Stress Tracks. *Journal Of Alzheimer S Disease*, Vol. 62, pág. 1319-1335.

Melguizo-Rodríguez, L., García-Recio, E., Ruiz, C., Luna-Bertos, E. D.,

Illescas-Montes, R., & Costela-Ruiz, V. J. (2022). Biological properties and therapeutic applications of garlic and its components. *Food & Function*, 13(5), 2415-2426.

Miranda, L. (2008). Radicales y estrés oxidativo. Química de los radicales libres. Aplicaciones médicas. Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 4

Missaire, M., Fraize, N., Joseph, M. A., Hamieh, A. M., Parmentier, R., Marighetto, A., Salin, P. A., & Malleret, G. (2017). Long-term effects of interference on short-term memory performance in the rat. *PLoS ONE*, 12(3), e0173834.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(Pt 1), 1-13.

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

Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: A structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 138-151.

Peña-Esparragoza, J. K., Gimena, R., Ramos, J. M., & Doyáguez, P. R. (2023). Protocolo diagnóstico de la proteinuria. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(79), 4699-4702.

Peraza, L. (2008). Catalasa. Radicales y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 184-186, 193-194 y 199

Piña C., Lara M., Moreno H., Merino J., Thompson M., Rosas G., (2014). Factor neurotrófico derivado de la glía: una promesa terapéutica para la enfermedad de Parkinson. *Rev Esp Med Quir*. pp 88-95.

Pramanik, S., Sulistio, Y. A., & Heese, K. (2017). Neurotrophin Signaling and Stem Cells—Implications for Neurodegenerative Diseases and Stem Cell Therapy.

Molecular Neurobiology, 54(9), 7401-7459.

Ramos, T. (2016). Contexto actual de los estudios preclínicos. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. *Ecuador*. (Vol. 1, pp. 103-105)

Rapp, P. R., Rosenberg, R. A., & Gallagher, M. (1987). An evaluation of spatial information processing in aged rats. *Behavioral Neuroscience*, 101(1), 3-12.

Reyes-Soto, C., Rangel-López, E., Galván-Arzate, S., Colín-González, A. L., Silva-Palacios, A., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., Ramírez, J., Chavarria, A., Túnez, I., Ke, T., Aschner, M., & Santamaría, A. (2020). S-allylcysteine Protects Against Excitotoxic Damage in Rat Cortical Slices Via Reduction of Oxidative Damage, Activation of Nrf2/ARE Binding and BDNF Preservation. *Neurotoxicity Research*, 38 (4): 929-940.

Richardson, C., Yan, S., & Vestal, C. G. (2015). Oxidative Stress, Bone Marrow Failure, and Genome Instability in Hematopoietic Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), Article 2.

Rizwana, N., Agarwal, V., & Nune, M. (2022). Antioxidant for Neurological Diseases and Neurotrauma and Bioengineering Approaches. *Antioxidants*, 11(1), Article 1.

Rocha, N. P., & Teixeira, A. L. (2017). Neurotrophic Factors in Aging. En N. A. Pachana (Ed.), *Encyclopedia of Geropsychology* (pp. 1628-1638). Springer.

Santamaría-Del Ángel, A. (2008). Daño oxidativo y enfermedades neurodegenerativas. Radicales y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 361.

Sakamoto, K., Karelina, K., & Obrietan, K. (2010). CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal Of Neurochemistry*, 116 (1), 1-9.

Shang, A., Cao, S.-Y., Xu, X.-Y., Gan, R.-Y., Tang, G.-Y., Corke, H., Mavumengwana, V., & Li, H.-B. (2019). Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, 8(7), 246.

Silva-Islas, C. A., Cháñez-Cárdenas, M. E., Barrera-Oviedo, D., Ortiz-Plata, A.,

Pedraza-Chaverri, J., & Maldonado, P. D. (2019). Diallyl Trisulfide Protects Rat Brain Tissue against the Damage Induced by Ischemia-Reperfusion through the Nrf2 Pathway. *Antioxidants*, 8(9), Article 9.

Silva-Islas, C., Maldonado, P.D. (2018). Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacological Research*, Vol. 134, pág. 92-99.

Singh, P., Barman, B., Thakur, M. (2022). Oxidative stress-mediated memory impairment during aging and its therapeutic intervention by natural bioactive compounds. *Frontiers In Aging Neuroscience*, Vol. 14.

Solís, H. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Arch Neurocién*. Vol. 14, No.3; 176-187.

Suzuki, T., Takahashi, J., & Yamamoto, M. (2023). Molecular Basis of the KEAP1-NRF2 Signaling Pathway. *Molecules And Cells*, 46(3): 133-141.

Troncoso, J., Lamprea, M., Cuestas, D., Múnera, A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. Vol. 15, núm. 1, pp. 207-221.

Vicens, P. Redolat, R., Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*, Vol. 15, n°4, pp. 539-544.

Wojsiat, J., Zoltowska, K. M., Laskowska-Kaszub, K., & Wojda, U. (2018). Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Zhang, Z., Sun, G. Y., & Ding, S. (2021). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Focal Ischemic Stroke. *Neurochemical research*, 46(10), 2638-2650.

Zentella-De Piña, M., Piña, E. (2008). Daño a proteínas. Radicales y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 100-101

