



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO SOBRE LAS  
ALTERACIONES MORFOLÓGICAS QUE SE INDUCEN EN UN  
MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ANA LAURA COLÍN GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

**VOCAL:** Profesor: MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS

**SECRETARIO:** Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

**2º SUPLENTE:** Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

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

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENÉZ**

**SUSTENTANTE:**

**ANA LAURA COLÍN GONZÁLEZ**

## ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. ISQUEMIA CEREBRAL.....	5
3.1.1. FISIOPATOLOGÍA BÁSICA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL...8	
3.1.1.1. EXCITOTOXICIDAD.....	9
3.1.1.2. ESTRÉS OXIDANTE.....	10
3.1.1.2.1. Síntesis de óxido nítrico.....	10
3.1.1.2.2. Producción del anión superóxido...12	
3.1.1.2.3. Producción de peroxinitrito.....	12
3.1.1.3. INFLAMACIÓN.....	13
3.2. BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS.....	15
3.2.1. El ajo.....	16
3.3.2. El extracto de ajo envejecido.....	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5. OBJETIVO.....	21
5.1. Objetivo General.....	21
5.2. Objetivos Particulares.....	21
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6.1. Reactivos.....	22

<b>6.2.</b>	Animales.....	22
<b>6.3.</b>	Diseño experimental.....	23
<b>6.3.1.</b>	Inducción de la isquemia cerebral.....	23
<b>6.3.2.</b>	Déficit neurológico.....	24
<b>6.3.3.</b>	Histología (H&E).....	25
<b>6.3.4.</b>	Técnicas inmunohistoquímicas.....	26
<b>6.4.</b>	Análisis estadístico.....	26
<b>7.</b>	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	27
<b>7.1.</b>	Déficit neurológico.....	27
<b>7.2.</b>	Histología.....	29
<b>7.3.</b>	Inmunohistoquímica.....	31
<b>7.3.1.</b>	8-Hidroxidesoxiguanosina.....	31
<b>7.3.2.</b>	Ciclooxigenasa-2.....	33
<b>8.</b>	CONCLUSIONES.....	37
<b>9.</b>	REFERENCIAS.....	38

## 1. ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
ACM	Arteria cerebral media
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxigenasa
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de calcio
[Glu]	Concentración de glutamato
DAB	Diaminobencidina
DADS	Dialildisulfuro
DAS	Dialilsulfuro
DATS	Dialiltrisulfuro
DHA	Ácido docosahexaenóico
E	Control con EAE
EAE	Extracto de ajo envejecido
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EPOX	Epoxygenasa
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EVC	Enfermedad vascular cerebral
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GST	Glutación-S-transferasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
i.p.	Intra-peritoneal
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
4-HHE	4-Hidroxihexanal
4-HNE	4-Hidroxinonenal

8-OHdG	8-Hidroxideoxiguanisina
IR+E	Animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 de reperfusión y tratamiento con EAE
L-Arg	L-arginina
LOX	Lipoxigenasa
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MCPs	Proteínas quimiotácticas monolíticas
MDA	Malondialdehído
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófagos
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH-O	NADPH oxidasa
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAF	Factor activador de plaquetas
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
SAC	S-alilcisteína
SAMC	S-alilmercaptocisteína
SOD	Superóxido dismutasa
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VOCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
XO	Xantina oxidasa

## 2. RESUMEN

La enfermedad cerebro vascular es la segunda causa de muerte y la primera de invalidez en México. Cada vez es más frecuente el ingreso de pacientes con infarto cerebral isquémico a hospitales. Hasta ahora, no existe un tratamiento eficaz que revierta las alteraciones morfológicas y conductuales que se inducen en las personas que sufren de un infarto cerebral. Por ello, es necesario establecer y desarrollar mejores estrategias de prevención y tratamiento con el objetivo de minimizar las secuelas y reducir la incidencia.

El infarto cerebral es consecuencia de la reducción temporal o permanente del flujo sanguíneo. La lesión no es homogénea en todo el tejido cerebral afectado, posee en el núcleo una zona de necrosis, la cual está rodeada por células estructuralmente intactas pero funcionalmente inactivas que pueden recuperarse con un tratamiento adecuado. La cascada de eventos que se activan y participan en la inducción de la muerte neuronal después de un episodio isquémico son principalmente: la excitotoxicidad, el estrés oxidante, la inflamación, la señalización intracelular y finalmente la muerte neuronal.

El estrés oxidante es un evento temprano que inducen la expresión de múltiples factores que desencadenan la respuesta inflamatoria que también genera un estado oxidante tardío. Por lo que, la administración al paciente de un agente que controle o disminuya esta respuesta, podría contribuir a disminuir el daño cerebral.

En el presente trabajo se evaluó el efecto protector del extracto de ajo envejecido sobre el daño que se produce en un modelo de isquemia cerebral en rata, mostrando que la administración del extracto de ajo envejecido (1.2 mL/Kg/i.p.) al inicio de la reperusión disminuyó las alteraciones conductuales y morfológicas en los animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperusión.

El efecto protector del extracto de ajo envejecido observado, se asoció con sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias ya que disminuyó los niveles de 8-hidroxidesoxiguanosina y los de la ciclooxigenasa-2.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. ISQUEMIA CEREBRAL

La enfermedad vascular cerebral (EVC) engloba un grupo de enfermedades que causan afecciones de la circulación cerebral; a su vez, éstas se dividen en isquémicas o hemorrágicas [1,2]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ECV constituye la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad no traumática en adultos a nivel mundial [3].

El concepto de EVC se refiere a cualquier alteración cerebral secundaria a algún proceso patológico de uno o más vasos sanguíneos que ocasiona la caída del flujo sanguíneo por debajo de un nivel crítico y puede afectar los sentidos, el habla, el procesamiento de las ideas, la memoria, causar parálisis, coma y/o la muerte. Son sinónimos las denominaciones: accidente vascular cerebral y el término latino "Ictus", que al igual que su correspondiente anglosajona "stroke" significa "golpe" y describe perfectamente el carácter brusco y súbito del proceso [4].

Según su presentación clínica, la EVC puede ser "asintomática" o "sintomática". Según su naturaleza, se puede presentar como hemorrágica o como isquémica, en una proporción del 16% para la primera y del 84% para la segunda [5]. La diferencia entre una y otra es la presencia o ausencia de sangre, respectivamente [6].

La EVC puede ocurrir a cualquier edad y por diversas causas que incluyen: enfermedades cardíacas, traumas, infecciones, deformaciones vasculares, desórdenes inmunológicos o toxinas exógenas [7].

En la hemorrágica se produce la ruptura de un vaso sanguíneo. De acuerdo al lugar en el que ocurre se denomina:

- Intraparenquimal. Tallo cerebral o en el cerebelo.

-Subaracnoidea. Sobre la superficie cerebral en el espacio subaracnoideo.

La causa más frecuente de ruptura de un vaso sanguíneo cerebral es la presencia de un aneurisma cerebral (dilatación permanente de una arteria ocasionada por la debilidad de su pared) [5,8].

Por otra parte, la isquémica puede deberse a una reducción de la presión de perfusión o ser secundaria a una obstrucción de vasos de pequeño o gran calibre. Con base a la localización anatómica y al tamaño preciso de la lesión que da lugar, se clasifican en:

- Isquemia cerebral global. Involucra al cerebro completo, ocurre durante un ataque cardíaco o durante una hipotensión sistémica severa.

- Isquemia cerebral focal. Afecta regiones restringidas del cerebro y ocurre en una amplia variedad de cuadros clínicos, pero más comúnmente como el resultado de aterosclerosis vascular cerebral [5,8].

La causa de la obstrucción o la disminución en el flujo sanguíneo al cerebro puede deberse a aterosclerosis, una trombosis cerebral o una embolia cerebral [9].

En la mayoría de los casos, los médicos detectan la enfermedad mediante una exploración de rutina, a partir de la historia clínica y de los síntomas que presenta el sujeto. Ocasionalmente, la obstrucción de la arteria carótida produce un soplo que se puede escuchar colocando un estetoscopio en el cuello encima de la misma; sin embargo, no siempre se escuchan los soplos [10].

Otros métodos de diagnóstico utilizados son la ultrasonografía Doppler, la angiografía por resonancia magnética [4] y la ateriografía y angiografía por sustracción digital. Hasta ahora el Doppler transcraneal es el único

método para detectar el vasoespasma asintomático; sin embargo, el tiempo que transcurre entre la detección del vasoespasma por Doppler transcraneal y las manifestaciones clínicas es muy corto dejando una ventana terapéutica reducida [10].

Desde el punto de vista anatomopatológico, hay dos tipos de infarto cerebral:

-Infarto cerebral pálido. Generado en la zona distal a una oclusión arterial persistente, en la que se observa presencia leucocitaria. Posteriormente los macrófagos ocupan la zona y los productos necróticos se eliminan durante meses.

-Infarto cerebral hemorrágico. Presenta una importante concentración de eritrocitos dentro de la zona infartada. Frecuentemente está asociado a un infarto de tipo embólico [12-14].

Si el cerebro es privado de sangre y oxígeno durante 2 o más horas, las células cerebrales mueren y no pueden ser sustituidas. Así, las partes del cuerpo que son controladas por el área afectada del cerebro presentan disfunciones. Esta pérdida de la función, puede ser temporal o permanente según la severidad del evento isquémico. Los síntomas de una isquemia cerebral dependen del lugar en el que se produzca la disminución del flujo sanguíneo, así como de la intensidad y la extensión de la isquemia [15].

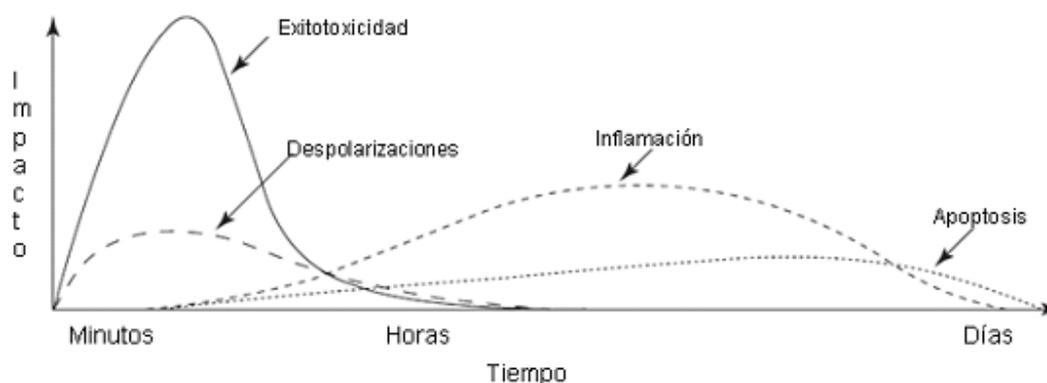
Los principales síntomas que acontecen son:

1. Cefalea intensa y repentina de origen desconocido.
2. Entumecimiento u hormigueo en el brazo, la pierna o el rostro; generalmente de un lado del cuerpo.
3. Debilidad o parálisis del brazo, la pierna o el rostro; generalmente de un lado del cuerpo.

4. Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares.
5. Privación total de la vista o vista nublada en uno o ambos ojos.
6. Zumbidos y/o disminución de la sensibilidad auditiva.
7. Disfagia, dislexia y/o pérdida o trastorno de la capacidad del habla.
8. Mareo, confusión, desmayo o coma [15].

### 3.1.1. FISIOPATOLOGÍA BÁSICA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

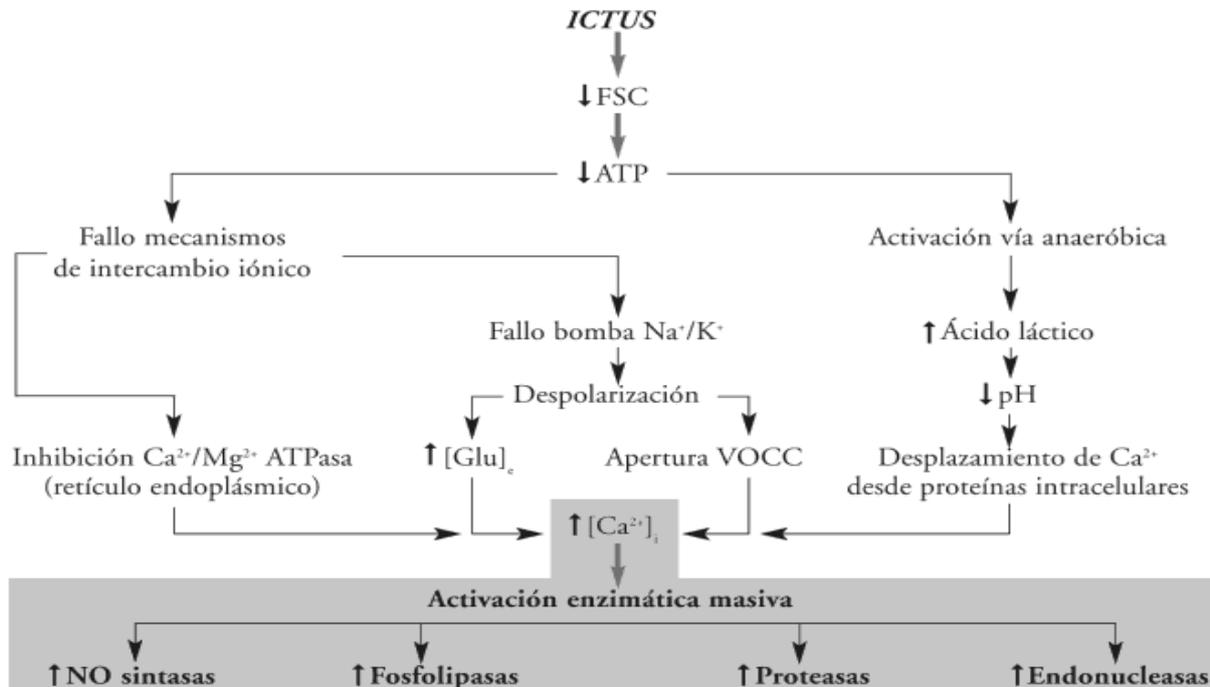
Como ya se mencionó, la isquemia se caracteriza por la reducción o el bloqueo del flujo sanguíneo cerebral [16], esto origina una zona de necrosis rodeada por células estructuralmente intactas y funcionalmente inactivas (zona de penumbra) que se pueden recuperar espontáneamente o que pueden progresar a infarto, a menos que se instaure un tratamiento adecuado [17]. Algunos de los eventos que participan en la inducción de la muerte celular son: la excitotoxicidad, el estrés oxidante, la inflamación, señalización intracelular, entre otros (Figura 1).



**Figura 1. Cascada isquémica.** En el inicio de la isquemia, la exitotoxicidad genera una serie de eventos que contribuyen a la muerte del tejido con despolarizaciones y mecanismos más retardados como la inflamación y la muerte celular programada [18].

### 3.1.1.1 EXCITOTOXICIDAD

Al disminuir el flujo sanguíneo cerebral se pierde el gradiente electroquímico mitocondrial y en consecuencia se bloquea la fosforilación oxidativa. Todas las reacciones dependientes de ATP cesan. El fallo de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ocasiona una despolarización membranal denominada despolarización anóxica [19]. Ésta provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, hecho que desencadena la liberación de neurotransmisores excitatorios (glutamato, aspartato, glicina, GABA y dopamina) [20-22]. En condiciones normales, los transportadores de glutamato acarrear el aminoácido excitatorio al interior de la célula pero la despolarización de la membrana, mencionada anteriormente, produce una reversión de su función que causa el aumento de la concentración de glutamato extracelular hasta niveles tóxicos [23] (Figura 2).



**Figura 2. Exitotoxicidad.** Consecuencias del agotamiento de energía en la fase hiperaguda de la isquemia cerebral. La disfunción de las bombas intercambiadoras de iones, junto con la lactoacidosis originadas por la activación de la vía anaeróbica determinan la sobre-carga intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación masiva de enzimas catabólicas.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  = Concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $[\text{Glu}]_e$  = Concentración de glutamato; FSC = flujo sanguíneo cerebral; VOCC = Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje [24].

Por otro lado, la acidosis láctica y la disfunción del retículo endoplásmico también aumentan la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se menciona a continuación:

- Acidosis láctica. La imposibilidad de metabolizar glucosa por la vía aeróbica normal, activa su degradación por vía anaeróbica; como resultado se genera ácido láctico, lo cual provoca, que el  $\text{Ca}^{2+}$  se desplace de su unión a proteínas intracelulares [25].

- Disfunción del retículo endoplásmico. La despolarización anóxica por acumulación de  $\text{K}^+$  inhibe la bomba  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, lo cual determina el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico hasta el citosol [25].

Con el aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se activan numerosas enzimas catabólicas que contribuyen a la muerte celular.

### **3.1.1.2. ESTRÉS OXIDANTE**

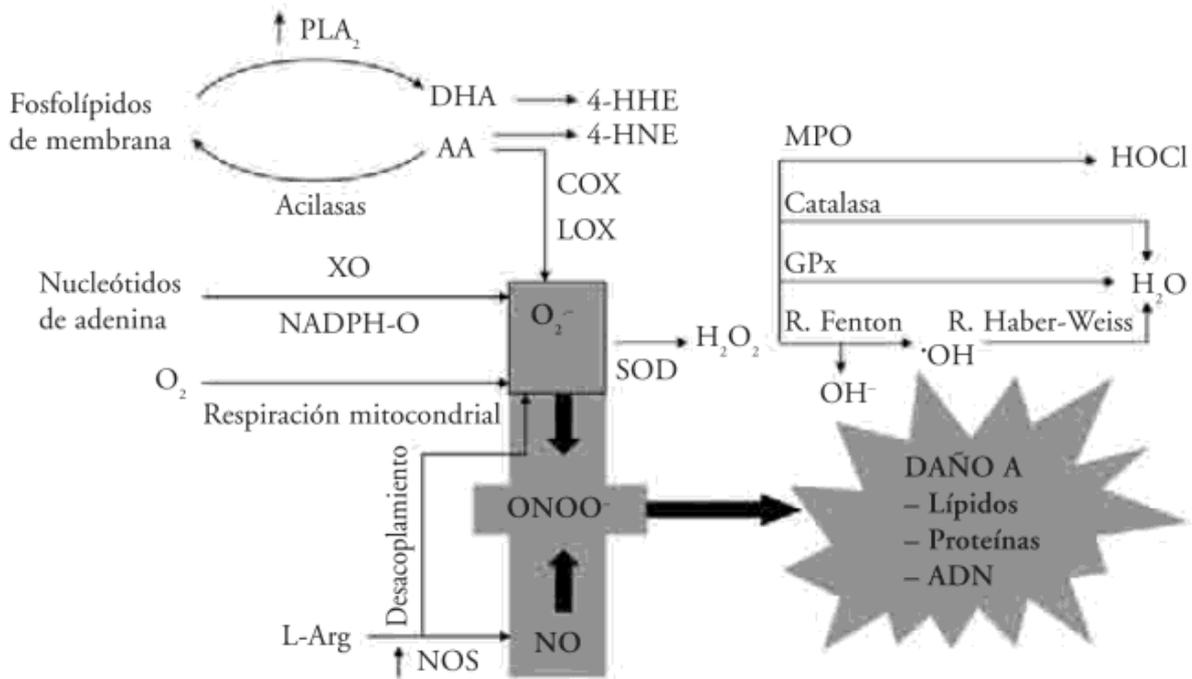
En la isquemia, particularmente durante la reperfusión, se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) que sobrepasan la capacidad de los sistemas antioxidantes endógenos como: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), el glutatión (GSH), entre otros (Figura 3). Lo que provoca alteraciones sobre los lípidos, el ADN y las proteínas que también contribuyen a la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) y a la propagación del edema cerebral [26].

#### **3.1.1.2.1. Síntesis de óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) se sintetiza en muchos tipos celulares a partir L-arginina por una familia de tres isoenzimas denominadas sintasas de NO (NOS):

- Sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS)
- Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)
- Sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) [27].

La participación del NO en la fisiopatología de la isquemia parece tener efectos opuestos: mientras que el NO resultante de la actividad de la eNOS es benéfico por su efecto antiagregante y vasodilatador, el NO producido por la nNOS y la iNOS es nocivo debido que puede formar  $\text{ONOO}^-$ , un agente oxidante que puede inhibir algunas enzimas, lo que intensificará el daño inducido por la excitotoxicidad [27-29].



**Figura 3. Principales vías de formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.** En condiciones fisiológicas, el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), generado por diferentes vías enzimáticas, es convertido por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual sigue las vías de detoxificación que se indican. Durante la isquemia se produce un exceso de  $\text{O}_2^-$  que reacciona con el óxido nítrico (NO) generado tras el aumento de la actividad sintasa de óxido nítrico (NOS), dando lugar al peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el cual es altamente reactivo. La peroxidación no enzimática de los ácidos grasos libres, el ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenóico (DHA), generan los aldehídos 4-hidroxinonenal (4-HNE) y 4-hidroxihexanal (4-HHE), respectivamente. Los que también contribuyen a la degradación de las principales biomoléculas.

L-Arg = L-Arginina; COX = ciclooxigenasa; GPx = glutatión peroxidasa; LOX = Lipoxigenasa; MPO = mieloperoxidasa; NADPH-O = NADPH oxidasa;  $\text{PLA}_2$  = Fosfolipasa  $\text{A}_2$ ; XO = xantina oxidasa [24].

### **3.1.1.2.2. Producción del anión superóxido**

Las fuentes de anión superóxido durante la reperfusión son:

- El desacoplamiento en la síntesis de NO a partir de la L-arginina, en condiciones de escasez de L-arginina y del cofactor de la NOS, la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ).
- El metabolismo de ácido araquidónico por las enzimas ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y epoxigenasa (EPOX) [30, 31].
- La degradación de los nucleótidos de adenina por las enzimas xantina oxidasa y NADPH oxidasa [32, 25].
- La inhibición de la respiración mitocondrial por inhibición de la enzima citocromo oxidasa [33].

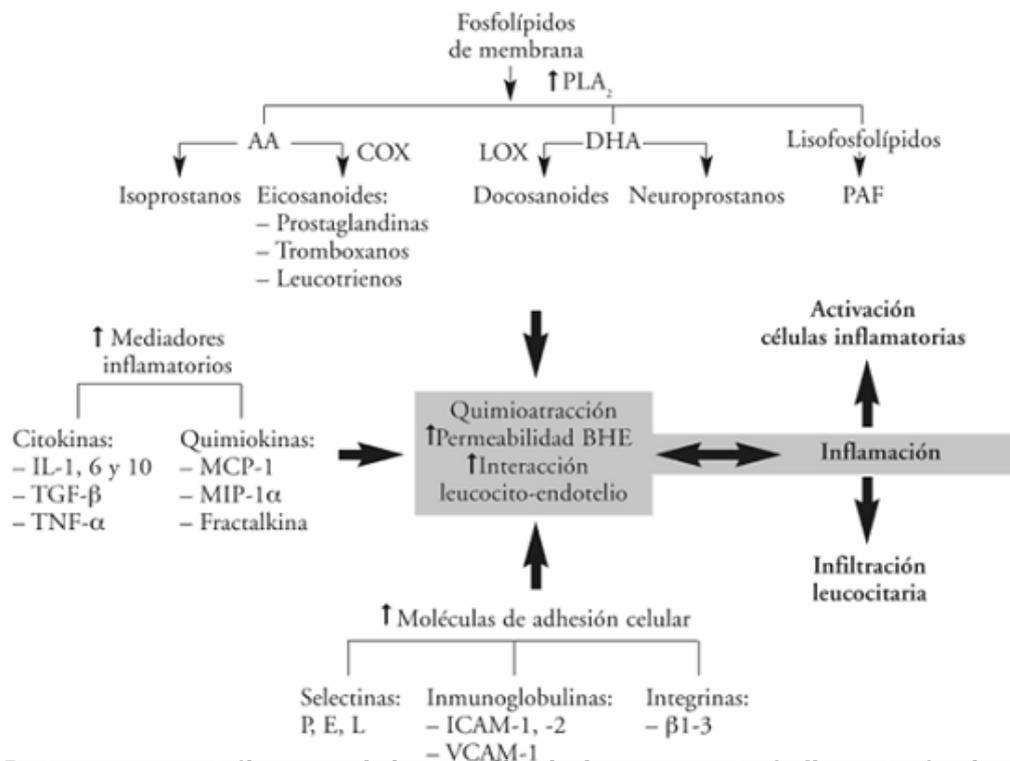
### **3.1.1.2.3. Producción de peroxinitrito**

El peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) se genera mediante la reacción del NO con el anión superóxido. Cuando el NO se produce en grandes cantidades, el anión superóxido reacciona más rápidamente con él, que con su enzima detoxificadora, la superóxido dismutasa, dando lugar a la formación de  $ONOO^-$ . Este agente oxidante es responsable de los efectos dañinos del NO sobre las principales biomoléculas, ya que causa peroxidación lipídica, daño a proteínas por nitración de los residuos de tirosina, oxidación y nitrosilación de grupos sulfhídricos y ruptura del ADN [34].

### 3.1.1.3. INFLAMACIÓN

Ante el daño que genera el proceso isquémico, la inflamación y la respuesta inmune se activan como un mecanismo de defensa. Con el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular también se incrementa el estrés oxidante, esto genera la expresión de numerosos genes proinflamatorios [35-37]. En la figura 4 se muestran algunas rutas que contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria durante la isquemia cerebral.

Las primeras células inflamatorias que responden al daño isquémico son las de la microglía, que normalmente se encuentran en el cerebro sano en estado ramificado. Sin embargo, en condiciones patológicas, se activan y

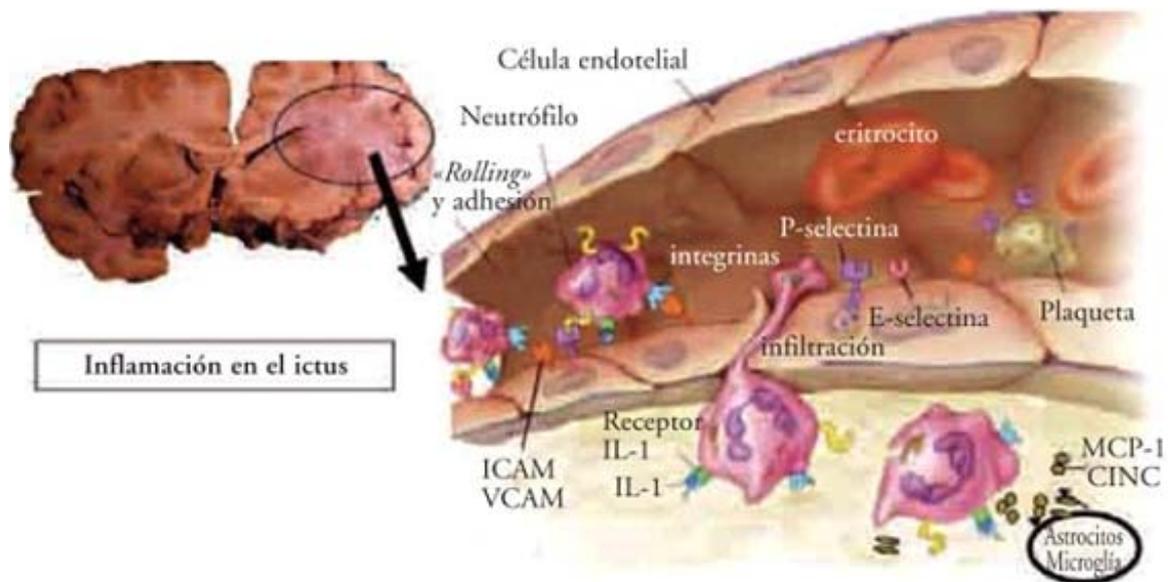


**Figura 4. Rutas que contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria durante la isquemia.** La acción conjunta de productos de degradación de la membrana (parte superior), la producción de otros mediadores inflamatorios como las citocinas y las quimiocinas (parte izquierda), y la expresión de moléculas de adhesión celular (parte inferior), contribuyen al deterioro de la barrera hematoencefálica y a la infiltración de leucocitos en el tejido cerebral. AA = ácido arquidónico, COX =ciclooxigenasa, DHA = ácido docosahexaenoico, ICAM = molécula de adhesión intracelular, IL = interleucina, LOX = lipoxigenasa, MCP-1 =proteína quimioatrayente de monocitos-1, MIP-1α = proteína inflamatoria de macrófagos; PLA = fosfolipasa A, TGF-β = factor de crecimiento transformante-β, TNF-α = factor de necrosis tumoral-α, VCAM = molécula de adhesión celular vascular [24].

se convierten en células fagocíticas con características idénticas a las de un macrófago [38]. Una vez activadas estas células, liberan una gran variedad de sustancias neurotóxicas: radicales libres, especies reactivas de oxígeno, aminoácidos excitotóxicos y enzimas proteolíticas activas.

También se sintetizan y liberan al plasma citocinas como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), interleucinas como la IL-1- $\alpha$ , la IL-2, la IL-6, la IL-10, histamina, trombina, PAF (factor de activador de plaquetas), MCPs (proteínas quimiotácticas monolíticas), MIP-1 (proteína inflamatoria 1 de macrófagos), etc.

Es importante señalar que no todos estos factores contribuyen a la muerte neuronal; algunos de ellos, como la IL-6, IL-10 y TGF- $\alpha$  (Factor de crecimiento transformante) contribuyen a la supervivencia celular [39-41].



**Figura 5. Respuesta inflamatoria.** La oclusión de un vaso cerebral desencadena la activación de la respuesta inflamatoria en los capilares del tejido isquémico. Las selectinas promueven los procesos de "rolling" y adhesión de neutrófilos al endotelio del microvaso. Se induce la expresión de IL-1 por el endotelio y esto provoca la expresión de ICAM-1 en la superficie de células endoteliales. Las integrinas de la superficie de los neutrófilos se unen a las moléculas ICAM-1 y VCAM del endotelio mediante una unión firme que permitirá su infiltración. Los astrocitos, macrófagos y microglia residente llevan a cabo la destrucción del tejido mediante la expresión y liberación de moléculas inductoras de la inflamación [24].

Por otra parte, los astrocitos también se activan durante la isquemia (astrocitos reactivos) y expresan la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) exhibiendo el fenómeno denominado gliosis reactiva [42].

Dicho fenómeno se caracteriza por cambios funcionales y estructurales entre los que destacan un incremento en la expresión de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y neuropéptidos que contribuyen aún más al daño [42].

Además de los eventos ya señalados, ocurre la infiltración de los leucocitos en el interior de la parénquemia cerebral, que inicia gracias a una secuencia de eventos que empiezan con el *rolling* de los leucocitos en las células endoteliales activadas de los vasos sanguíneos, siguiendo con los procesos de adherencia y trasmigración al interior del tejido cerebral. La infiltración de células sanguíneas obstruye los microvasos y conduce a la formación de edema, necrosis celular e infarto tisular [43] (Figura 5)

### **3.2. BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS**

La incidencia de la enfermedad provoca un enorme costo social y económico en términos de mortalidad, morbilidad y minusvalía; por tal motivo, parece obligada la búsqueda de tratamientos que actúen ya sea en la fase aguda, con fármacos neuroprotectores; o en la fase crónica, con fármacos neuroreparadores. En modelos experimentales han sido evaluados diferentes compuestos [44,17] que han demostrado un efecto protector, lamentablemente cuando éstos son evaluados en humanos, no se obtiene el mismo resultado. Por ello, la búsqueda de estrategias que disminuyan las alteraciones inducidas en el síndrome de la isquemia está justificada.

### **3.2.1. El ajo**

Los beneficios potenciales del ajo (*Allium sativum*) han sido reconocidos desde la antigüedad. Se ha utilizado como antimicrobiano, antimicótico, anticancerígeno, antihipertensivo, inmunosupresor, hipoglicémico, antioxidante, entre otras propiedades [45].

Estudios fitoquímicos demostraron que los dientes de ajo intactos contienen una alta cantidad de  $\gamma$ -glutamilcisteínas que son hidrolizadas y oxidadas para formar la alina, compuesto mayoritario en los dientes de ajo. Al momento de cortarlo o triturarlo, la alinasa, una enzima vacuolar, transforma la alina en alicina, compuesto inestable que se descompone rápidamente en dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS), dialiltrisulfuro (DATS), vinilditiínas y ajoene [46]. También contiene compuestos no sulfurados como: enzimas, proteínas, aminoácidos, lípidos, esteroides, glucósidos esteroidales, vitaminas y trazas de elementos y minerales (tiene un alto contenido de selenio) [45]. Desafortunadamente, el ajo intacto no puede ser utilizado como propuesta medicinal debido a la limitada estabilidad de sus compuestos y a su fuerte olor. Por tal motivo existen diferentes preparaciones de ajo como: el extracto de ajo envejecido (EAE), el extracto acuoso de ajo, el aceite de ajo, el polvo de ajo, el jugo de ajo fresco entre otros; cada una con diferente composición de compuestos sulfurados y esto depende de los proceso de obtención.

### **3.3.2. El extracto de ajo envejecido (EAE)**

El extracto de ajo envejecido se elabora a partir del ajo crudo (*Allium sativum*) rebanado, puesto en etanol acuoso al 15-20% por más de 20 meses a temperatura ambiente. El extracto es filtrado y concentrado a presión reducida a baja temperatura. Sus componentes más abundantes

son: la alina, la  $\gamma$ -glutamyl-S-alilcisteína, la  $\gamma$ -glutamyl-L-cisteína, S-alilcisteína (SAC) y la S-alilmercaptocisteína (SAMC) (Tabla 1); aunque, también contiene compuestos insolubles [45]. Durante el proceso de envejecimiento, los compuestos que dan olor al ajo se transforman en compuestos más estables y menos tóxicos.

Tabla 1. Composición química del Extracto de ajo envejecido (EAE)	
Compuestos	mg/g de producto $\pm$ DE
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	0.32 $\pm$ 0.13
Cicloalina	0.34 $\pm$ 0.08
$\gamma$ -glutamyl-S-alilcisteína	0.25 $\pm$ 0.12
$\gamma$ -glutamyl-S-1-propenilcisteína	0.09 $\pm$ 0.07
S-alilcisteína (SAC)	0.62 $\pm$ 0.07
S-1-propenilcisteína (SPC)	0.37 $\pm$ 0.04
S-alilmercaptocisteína (SAMC)	0.14 $\pm$ 0.03
Cistína	0.01 $\pm$ 0.01
Ácido glutámico	1.2 $\pm$ 0.2
Arginina	2.2 $\pm$ 1.1

Los datos se muestra como media  $\pm$  D.E de 6 lotes [46].

Varios estudios han encontrado que el extracto de ajo envejecido posee propiedades antioxidantes *in vitro* [Revisado en 47]. Adicionalmente, diversos estudios han reportado el efecto protector del extracto de ajo envejecido en diferentes modelos experimentales asociados con el estrés oxidante, como los que se mencionan a continuación:

### Hígado

Wang *et al.* [48] encontraron que el extracto de ajo envejecido (2 a 10 mL/kg) previene el daño hepático inducido por el bromobenceno, debido a que incrementa los niveles de glutatión. Nakagawa *et al.* [49] reportaron que la administración previa de extracto de ajo envejecido (100 mg/kg), protege

el hígado de ratones contra el daño inducido por el acetaminofen y el tetracloruro de carbono. El efecto protector lo asociaron con el incremento en los niveles de glutatión y con la disminución en los niveles de lípidos oxidados.

### **Corazón**

Kojima *et al.* [50] reportaron que la administración de extracto de ajo envejecido (0.05 ml, i.p. seis veces a la semana/40 días) fue capaz de reducir la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina en ratones, ya que previene el daño oxidante y las alteraciones funcionales del corazón.

### **Riñón**

El extracto de ajo envejecido atenuó el daño renal medido como niveles de creatinina y nitrógeno de urea en sangre, así como las alteraciones histológicas en las células de túbulo proximal, inducidas por la gentamicina en ratas. El efecto protector se asoció con la disminución del estrés oxidante medido como niveles de proteínas oxidadas y con la preservación de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa dependiente de manganeso y glutatión peroxidasa [51].

### **Cerebro**

Numagami *et al.* [52] reportaron que la administración del extracto de ajo envejecido (0.08–0.5 mL/kg/i.p.) 30 minutos antes de inducir la isquemia global en ratas, redujo significativamente el daño cerebral, el edema y el área de infarto; además observaron una mejoría sobre la conducta motora y el deterioro de la memoria. Aguilera *et al.* [53] establecieron la ventana terapéutica del extracto de ajo envejecido en animales sometidos a 2 h de isquemia y 24 h de reperfusión, administrándolo al inicio de la reperfusión. Encontraron que a tiempos

mayores de 2 h no se observa efecto protector. Evaluaron la respuesta inflamatoria y la conducta. Sin embargo, no se encontró ningún cambio.

### **Propiedades anti-inflamatorias del ajo**

Las propiedades anti-inflamatorias del ajo han sido poco estudiadas, de hecho hasta el momento no existen reportes que muestren la actividad anti-inflamatoria del extracto de ajo envejecido como se ha observado con otras presentaciones polares de ajo.

Sendl *et al.* [54] reportaron que un extracto de ajo en cloroformo/acetona tiene una concentración inhibitoria 50 de 0.42 µg/mL para la ciclooxigenasa (COX).

También Sengupta *et al.* [55] publicaron una significativa reducción al evaluar la influencia de un extracto de ajo acuoso sobre la expresión de la ciclooxigenasa-2, en un modelo de carcinogénesis de colon inducida con azoximetano en ratas.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a que el estrés oxidante es un evento importante que participa en la fisiopatología de la isquemia cerebral, y a que existe evidencia de que el tratamiento terapia con antioxidantes disminuye el daño celular, es posible que la administración del extracto de ajo envejecido, una presentación disponible de ajo con propiedades antioxidantes, muestre un efecto neuroprotector sobre las alteraciones morfológicas inducidas en un modelo de isquemia cerebral en rata.

## **5. OBJETIVO**

### **5.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la administración del extracto de ajo envejecido sobre el daño morfológico, las alteraciones conductuales, el estrés oxidante y la respuesta inflamatoria que se inducen en un modelo de isquemia cerebral en rata.

### **5.2. Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto del tratamiento con extracto de ajo envejecido sobre el daño neuronal y las alteraciones conductuales que se inducen en animales sometidos a isquemia cerebral.
  
- Evaluar el efecto del tratamiento con extracto de ajo envejecido sobre el estrés oxidante que se induce en animales sometidos a isquemia cerebral, utilizando 8-hidroxideoxiguanosina como marcador.
  
- Evaluar el efecto del tratamiento con extracto de ajo envejecido sobre los niveles de la ciclooxygenasa-2 en animales sometidos a isquemia cerebral.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Reactivos

El extracto de ajo envejecido (EAE) en su presentación comercial de Kyolic® Liquid fue adquirido Wakunaga of America, Co., Ltd (Misión Viejo, CA).

La albúmina sérica bovina, el Tritón X-100, la parafina, la hematoxilina, el citrato de sodio, las sales para el PBS y la eosina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

El xilol, el alcohol etílico, el peróxido de hidrógeno 30% y el carbonato de litio se adquirieron de J. T. Baker.

La diaminobencidina y el Kit para realizar la inmunohistoquímica (Universal L SAB-System HRP) pertenecen a DAKO.

Los anticuerpos policlonales anti-8-hidroxideoxiguanosina (Núm. Catálogo SA-237) y anti-Ciclooxigenasa-2 (Núm. Catálogo AB5830) se obtuvieron de Biomol internacional, Inc y Chemicon Internacional, Inc, respectivamente.

### 6.2. Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 270-310 g de peso, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento (dieta comercial **rat chow *ad limitum***) durante el estudio.

Todos los procedimientos experimentales, estuvieron apegados a los lineamientos del Comité de Ética del Instituto. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

### **6.3. Diseño experimental**

Los animales fueron divididos al azar en 4 grupos (n = 4):

I. Control (CT).

II. Control con extracto de ajo envejecido (E).

III. Sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión (IR)

IV. Sometidos a 1 h de isquemia, 24 h de reperfusión y tratamiento con extracto de ajo envejecido (IR+E)

Los animales tratados con extracto de ajo envejecido recibieron una dosis de 1.2 mL/Kg de peso, intra-peritoneal. mientras que los controles recibieron solución salina en la mismas dosis. Los grupos IR e IR+E se sometieron a isquemia cerebral focal durante 1 h, se les administró solución salina o extracto de ajo envejecido al inicio de la reperfusión y se sacrificaron 24 h después. Se evaluó la conducta antes de la reperfusión y antes del sacrificio. Las ratas macho se perfundieron vía transcardíaca, se removió el cerebro y se fijó en 4-p-formaldehído. Las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron (5 micras) y se montaron en portaobjetos. Los cortes se tiñeron con la técnica hematoxilina-eosina, para cuantificar el daño morfológico; y además se aplicaron dos técnicas de inmunohistoquímica: 1) para determinar la cantidad de la enzima ciclooxigenasa-2 que permite monitorear la respuesta inflamatoria y 2) para medir los niveles de 8-hidroxidesoxiguanosina como marcador de daño oxidante.

#### **6.3.1. Inducción de la isquemia cerebral**

Los animales anestesiados en una cámara de halotano, se sometieron al procedimiento quirúrgico para inducir el daño cerebral isquémico, a través de

la oclusión temporal, por una hora, de la arteria cerebral media, siguiendo la técnica propuesta por Longa *et al.* [56]. La localización final del filamento en la operación de los animales se muestra en la figura 6.

### 6.3.2. Déficit neurológico

El déficit neurológico se evaluó con la determinación de los cambios en la actividad motora de las ratas con cinco pruebas [57-59]:

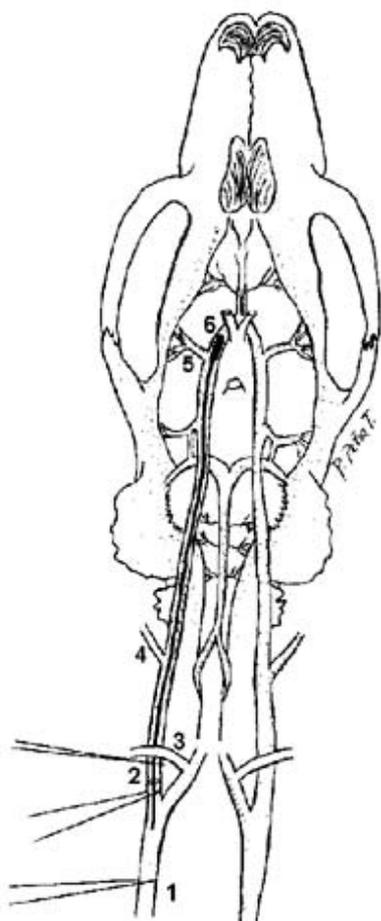
1) Movilidad espontánea: el roedor se colocó en una superficie plana (1 m<sup>2</sup>).

Los animales normales inician el movimiento en un tiempo menor a 10 seg.

2) Reflejo de agarrar: el animal se sostuvo por la cola y se le aproximó un cable. Los animales normales se agarran simultáneamente con ambas patas, los animales con daño no pueden agarrarse.

3) Barra horizontal: Con las ratas que fueron capaces de agarrarse del cable en la prueba anterior se determinó el tiempo que se mantuvieron colgadas; los animales normales soportan por lo menos 3 seg.

4) Prueba de colgar por la cola: el animal se sujetó por la base de la cola y se levantó 30 cm. Los animales normales extienden las patas delanteras hacia el frente, los animales dañados flexionan la pata contralateral a la lesión.



**Figura 6.** Esquema en el que se puede observar la posición final del filamento de nylon. 1) Arteria carótida común, 2) arteria carótida interna, 3) arteria occipital, 4) arteria pterigopalatina, 5) arteria cerebral media 6) arteria cerebral anterior.

5) Giros contralaterales: las ratas se sostuvieron por la cola y se les permitió moverse libremente apoyando las patas delanteras, mientras se observó la dirección del movimiento durante 30 seg. Los animales dañados realizan al menos 5 giros en sentido contra lateral a la lesión.

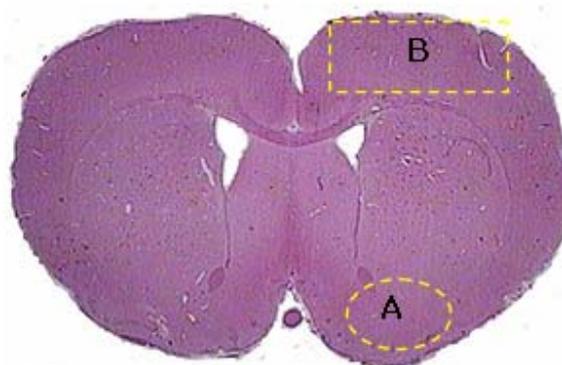
A cada prueba realizada se le asignó un valor de 0 si el comportamiento fue normal y un valor de 1 si la conducta estuvo alterada. El daño asociado al área de infarto está caracterizado por un valor igual o superior a 2.

### 6.3.3. Histología (H&E)

Los cerebros se deshidrataron en una serie de soluciones de alcohol, seguido de xilol y se embebieron en parafina (inclusión). Se obtuvieron cortes coronales de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. Después se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E). La cuantificación se realizó en el estriado izquierdo (Figura 7, sección A), se detectó el número de neuronas preservadas y dañadas en 5 campos seleccionados al azar obtenidos de 3 cortes/rata. Los datos se expresan como el porcentaje de neuronas dañadas por campo.

**Figura 7. Corte coronal cerebral.** Indica la zona en la que se realizó la cuantificación:

- A. Histológica.
- B. Inmunohistoquímica (Cox-2 y 8-OHdG)



#### **6.3.4. Inmunohistoquímica**

Los animales se perfundieron vía transcardíaca con solución salina fría, seguida de formaldehído al 10%. El cerebro se removió, se fijó en p-formaldehído al 4% por 5 días, se incluyó en parafina y se obtuvieron cortes coronales de 5  $\mu$ m. Los cortes se desparafinaron y rehidrataron, se realizó la recuperación antigénica con una solución de citrato de sodio al 3% y Tritón al 0.2%. Después se inhibió la actividad de las peroxidasas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%, se bloquearon los tejidos con una solución de albúmina al 2% y se incubaron con el anticuerpo primario anti-ciclooxigenasa-2 (COX-2) o anti-8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) diluídos a 1:200 durante toda la noche. Posteriormente se utilizó el kit universal (anticuerpo secundario, peroxidasa). Finalmente los cortes se revelaron con diaminobencidina (DAB) y se contrastaron con hematoxilina de Gill.

La cuantificación de ambas técnicas de inmunohistoquímica se realizó en la corteza izquierda (Figura 7, sección B). Los resultados se expresan como el % de células inmunoreactivas.

#### **6.4. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar analizados mediante ANOVA, seguido de una prueba de Tukey, empleando el programa Graph Pad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA). Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1. Déficit neurológico

La isquemia cerebral focal es ocasionada por una irrigación deficiente de sangre a una parte del cerebro. En consecuencia, se produce pérdida neuronal e infarto, que dependen del lugar en el que se produce la disminución del flujo sanguíneo, así como de la intensidad y el tiempo de la isquemia. Los síntomas van desde visión borrosa, mareo, convulsiones y pérdida de la conciencia. Entre el déficit motor se incluyen: temblores, falta de coordinación y parálisis parcial. También ocasiona disfunciones corticales como: amnesia, demencia y delirio; así como, disturbios en el lenguaje. Los sobrevivientes de un infarto cerebral pueden ser severamente deshabilitados mental y físicamente [60].

La oclusión de la arteria cerebral media (ACM) es el modelo más usado en animales para inducir isquemia cerebral, debido a que es la forma de infarto cerebral más común (60%) en humanos [61]. La arteria cerebral media irriga: la porción de la corteza motora y sensitiva correspondiente a la extremidad superior, cara, lengua y parte de la extremidad inferior; el área de Broca, involucrada en la producción del habla, el proceso de lenguaje y la comprensión; la corteza prefrontal, encargada de la cognición; la corteza auditiva primaria; y la corteza de asociación principal. Al dividirse da origen a otras ramas que irrigan: al cuerpo estriado, al brazo posterior de la cápsula interna, al cuerpo del núcleo caudado, a la porción medial del Tálamo, entre otros sitios [62].

Las pruebas conductuales evaluaron el déficit neurológico causado por la oclusión de la arteria cerebral media. Se aplicaron en los animales para determinar si estos podían ser incluidos o excluidos del experimento, también para determinar si el tratamiento reducía algunas de las alteraciones



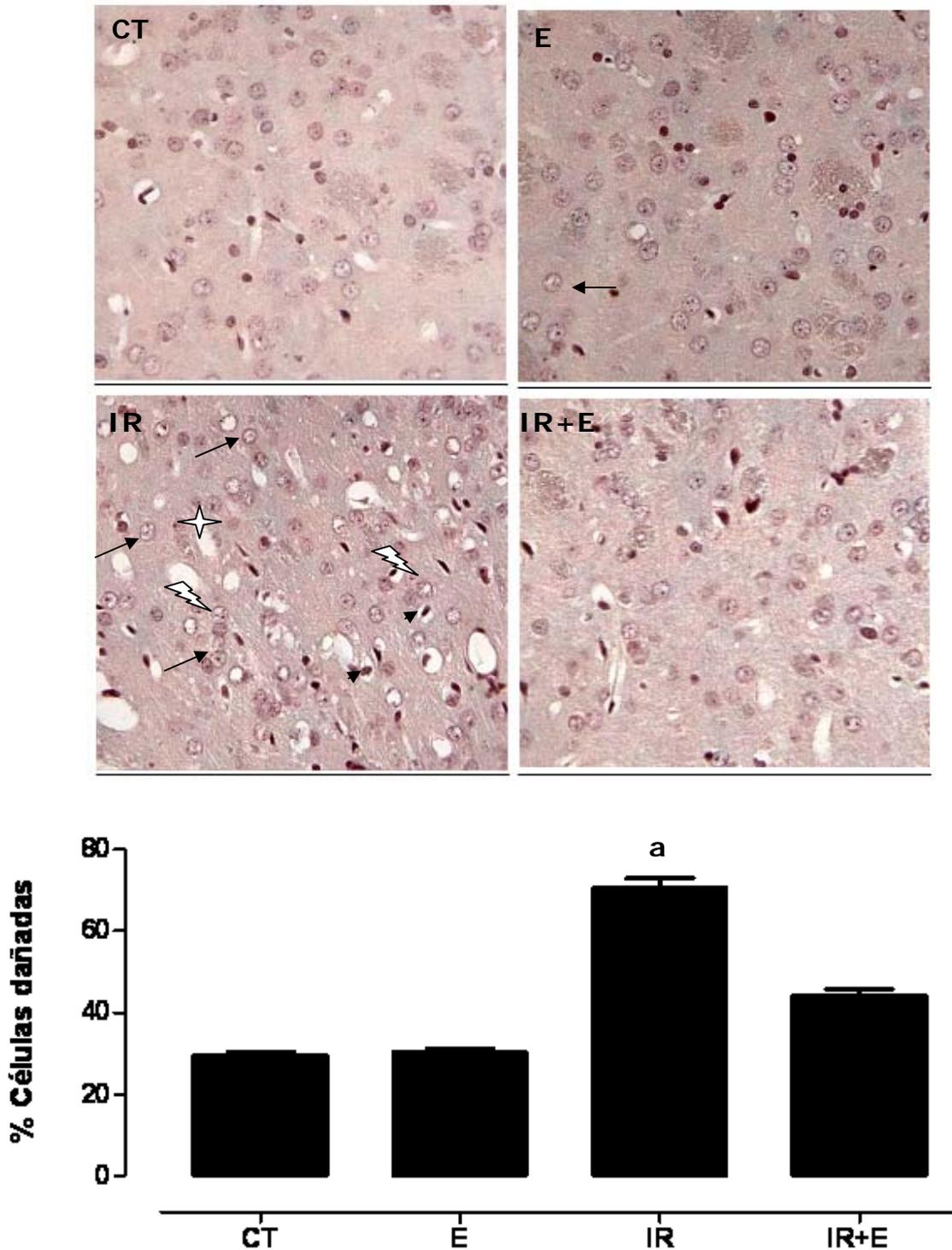
## 7.2. Histología

En la isquemia focal, las células del núcleo isquémico mueren en pocos minutos y se forma un área necrótica evidente. Las neuronas de la zona periférica o de la penumbra isquémica, en cambio, muestran alteraciones de carácter funcional ya que conservan una mínima actividad metabólica. Esto hace que preserven su integridad estructural durante más tiempo y sigan un patrón de muerte por apoptosis [17]. Las características básicas de la apoptosis son la condensación de la cromatina, la fragmentación internucleosomal del DNA, la pérdida del volumen celular, el mantenimiento de la integridad de la membrana celular hasta fases tardías y la activación de las caspasas. El hecho de que este tipo de muerte neuronal sea más lenta permite que la ventana terapéutica sea más amplia, permitiendo que las células de la penumbra sean susceptibles a ser rescatadas [65].

El proceso de excitotoxicidad parece desencadenar la muerte neuronal en el centro de la lesión. Las células de esta zona presentan una muerte celular pocos minutos después de iniciarse la isquemia. Mecanismo de muerte neuronal denominado necrosis [66].

El conteo de las células neuronales en los cortes cerebrales teñidos con hematoxilina-eosina se realizó en la zona de penumbra del cuerpo estriado izquierdo y reveló que en el cerebro isquémico la mayoría de las células se observan con picnosis nucleosomática, kariorexis y edema intersticial en el neuropilo, lo cual establece un daño significativo en el estriado (70% de células dañadas) (Figura 9, grupo IR).

El tratamiento con extracto de ajo envejecido en los animales sometidos a isquemia y reperfusion disminuyó significativamente el daño morfológico a un 40%, la tinción muestra pocas neuronas alteradas y un ligero edema intersticial (Figura 9, grupo IR+E). Los animales control (CT) y los que recibieron extracto de ajo envejecido solo (E) presentaron neuronas alteradas (30 %) (Figura 9, grupos CT y E).



**Figura 9. Efecto del EAE sobre las alteraciones morfológicas inducidas por 1 h de ischemia y 24 h de reperfusión.** Panel superior: Fotografía representativa por microscopia de luz de cada grupo tratado. CT, las células presentan un aspecto normal; E, pocas células pueden verse alteradas (flecha); IR, la mayoría de las células muestran picnosis nucleosomática (punta de flecha), kariorexis (⚡), edema intersticial en el neuropilo (☆); IR+E, pocas neuronas están lesionadas. Gráfica: los valores se representan como la media  $\pm$  D.E. (n=4) <sup>a</sup>P<0.001 vs CT, E e IR.

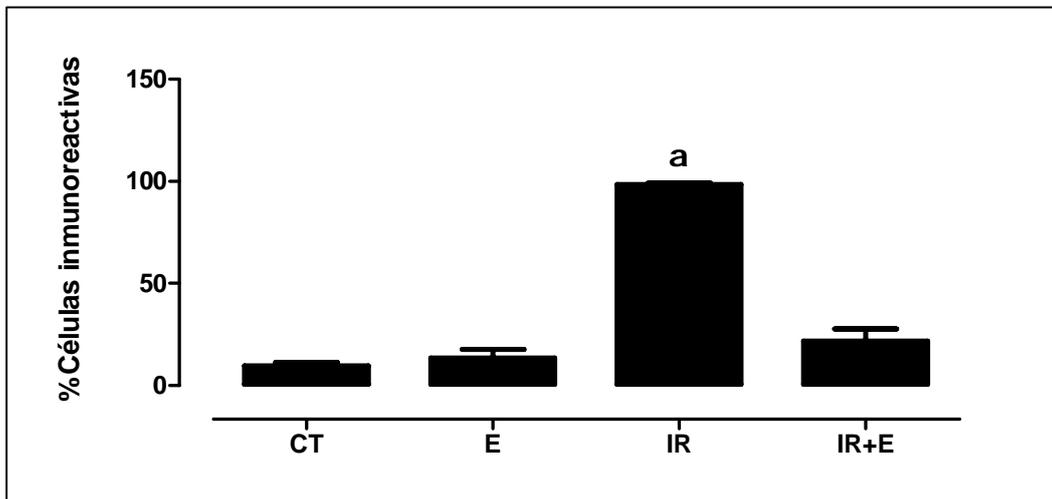
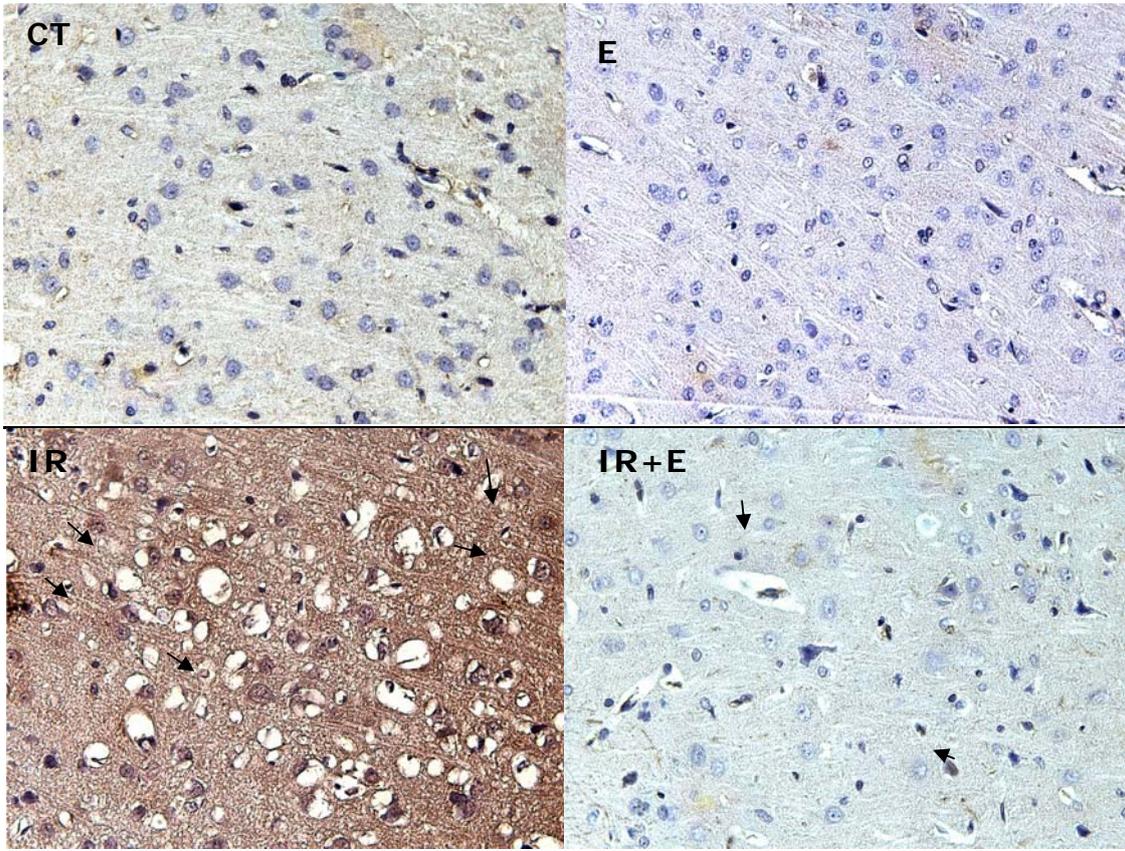
El efecto del extracto de ajo envejecido sobre el daño neuronal puede asociarse con la prevención del estrés oxidante y la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, inducidas por la oclusión de la arteria cerebral media, como observaron Aguilera *et al.* [44] en animales sometidos a 2 h de isquemia y 24 h de reperfusión. Sin embargo, ellos encontraron que el extracto de ajo envejecido solo posee efecto protector 2 h después del inicio de la reperfusión; mientras que en el presente trabajo se observó a las 24 h.

### 7.3. Técnicas inmunohistoquímicas

#### 7.3.1. 8-Hidroxideoxiguanosina (8-OHdG)

La muerte neuronal en la isquemia cerebral es el resultado de la activación de una serie compleja de eventos. Por ello, muchos esfuerzos se han realizado para tratar de inhibir algunos de ellos y lograr la protección del tejido. Entre ellos, se han propuesto muchas moléculas neuroprotectoras, tales como: antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), atrapadores de radicales libres, agonistas del receptor GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) e inhibidores de caspasas, entre otros. Sin embargo, todavía no se ha logrado encontrar una terapia que sea efectiva [18,67].

En este contexto, el extracto de ajo envejecido es una presentación comercial de ajo que se ha estudiado por presentar efectos antioxidantes: atrapa especies reactivas de oxígeno [68]; disminuye la formación de  $H_2O_2$  en células endoteliales, cuando éstas son expuestas a un sistema generador de  $O_2^-$ ; inhibe la producción de  $H_2O_2$  en células endoteliales normales y aumenta los niveles de la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa [69,70].



**Figura 10. Efecto del EAE sobre el nivel de la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) en animales sometidos a 1 h de ischemia y 24 h de reperfusión.** Panel superior: fotografía representativa de cada grupo con algunas células positivas para la 8-OHdG (flecha). Gráfica: cuantificación del número de células positivas por campo. Los valores se representan como la media  $\pm$  D.E. (n=4) <sup>a</sup>P<0.001 vs CT, E e IR+E

Se evaluó el efecto del extracto de ajo envejecido sobre el estrés oxidante, utilizando como marcador a la 8-OHdG, la cual se forma de la reacción entre la guanosina y el radical hidroxilo. La formación del radical hidroxilo se da a partir del  $O_2^-$  y del  $H_2O_2$  en presencia de hierro.

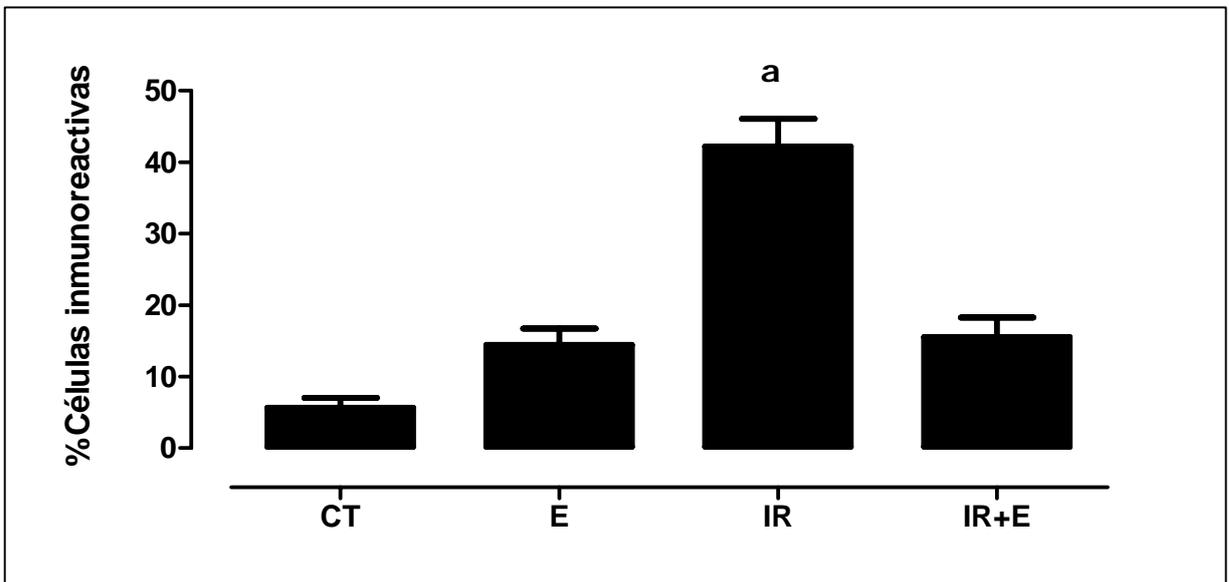
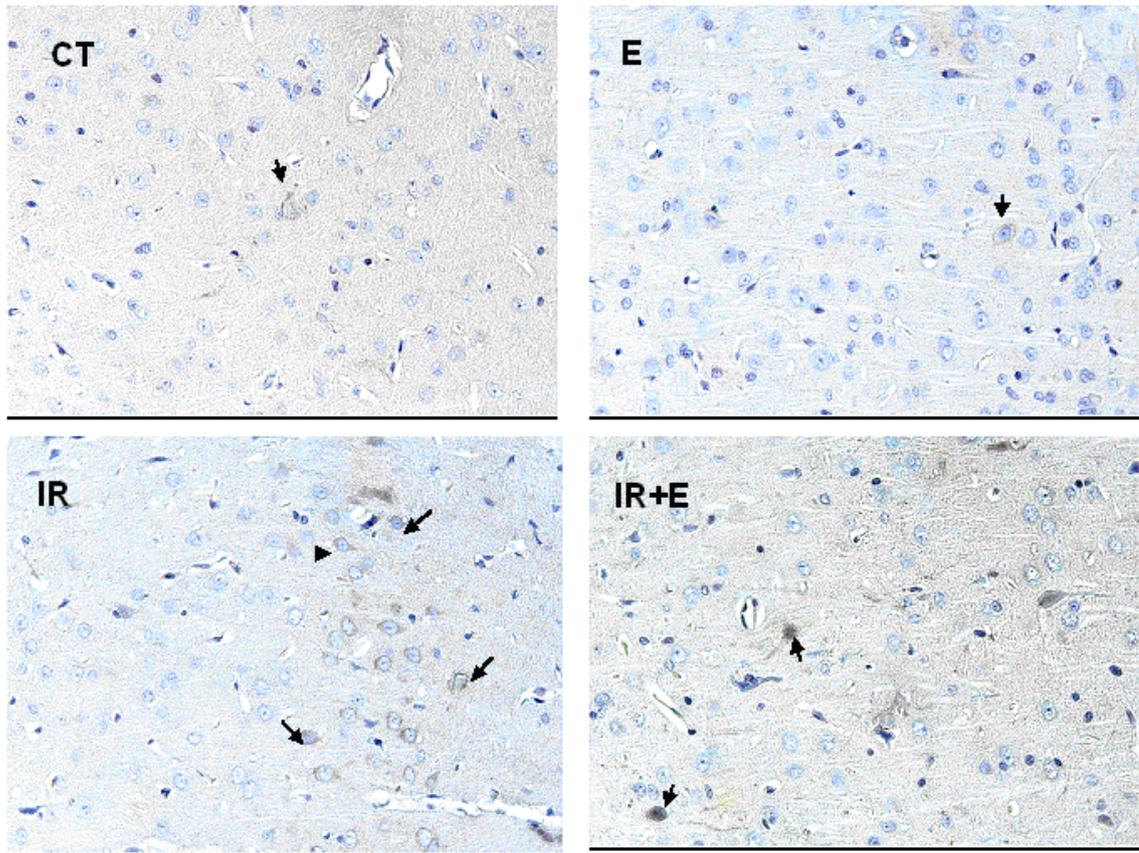
El ensayo mostró que las ratas sujetas a isquemia cerebral (IR) muestran mayores niveles de la 8-OHdG; mientras el tratamiento con extracto de ajo envejecido en las ratas isquémicas revierte el daño. Los animales tratados sólo con el extracto de ajo envejecido, mostraron un ligero incremento en los niveles de 8-OHdG (Figura 10).

El efecto del extracto de ajo envejecido sobre los niveles de la 8-OHdG podría atribuirse capacidad de atrapar ERO [68] ó a su actividad quelante, ya que en ausencia de hierro, la formación del radical hidroxilo no se llevaría a cabo ó se disminuiría.

El efecto antioxidante del extracto de ajo envejecido se debe a su alto contenido de compuestos sulfurados, los cuales se generan durante el proceso de envejecimiento. Entre estos se encuentra la S-alilcisteína (SAC), un antioxidante capaz de atrapar diferentes especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno *in vitro* [71]. El contenido de SAC en el extracto de ajo envejecido es alto (0.62 mg/ml de extracto) [72] siendo suficiente para reducir el daño inducido por la isquemia y la reperfusión en gerbos y ratas [64,52]. También se puede deber a su capacidad de prevenir la disminución de la actividad de la superóxido dismutasa total, la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa extracelular [44].

### 7.3.2. CICLOOXIGENASA-2

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima de velocidad limitada que metaboliza la conversión de ácido araquidónico en prostanglandinas y tromboxanos. Existen dos isoenzimas: la Ciclooxigenasa-1, expresada



**Figura 11. Efecto del EAE sobre el nivel de la Ciclooxygenasa-2 (Cox-2) en animales sometidos a 1 h de ischemia y 24 h de reperfusión.** Panel superior: fotografía representativa de cada grupo con algunas células positivas para la COX-2 (flecha). Gráfica: cuantificación del número de células positivas por campo. Los valores se representan como la media  $\pm$  D.E. (n=4) <sup>a</sup>P<0.001 vs CT, E e IR+E

constitutivamente en muchos tejidos incluidas las plaquetas, la mucosa gastrointestinal y el riñón. La forma inducible, Ciclooxygena-2, se encuentra primariamente en los leucocitos y el cerebro; inducida por citocinas e inhibida por glucocorticoides y es un importante mediador del daño celular provocado por la inflamación [73].

La isquemia cerebral genera una respuesta inflamatoria que no sólo participa en el papel central de la patogénesis de la isquemia cerebral; sino que también induce daño secundario, así como activación de la microglia o la infiltración de células inflamatorias periféricas, de ahí que, el tratamiento con anti-inflamatorios pueda reducir el daño cerebral isquémico y ayudar a la recuperación del tejido dañado [74].

El extracto de ajo envejecido es un agente que posee propiedades como: antimicrobiano, antimicótico, anticancerígeno, antihipertensivo, inmunosupresor, hipoglicémico, antioxidante, entre otras. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que demuestren su actividad anti-inflamatoria.

En el presente estudio se evaluó el efecto del extracto de ajo envejecido en animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión. Los grupos CT y E mostraron diferencias significativas al compararlos con el grupo IR. Se observó una mayor cantidad de la proteína de la Ciclooxygena-2 en el grupo que se sometió a la cirugía (IR), lo cual fue consistente con estudios previos [74,75] (Figura 11).

El incremento en la cantidad de proteína de la Ciclooxygena-2 se ha observado tanto en roedores como en humanos, en neuronas, vasos sanguíneos y células inflamatorias y se ha propuesto que ese incremento contribuye al daño neuronal inducido por la excitotoxicidad y la patogénesis del óxido nítrico que ocurren durante la isquemia cerebral [75,76].

En el grupo IR+E, la administración del extracto de ajo envejecido contrarresta casi completamente la inducción de la Ciclooxygena-2 inducida por la isquemia cerebral (Figura 11). Como ya se mencionó en nuestro

conocimiento no existen reportes relacionados con las propiedades anti-inflamatorias del extracto de ajo envejecido, Solo se sabe que el compuesto mayoritario del extracto de ajo envejecido, la S-alilcisteína, inhibe a la sintasa inducible de oxido nítrico y la subsecuente producción de oxido nítrico [77,78]. Por tal motivo, estos resultados podrían indicar que la producción de oxido nítrico derivado de la sintasa inducible de oxido nítrico podría estar contribuyendo a la activación de la ciclooxigenasa-2 en el cerebro isquémico [79,80]. Por tanto, la inhibición de la sintasa inducible de oxido nítrico por la S-alilcisteína podría ser el mecanismo neuroprotector mediante el cual el extracto de ajo envejecido provoca la disminución de los niveles de la ciclooxigenasa-2.

Otra posibilidad es que la activación de la ciclooxigenasa-2 se deba al estado oxidante que se genera tras el proceso de isquemia-reperfusión, y en tal caso, el efecto que el extracto de ajo envejecido ejerce sobre los niveles de la ciclooxigenasa-2 podría estar asociados con sus propiedades antioxidantes ya que previene el estrés oxidante, medido como el daño al ADN, que se induce en el modelo de isquemia cerebral.

## 8. CONCLUSIONES

1. El extracto de ajo envejecido, administrado al inicio de la reperfusión, disminuyó las alteraciones conductuales y morfológicas que se inducen en los animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión.
2. El efecto protector del extracto de ajo envejecido podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, ya que disminuyó el daño oxidante al ADN y previno el incremento en los niveles de la ciclooxygenasa-2 (fuente importante de anión superóxido) inducidos en un modelo de isquemia cerebral.

## 9. REFERENCIAS

- [1] Merck & Co., Inc. Enfermedad cerebro vascular. El manual Merck (edición en CD ROM). 10ª Ed. Harcourt. 1999, Cap 174.
- [2] Aguado JM, Agustí A, Aguilar JL. Accidentes vasculares cerebrales. Farreras-Rozman. Medicina Interna (Edición en CD ROM) 13ª Ed. Mosby-Doyma.1996.pp. 1431-1433.
- [3] WHO. Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva: World Health Organization, 2005.
- [4] Acuerdo para el uso del término ICTUS: Díez-Tejedor E (ed.). Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología. Barcelona: Prous Science, 2006.
- [5] Díez-Tejedor E, Soler R. Concepto y clasificación de las enfermedades vasculares cerebrales. Castillo J, Álvarez Sabín J, Martí-Vilalta JL, Martínez Vila E, Matías-Guiu J (ed.) Manual de enfermedades vasculares cerebrales, 2ª ed. Barcelona: Prous Science, 1999; 43-54.
- [6] National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of Cerebrovascular Diseases III. Stroke 1990; 21: 637-676.
- [7] Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. Stroke.1997; 28: 1507-1517.
- [8] Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez Sabín J. Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos. Díez Tejedor E. (ed.). Guía para el diagnóstico y el tratamiento del ictus. Barcelona: Prous Science,2006; 1-23.
- [9] Ramiro HM, Santiago ADI. Enfermedad Vascolar Cerebral. El internista. México DF: McGraw – Hill Interamericana, 1999; 733-756.

- [10] Fauci A; Braunwald E; Isselbacher K. Enfermedades cerebrovasculares. Harrison Principios de medicina Interna. Catorceava edición. Mc Graw Hill Interamericana; México DF. 1998; Vol II: 2644-2680.
- [11] Warach S, Gaa J, Siewert B, Wielopolski P, Edelman RR. Acute human stroke studied by whole brain echo planar diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1995; 37: 231-241.
- [12] Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 1988; 19: 1083-1092.
- [13] Arboix A, Álvarez-Sabín J, Soler L. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. *Neurología* 1998; 13: 3-10.
- [14] Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet* 1991; 337:1521-1526.
- [15] Duran MA. Informe ISEDIC. Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas; Segunda edición 2004.
- [16] García JH. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 1984; 1: 5-14.
- [17] Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12: 723-25.
- [18] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-97.
- [19] Siesjö BK. Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 1990; 30: 3-9.
- [20] Benveniste H, Drejer J, Shousboe A, Dimer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 1369-374.

- [21]** Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of ischemic on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gama-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1988a; 51: 1455-1464.
- [22]** Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Intra-ischemic extracellular relase of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. *Neurosci Lett* 1988b; 91: 36-40.
- [23]** Ogawa S, Kitao Y, Hori O. Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 573-587.
- [24]** Montaner J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Marge medical book. Barcelona España 2007.
- [25]** Folbergrová J, Minamisawa H, Ekholm A, Siesjö BK. Phosphorilase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Neurochem* 1990; 55: 1690-696.
- [26]** Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431- 1568.
- [27]** Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA, Martínez A. The rol of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 26-50.
- [28]** Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 429-43.
- [29]** Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1291-1304.
- [30]** Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxigenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 2006; 52: 201-43.

- [31]** Planas AM, Soriano MA, Rodriguez-Farré E, Ferrer I. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in rat brain. *Neurosci Lett* 1995; 200: 187-90.
- [32]** Kinura Y, Kimura M, Itokawa Y, Ishikawa M, KiKuchi H. Changes in xanthine oxidase in ischemic brain. *J Neurosurg* 1989; 71: 417-20.
- [33]** Murphy AN, Fiskum G, Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 231-245.
- [34]** Beckman JS. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 69-75.
- [35]** Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutic. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819-834.
- [36]** Chamorro A, Hallenbeck J. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke* 2006; 37: 291-93.
- [37]** Samson Y, Lapergue B, Hosseini H. Inflammation and ischemic stroke: current status and future perspectives. *Rev Neurol* 2005; 161: 1177-1182.
- [38]** Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ. The microglia reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 966-973.
- [39]** Wang Q, Tang XN, Yenari NA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 53-68.
- [40]** Planas AM, Gorina R, Chamorro A. Signal pathways mediating inflammatory responses in brain ischemic. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1267-1270.

- [41] Wood PL. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol Res* 1995; 17: 242-248.
- [42] Wang W, Redecker C, Yu ZY, Xie MJ, Tian DS, Zhang L, Bu BT, Witte OW. Rat focal cerebral ischemia induced astrocyte proliferation and delayed neuronal death are attenuated by cyclin-dependent kinase inhibition. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 278-285.
- [43] Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ, Barone FC. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull* 1993; 31 : 565-572.
- [44] Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Maldonado PD. Recent advances in the use of antioxidant treatments in cerebral ischemia. In: *New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective*. Research Signpost 2007: 61-74.
- [45] Lawson LD. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. ACS Symposium Series 691. American Chemical Society. Lawson Bauerl [eds]. Washington, DC, USA 1998; 176-209.
- [46] Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 2001; 1131: 955S-962S.
- [47] Maldonado PD, Limón D, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J. Medicinal properties of garlic: Importance of its antioxidant activity. Nova Science Publishers, Inc, 2009 in press.
- [48] Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 1999; 132: 215-225.
- [49] Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H. Prevention of liver damage by aged garlic extract and its components in mice. *Phytother Res* 1988; 1:

- 1-4.
- [50]** Kojima R, Toyama Y, Ohnishi ST. Protective effects of an aged garlic extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutr Cancer* 1994; 22: 163-173.
- [51]** Maldonado PD, Barrera D, Medina–Campos ON, Hernandez–Pando R, Ibarra–Rubio ME, Pedraza–Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 2003; 73: 2543-2556.
- [52]** Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* 1996; 29: 135-143.
- [53]** Aguilera P, Chanez-Cardenas ME, Ortiz-Plata A, León-Aparicio D, Barrera D, Espiniza-Rojo M, Villena-Hernandez J, Sanchez- García A, Maldonado PD. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine* 2009, in press.
- [54]** Sendel A, Elbl G, Steinke B, Redl K, Breu W, Wagner H. Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med* 1992 ; 58: 1-7.
- [55]** Sengupta A, Ghosh S, Das S. Modulatory influence of garlic and tomato on cyclooxygenase-2 activity, cell proliferation and apoptosis during azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Lett* 2004; 208: 127-136.
- [56]** Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
- [57]** Menzies SA, Hoff JT, Betz AL.. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 1992; 31: 100-106.

- [58]** Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 2000; 104: 99-109.
- [59]** Van der Staay FJ, Augstein KH, Horvath E. Sensorimotor impairments in Wistar Kyoto rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the middle cerebral artery: recovery of function. *Brain Res* 1996; 715: 180-188.
- [60]** García RG, Amaya LE. Atención de la isquemia cerebral aguda. *Enfermedad vascular cerebral. Temas de medicina interna. Mac Graw Hill Interamericana; México DF 1996 Vol. IV: 149-163.*
- [61]** American Heart Association. Heart and stroke statistical update. Dallas, TX: American Heart Association Press, 1998.
- [62]** Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina Dorland. 1996. McGraw-Hill - Interamericana de España. Vol. 1.
- [63]** Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda MN, Khan MB, Ishrat T, Islam F. Selenium plays a modulatory role against cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Brain Res* 2007; 1147: 218–225.
- [64]** Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U, Saint II TI. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 357: 562–571.
- [65]** Planas AM, Gorina R, Chamorro A. Signal pathways mediating inflammatory responses in brain ischemia. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1267-1270.
- [66]** Mehta SL, Manhas N, Raghbir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics *Brain Rev* 2007; 54: 34-66.
- [67]** Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 1-27.

- [68] Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 1996; 10: 340-441.
- [69] Geng Z, Lau BH. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 1997; 11: 54-56.
- [70] Wei Z, Lau BH. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cell. *Nutr Res* 1998; 18: 61-70.
- [71] Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patino N, Pedraza-Chaverri. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *J Food Chem Toxicol* 2007; 45: 2030-2039.
- [72] Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD, Haibach FG. Identification and quantification of organosulfur compliance marker in garlic extract. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 37-41.
- [73] Choi S, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends in Pharmacol Sci* 2009; 30: 174-181.
- [74] Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997; 17: 2746-2755.
- [75] Ohtsuki T, Kitagawa K, Yamagata K, Mandai K, Mabuchi T, Matsushita K, Yanagihara T, Matsumoto M. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA in gerbil hippocampal neurons after transient forebrain ischemia. *Brian Res* 1996; 736: 353-356.
- [76] Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, Alvarez D, Al-Dalain S, Martínez G, León OS, Springer JE. Assessment of the relative

- contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem* 2003; 86: 545–555.
- [77]** Numagami Y, Ohnishi ST. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* 2001; 131: 1100S-1105S.
- [78]** Kim JM, Lee JC, Chang N, Chun HS, Kim WK. S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Radic Res* 2006; 40: 827-835.
- [79]** Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. *Mutat Res* 2001; 480–481: 243–268.
- [80]** Endoh M, Maiese K, Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* 1994; 651: 92–100.