



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

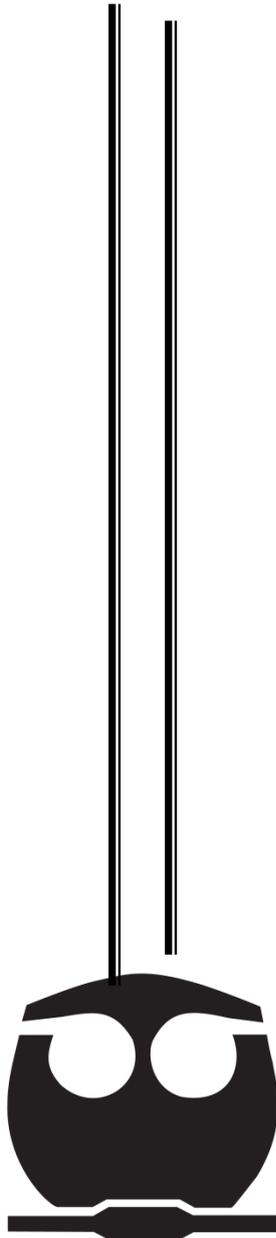
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA S-ALIL CISTEÍNA (SAC)
SOBRE LAS ALTERACIONES
NEUROLÓGICAS QUE SE INDUCEN EN
UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL.
POSIBLE PAPEL DEL FACTOR Nrf2.**

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

PRESENTA

CARLA SUSANA GARCÍA BAUTISTA



MÉXICO, D.F.

2011



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: Dra. Perla Carolina Castañeda López
VOCAL	Profesor: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO	Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
1er. SUPLENTE	Profesor: Dr. José Ignacio Páramo Ramírez
2° SUPLENTE	Profesor: Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Este trabajo fue apoyado por **CONACYT** No. 103527

ASESOR DEL TEMA

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SUSTENTANTE

Carla Susana García Bautista

Dedicado a mi madre, quien no está presente en el mundo pero está y estará
por siempre en mi corazón...

Tu hija Carla

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme llenado de fuerza para continuar cada día de mi vida y no dejarme caer nunca.

A mi mamá, porque ella me enseñó desde pequeña lo que es responsabilidad, honestidad y a ser fuerte, porque desde el cielo guió cada uno de mis pasos y cuidado de mí, porque sin sus enseñanzas nada hubiera sido posible, porque me enseñó valores y principios que me hicieron crecer como ser humano y persona, porque esto es para ella. Para ti mamá que siempre lo quisiste. Espero que te sientas muy orgullosa de mí. Te amo.

A mi hermana, que tuvo que asumir el papel de mamá y me apoyo en todo lo que pudo ahora me toca a mí regresártelo de alguna forma. Gracias

A mi papá: que en la medida de sus posibilidades me apoyo hasta donde le fue posible.

A mis sobrinos Aurora e Iván, que han venido a llenar nuestra vida de felicidad y nuevas fuerzas para seguir. Los amo.

A mis padrinos, por haberme ayudado para que la culminación de este proyecto fuera posible, nunca tendré como pagarles y estaré eternamente agradecida.

A Perla, por haberme tenido paciencia y dedicado su tiempo en la revisión de este trabajo.

A mi segunda familia, mis amigos: Tania, Adrián, Nayeli, Pepe, Juan, Chucho, Omar; por haberme enseñado el valor de la amistad, a reír, a llorar, por cuidarme siempre y por estar siempre que los necesite. Por enseñarme a disfrutar la vida, por llenar cada momento triste de alegría y cada momento de felicidad hacerlo inolvidable.

A Tania, mil gracias por estar conmigo siempre y nunca dejarme. Fuiste y sigues siendo un gran apoyo.

A nayeli, gracias por estar ahí siempre, aunque a tu manera.

A Adri, por preocuparte tanto por mí en esos momentos en que más lo necesité, siempre serás muy importante para mí.

A pepe, por compartir momentos inolvidables y abrazos cada vez que los necesite

A mis compañeros del laboratorio, Carlos (por su internet), Iván, Ramón, Martín, Emmanuel, Miriam, Felipe, Isabel que hicieron agradable mi estancia en este laboratorio.

A Ana y Ricardo, que me enseñaron a trabajar en ese laboratorio y que luego se convirtieron en amigos.

A Pepo y Frida, que en los últimos días hicieron de mi estancia algo muy divertido y se convirtieron en dos grandes amigos.

A la UNAM, por haberme dado la oportunidad de estar entre sus aulas, de pertenecer a esa gran casa de estudios y de ser orgullosamente alumna de la Facultad de Química.

A mis profesores, por haberme formado no solo dentro de las aulas sino fuera de ellas.

Se agradece al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la sección 024 de la AAPAUNAM por la **cátedra "Angelina Quintero"** otorgada a la alumna durante el semestre 2011-1.

Se agradece a la **Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad** por la **beca Probei** (Programa de Becas de Inicio a la Investigación) otorgada a la alumna durante el desarrollo de este trabajo.

Abreviaturas

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAT	Catalasa
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GST	Glutación-S-transferasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
NMDA	N-metil-D-aspartato
SON	Sintasa de óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Radical anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
•ON	Oxido nítrico
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
SAC	S-alil cisteína

INDICE

	Páginas
RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	3
1. Isquemia	3
1.1 Síntomas	6
1.2 Fisiopatología	7
2. Excitotoxicidad	8
3. Estrés oxidante y nitrante	10
3.1 ERO y ERN	11
3.1.1 Principales ERO y ERN	13
3.1.2 Principales fuentes de especies reactivas	15
4. Sistemas de defensa antioxidante	15
4.1 Antioxidantes enzimáticos	16
4.2 Antioxidantes no enzimáticos	17
5. Extracto de ajo envejecido	18
5.1 S-alil cisteína (SAC)	19
6. Factor de transcripción Nrf2 (factor relacionado al factor nuclear erotroide-2)	22
II. JUSTIFICACIÓN	26
III. HIPÓTESIS	28

IV. OBJETIVOS	28
1. Objetivo general	28
2. Objetivos particulares	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Animales	29
2. Reactivos	29
3. Diseño experimental	29
4. Metodología	31
4.1. Síntesis de SAC	31
4.2. Inducción de la isquemia cerebral.	32
4.3. Déficit neurológico.	33
4.4. Histología (H&E).	33
4.5. Área de infarto.	34
4.6. Determinación del ARNm del factor de transcripción Nrf2	34
5. Análisis estadístico	35
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
1. Identificación de la SAC obtenida por síntesis química	37
2. Déficit neurológico	38
3. Histología	39
4. Área de infarto	42
5. Determinación del ARNm del factor de transcripción Nrf2	44
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. PERSPECTIVAS	46
IX. REFERENCIAS	47



RESUMEN

Introducción: La enfermedad vascular cerebral constituye la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad en adultos mayores a nivel mundial. La isquemia cerebral es el tipo más común y se debe a una interrupción del flujo sanguíneo al cerebro, desencadenando una serie de eventos (excitotoxicidad, estrés oxidante) que llevan a la muerte neuronal. Aún no existe un tratamiento efectivo para los pacientes que han sufrido un infarto cerebral; por ello, es importante la búsqueda de fármacos que mejoren su calidad de vida. En este contexto se han evaluado varios antioxidantes, entre ellos la S-alil cisteína (SAC) que es el compuesto mayoritario del extracto de ajo envejecido y que ha mostrado un efecto protector asociado a su actividad de antioxidante directo (mecanismo ya evaluado). Recientemente, se reportó que la administración repetida de la SAC es capaz de inducir el factor de transcripción Nrf2 y la subsiguiente activación de enzimas de fase II en hígado. Sin embargo, este mecanismo aún no se ha estudiado en el modelo de isquemia cerebral. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la SAC sobre las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas en un modelo de isquemia cerebral y evaluar el posible papel del factor Nrf2.

Material y métodos: Ratas macho wistar (280-320 g) divididas en 5 grupos: a) Control (CT), tratadas con SSI; b) Sham; sometidas a cirugía sin oclusión; c) SAC, tratadas con SAC; d) IR, sometidas a 1 h de isquemia y 24 h de reperusión; y e) IR+SAC. La dosis de solución salina o SAC fue 100 mg/kg/*ip* cada 24 h durante 5 días previos a la oclusión.

El déficit neurológico se midió justo antes del sacrificio (24 h después del inicio de la reperusión) y se obtuvo el cerebro para medir el área de infarto y realizar el análisis morfológico. En otro



grupo de muestras se determinó el nivel de ARNm del factor de transcripción Nrf2, 3 h después del inicio de la reperfusión.

Resultados: El tratamiento con SAC (100 mg/Kg) previno significativamente la aparición del área de infarto, así como las alteraciones conductuales e histológicas que se inducen con 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión.

Los animales del grupo IR mostraron un incremento en el nivel del ARNm del factor Nrf2. Sin embargo, el tratamiento con SAC sola no incremento el mensajero del Nrf2 a las 3 h de reperfusión.

Conclusión: La SAC previno las alteraciones morfológicas, el área de infarto y el déficit neurológico inducido por la isquemia/reperfusión.



I. ANTECEDENTES

1. Isquemia

La enfermedad vascular cerebral, o ictus, es una alteración neurológica que se presenta en forma brusca, sin aviso alguno y con síntomas que pueden durar 24 h o más. Después de las cardiopatías y el cáncer, los accidentes cerebrovasculares constituyen la tercera causa de muerte y del 70% de los casos que no son mortales representan la primera causa de discapacidad en adultos mayores de 65 años [Candelario-Jalil, 2008; Rang & Dale, 2009]. En México es la primera causa de incapacidad en adultos y la quinta causa de muerte [INEGI, 2010].

Un evento vascular cerebral puede ocurrir por [Díez-Tejedor *et al.*, 2001]: 1) rompimiento de un aneurisma, lo que genera un derrame cerebral (tipo hemorrágico) ó 2) obstrucción de una arteria, lo que provoca la interrupción o pérdida repentina del flujo sanguíneo cerebral debido a la formación de un coágulo (tipo isquémico) (Figura 1).

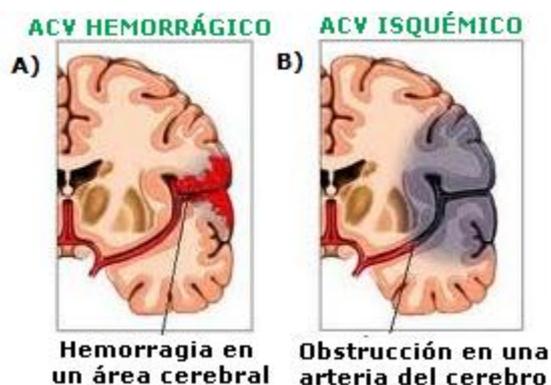


Figura 1. Representación del accidente cerebrovascular (ACV). A) Tipo hemorrágico, presencia de sangre provocada por la ruptura de un aneurisma. B) Tipo isquémico causado por la oclusión de un vaso, que interrumpe el flujo sanguíneo cerebral.



El accidente cerebro vascular isquémico tiene una prevalencia del 85%, con respecto al 15% del tipo hemorrágico [Rang & Dale, 2009].

La obstrucción del flujo sanguíneo cerebral puede suceder de dos maneras [Torregosa *et al.*, 2007]:

- a) Formación de un trombo: Ocurre cuando una arteria cerebral se ve obstruida por un coágulo que se forma dentro de la misma. La aterosclerosis, es la principal causa debido a la acumulación de colesterol y sus ésteres provocando el estrechamiento de los vasos sanguíneos y facilitando la formación de los coágulos.
- b) Formación de un émbolo: Tiene lugar cuando una porción de coágulo (émbolo), formado en una parte alejada del cerebro, se desprende y es arrastrado por el flujo sanguíneo hasta el cerebro, donde al llegar a un vaso de menor calibre lo tapa, cortando el abastecimiento de sangre.

El accidente cerebrovascular puede cursar de dos formas:

- Global: afecta a todo el cerebro, generalmente es secundaria a un paro cardíaco o a la oclusión de arterias cerebrales intra o extra craneales. En este tipo de isquemia el daño es difuso y se afectan las neuronas que están en las regiones más susceptibles al daño como las de la capa CA1 del hipocampo, el estriado, las capas 3, 5 y 6 de la corteza cerebral y el cerebelo. La pérdida temporal pero completa del flujo sanguíneo que acompaña a un paro cardíaco no debe durar más de 10 min de lo contrario el paciente quedaría en estado vegetativo [Alcaraz-Zubeldia & Ríos, 2004].



- Focal: afecta sólo a una parte del cerebro, debido a que el flujo sanguíneo solo es interrumpido en un área definida. En la zona central donde el flujo sanguíneo es mínimo, las reservas de energía se agotan y las células de esa región mueren (área necrótica). Sin embargo, en la zona que rodea al área necrótica, el metabolismo celular se detiene pero la célula se mantiene viable por el flujo sanguíneo colateral, esta zona se conoce como área de penumbra (Figura 2) [Suresh *et al.*, 2007]. Las células de esta zona son las que pueden ser rescatadas con un algún tratamiento para que no progresen a apoptosis o necrosis [Back, 1998; Pulsinelli, 1992].

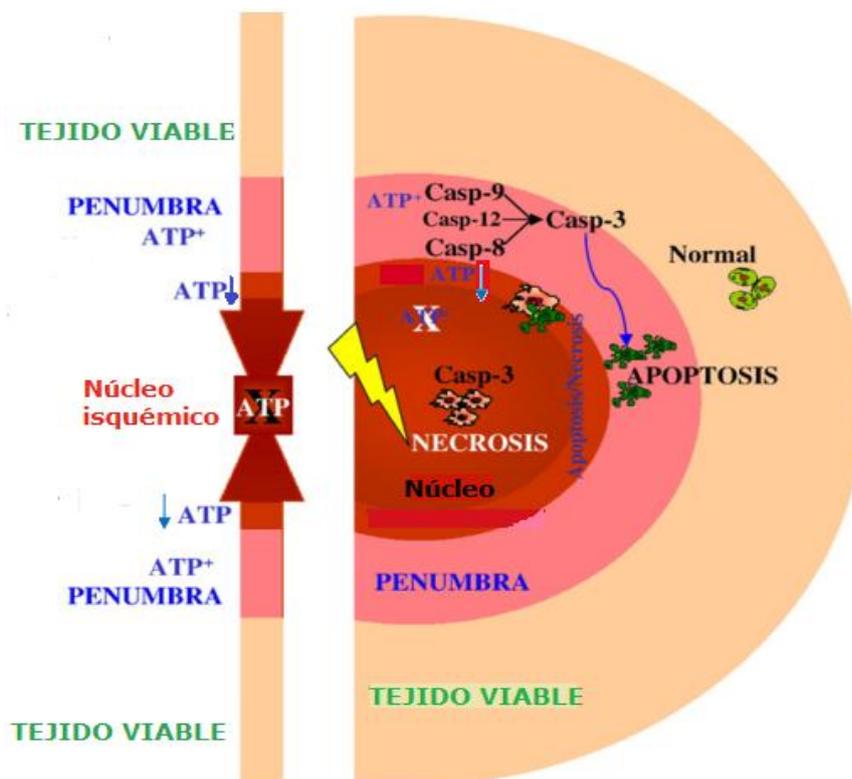


Figura 2. Representación del daño cerebral durante la isquemia. Núcleo isquémico, región donde las células sufren necrosis. La región que rodea el núcleo isquémico es llamada penumbra isquémica y es el sitio donde se retrasa la muerte celular por apoptosis de acuerdo a la disponibilidad de ATP. El tejido que rodea a la zona de penumbra es tejido viable [Suresh *et al.*, 2007].



1.1 Síntomas

En algunos casos, es posible que una persona ni siquiera se dé cuenta de que ha tenido un accidente cerebrovascular. Los síntomas dependerán del área cerebral que se dañe y del tiempo que dure el accidente cerebrovascular. Los síntomas se pueden presentar de manera súbita y sin aviso, o pueden ocurrir a intervalos durante el primero y/o segundo día. Por lo general, son más graves apenas sucede el accidente cerebrovascular, pero pueden empeorar lentamente [Latchaw *et al.*, 2009], entre los principales síntomas se encuentran:

- Cambio en la lucidez mental (incluyendo coma, somnolencia y pérdida del conocimiento).
- Cambios en la audición.
- Cambios en el sentido del gusto.
- Torpeza.
- Confusión o pérdida de memoria.
- Dificultad para deglutir.
- Mareos o sensación anormal de movimiento (vértigo).
- Falta de control de esfínteres.
- Pérdida del equilibrio.
- Debilidad muscular en la cara, el brazo o la pierna (por lo regular sólo en un lado).
- Entumecimiento u hormigueo en un lado del cuerpo.
- Problemas con la vista, incluyendo disminución de la visión, visión doble o ceguera total.
- Problemas para hablar o entender lo que otros hablan.
- Problemas para caminar.

Se puede presentar dolor de cabeza, especialmente si el accidente cerebrovascular es causado por sangrado en el cerebro.



1.2 Fisiopatología de la isquemia cerebral

El cerebro constituye aproximadamente el 2% del peso corporal; sin embargo, las neuronas del cerebro humano utilizan el 20% del O₂ que consume el organismo. Debido a esto, cuando ocurre un accidente isquémico en el cerebro y no hay aporte de O₂ (hipoxia) y sustratos metabólicos como la glucosa (hipoglucemia), se genera daño en las células. No obstante, a pesar de que la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) es indispensable para la supervivencia del tejido isquémico, se ha encontrado que en algunos casos exagera el daño [Jefayri *et al.*, 2000; Dalsing *et al.*, 1983]. Esto se debe a que con la perfusión, se desencadenan una serie de eventos que terminan en el daño y la muerte celular (Figura 3), como se revisará a continuación [Lakhan *et al.*, 2009].

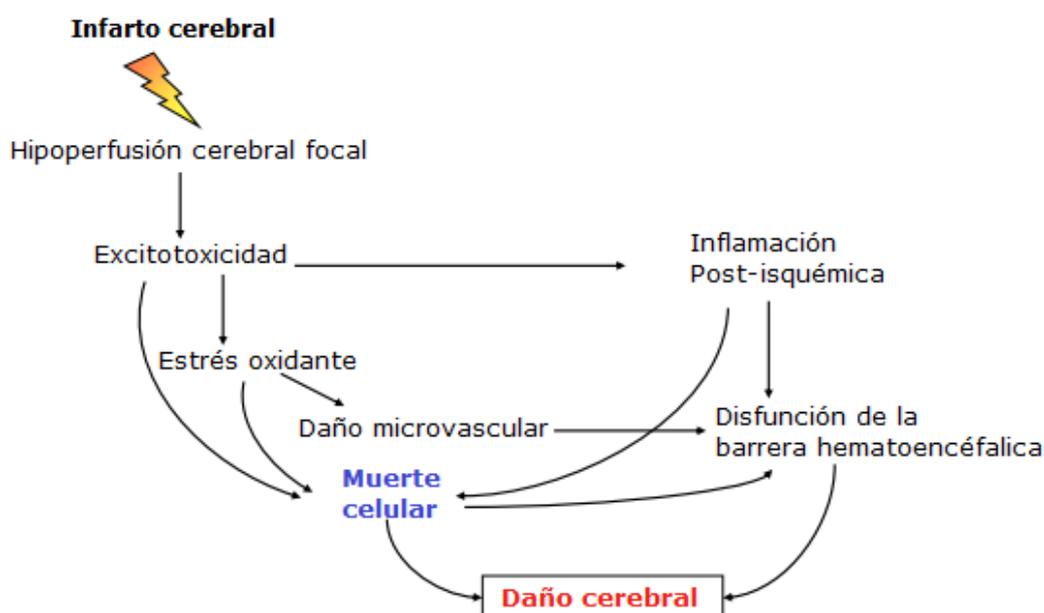


Figura 3. Cascada isquémica que conduce al daño celular. El infarto isquémico conduce a una disminución del flujo sanguíneo hacia el cerebro, lo que inicia una serie de eventos: excitotoxicidad, estrés oxidante, daño microvascular, disfunción de la barrera hematoencefálica e inflamación; conduciendo finalmente a la muerte de neuronas, glía y células endoteliales. El grado y duración de la isquemia determinarán la extensión del daño cerebral [Lakhan *et al.*, 2009].



El daño cerebral es el resultado de una secuencia compleja de eventos que se desarrollan a lo largo del tiempo y el espacio. Dentro de estos se encuentran [Rang & Dale, 2009; Margail *et al.*, 2005]:

- a) Disminución de la fosforilación oxidativa y por consiguiente una disminución en la producción de ATP debido a la ausencia de O_2 , que es el aceptor final de electrones. Esto ocasiona una pérdida de la actividad eléctrica neuronal como resultado de la alteración en los procesos dependientes de ATP.
- b) Activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular.
- c) Liberación masiva de aminoácidos excitadores (glutamato, aspartato, glicina, γ -aminobutírico y dopamina) y su acumulación en el espacio extracelular (excitotoxicidad).
- d) Inhibición de la síntesis de proteínas.
- e) Generación de especies reactivas de O_2 (ERO) y N_2 (ERN), por activación de ciertas enzimas como: xantina oxidasa, ciclooxigenasa-2, NADPH oxidasa y sintasa de óxido nítrico (SON).
- f) Reacción inflamatoria.
- g) Apoptosis.

2. EXCITOTOXICIDAD

A pesar de ser un neurotransmisor, el glutamato, puede ser tóxico para las neuronas. La excitotoxicidad juega un papel muy importante en la isquemia cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Huntington o Alzheimer [Rang & Dale, 2009]. En estas enfermedades se libera una cantidad excesiva de glutamato que sobreactiva a los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato (AMPA) y metabotrópicos. La activación de los receptores AMPA despolariza a la



célula, lo que provoca que el ión Mg^{2+} que bloquea a los canales NMDA sea removido y se permita la entrada de Ca^{2+} (Figura 4). La despolarización también abre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje lo que libera más glutamato e inhibe su captación incrementando su concentración extracelular. Los mecanismos que normalmente contrarrestan la elevación de la concentración de Ca^{2+} son la bomba de Ca^{2+} , y de forma indirecta, la bomba de Na^+ . Las mitocondrias y el retículo endoplásmico actúan como grandes sumideros para el Ca^{2+} y en condiciones normales, mantienen controlada su concentración intracelular. La carga de depósitos mitocondriales más allá de un punto, altera la función mitocondrial reduciendo la síntesis de ATP. Además, en estas condiciones los niveles de ERO y radicales libres aumentan [Rang & Dale, 2009].

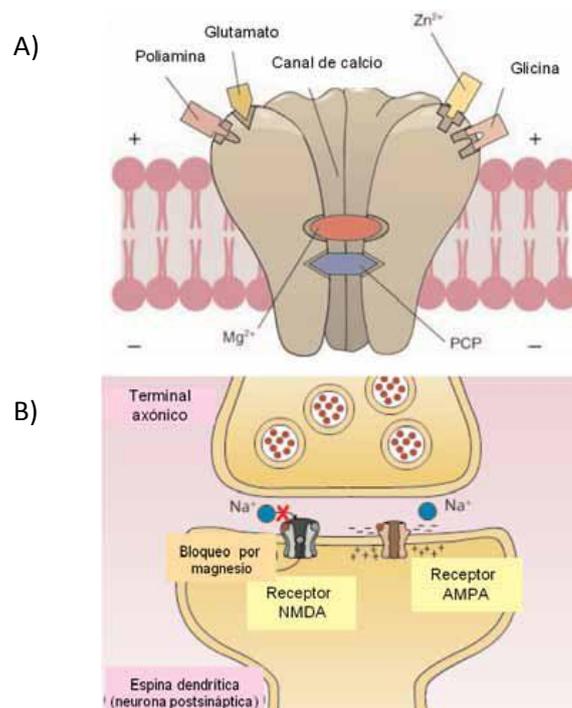


Figura 4. Receptor NMDA. A) Bajo el potencial de reposo de la membrana, el receptor NMDA se encuentra inactivo, debido al bloqueo dependiente de voltaje del canal por el Mg^{2+} . B) La despolarización de la neurona por acción del glutamato y a través de los receptores de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico) elimina este bloqueo [Tanovic´c & Alfaro, 2006].



La elevación de la concentración de Ca^{2+} , afecta muchos procesos que favorecen la neurotoxicidad [Tanovic´c & Alfaro, 2006] entre ellos:

- Aumenta la liberación de glutamato
- Activa proteasas (caspasas) y lipasas, que lesionan la membrana.
- Activa la SON: mientras las concentraciones de óxido nítrico (•ON) se mantengan bajas hay un efecto neuroprotector pero, en presencia de $\text{O}_2\text{•}^-$ y un incremento en su concentración puede formar peroxinitrito (ONOO^-) que al descomponerse genera radical hidroxilo (OH^{\bullet}) que tiene la capacidad de alterar proteínas, lípidos y ADN.
- Aumenta la liberación de ácido araquidónico, con la consecuente elevación de ERO e inhibe la captación de glutamato.

3. Estrés oxidante y nitrante

El organismo mantiene un balance de óxido-reducción constante, conservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes generados del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidante. La pérdida de este balance redox lleva a un estado de estrés oxidante y nitrante el cual se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas [Beckman & Ames, 1998; Ghadge *et al.*, 1997]; que si no es compensado por los sistemas de defensa antioxidante causan daño y muerte celular [Halliwell & Gutteridge, 1999]

Varios reportes indican que el estrés oxidante y nitrante juegan un papel muy importante en el daño y/o la muerte celular causado por el infarto cerebral isquémico. Esto se debe principalmente a que el



cerebro comparado con otros órganos es más susceptible al estrés debido a que: 1) es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, los cuales son blanco de las ERO y las ERN; 2) las células cerebrales utilizan el 20% del O₂ consumido por el cuerpo, lo que genera una mayor cantidad de ERO y ERN; y 3) en varias regiones hay concentraciones elevadas de hierro que pueden catalizar la formación de radicales libres [Sayre *et al.*, 2008].

La isquemia cerebral, pero sobre todo la reperfusión, son responsables del estrés oxidante y nitrante debido a la generación masiva de radicales libres [Nita *et al.*, 2001], lo que provoca daño y/o muerte neuronal [Lewen *et al.*, 2000; Chan, 2001].

Las especies oxidantes y nitrantes generan daño estructural en la célula, al alterar diferentes biomoléculas por ejemplo: 1) mediante la oxidación de bases nitrogenadas; 2) por la oxidación o nitración de proteínas; y 3) por la peroxidación de lípidos, un mecanismo autocatalítico que conduce a la destrucción oxidativa de las membranas celulares resultando en la liberación de metabolitos reactivos y tóxicos como el malondialdehído y el 4-hidroxinonal [Chirino *et al.*, 2006].

3.1 ERO y ERN

El O₂ es indispensable para la vida, pero en grandes cantidades puede resultar dañino [Chavko *et al.*, 2003]; pues al reducirse también existe en forma de especies radicales y no radicales, los cuales reciben el nombre de ERO y pueden causar daño a la célula, ya que son moléculas químicamente reactivas (Figura 5) [Fridovich, 1999; Betteridge, 2000].

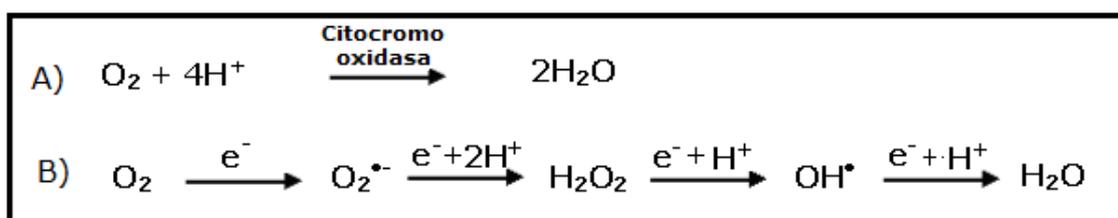


Figura 5. A). Reducción tetravalente del O_2 . B) Reducción univalente del O_2 .

Las ERO son generalmente moléculas de bajo peso molecular. Erróneamente se usan los términos ERO y radical libre de forma indistinta; sin embargo, la definición de radical libre abarca aquellas moléculas que son capaces de existir con uno o más electrones desapareados en su último nivel de energía. De esta forma no todas las ERO son radicales libres, pues el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no tiene electrones desapareados aunque si es altamente reactivo [Nordberg & Arner, 2001].

Las especies reactivas y los radicales libres pueden derivar no sólo del O_2 sino también de otras moléculas químicas. Desde el punto de vista biológico, las más importantes son las derivadas del O_2 y del N_2 , como el $\bullet\text{ON}$ o el ONOO^- , que de igual manera pueden ser radicales y no radicales y también se generan de forma constitutiva dentro de la célula como parte del metabolismo (Figura 6) [Turrens, 2003].

Los radicales libres al reaccionar con otra molécula se reducen ganando estabilidad y desestabilizando a moléculas vecinas que a su vez desestabilizan a otras haciendo una reacción en cadena [Phillis, 1994].

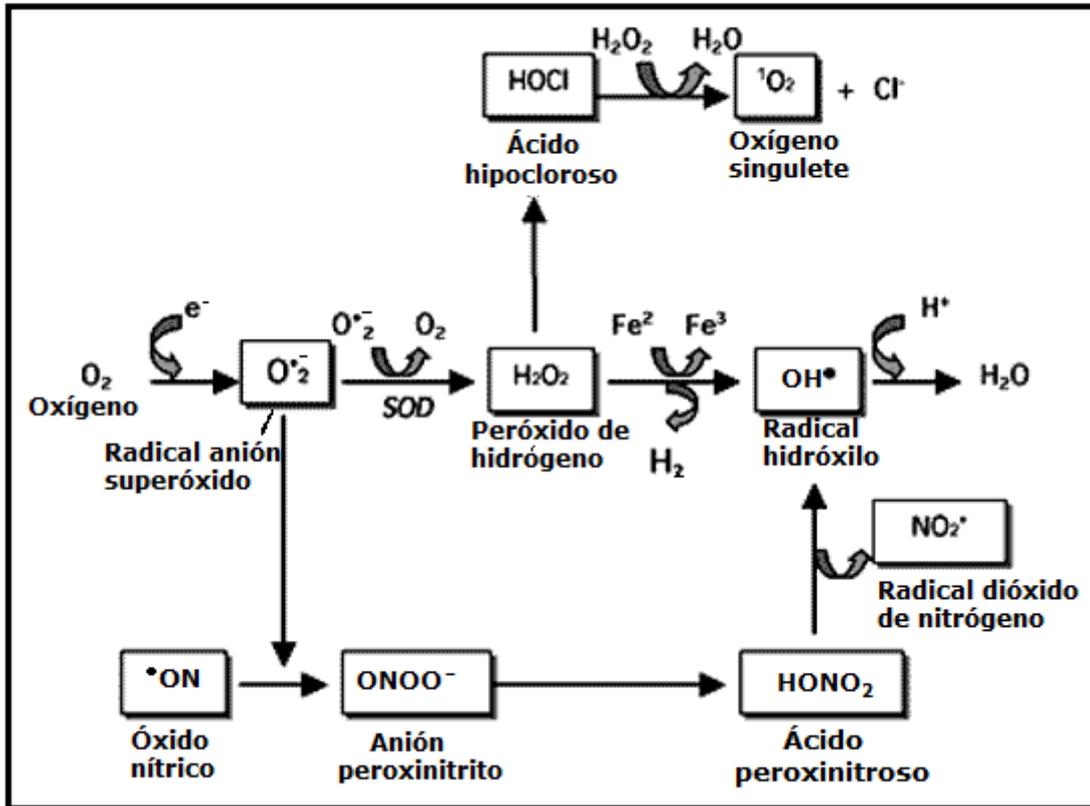


Figura 6. Principales especies radicales y no radicales generadas en las células [Castillo *et al.*, 2001].

3.1.1 Principales ERO y ERN

Las especies reactivas que son particularmente responsables del estrés oxidante incluyen el $O_2^{\bullet-}$, el OH^\bullet , el H_2O_2 , el $\bullet ON$ y el $ONOO^-$.

a) Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Es una especie poco reactiva que se forma cuando un electrón reduce al O_2 . Por sí sola no puede combinarse con biomoléculas, pero es tóxica porque puede atacar el sitio activo de enzimas con centro Fe-S, inactivándolas y liberando Fe^{2+} el cual se requiere para catalizar la formación de OH^\bullet en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Figura 7) [revisado en Benov, 2001].

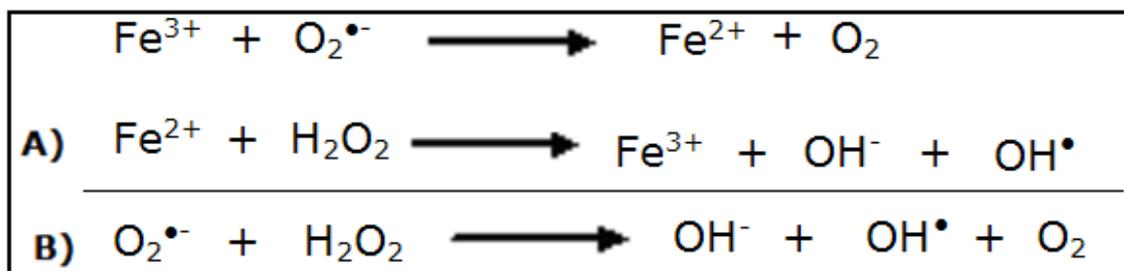
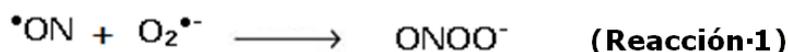
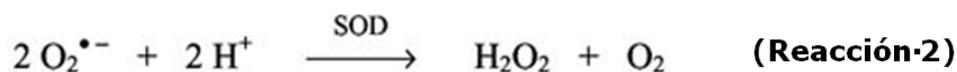


Figura 7. A) Reacción de Fenton. B) Reacción de Haber-Weiss.

Además, puede reaccionar rápidamente con $\bullet\text{ON}$, generando un radical altamente tóxico, el ONOO^- (Reacción 1).



La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Reacción 2) [revisado en Benov, 2001; Turrens, 2003; Gutteridge, 1994].



b) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La mayor parte proviene de la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ (reacción 2). También se genera durante la β -oxidación que se lleva a cabo en los peroxisomas y de algunas oxidasas (xantina oxidasa, oxidasa de aminoácidos, entre otras). Es capaz de difundir y atravesar las membranas hacia el espacio extracelular y puede dar lugar a la formación del OH^\bullet al reaccionar con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la reacción de Haber-Weiss [Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverrí, 2005]

c) Radical hidróxilo (OH^\bullet). Se forma a partir del $\text{O}_2^{\bullet-}$ y del H_2O_2 en presencia de hierro, a través de la reacción de Fenton y de Haber-Weiss, respectivamente (Figura 7). Es la principal ERO que ocasiona daño celular al ser altamente reactiva y reaccionar con casi todas las biomoléculas (lípidos, proteínas,



ácidos nucleicos y carbohidratos), provocando una reacción en cadena [Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2005].

d) Óxido nítrico ($\cdot\text{ON}$). Sintetizado por la SON, es un radical débil pero es el precursor de otras ERN como el ONOO^- , el ácido peroxinitroso (HONO_2) y el dióxido de nitrógeno (NO_2), las cuales sí son muy reactivas [Cassina & Radi, 1996].

e) Peroxinitrito (ONOO^-). Se genera de la reacción entre los radicales $\cdot\text{ON}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ (reacción 1). No es un radical pero sí es altamente tóxico ya que modifica a las biomoléculas por oxidación o nitración [Cassina & Radi, 1996].

3.1.2 Principales fuentes de especies reactivas

Las ERO y ERN se generan en el organismo durante la respiración celular, por varios sistemas enzimáticos y en el metabolismo endógeno tal como: reducción univalente del O_2 , reacciones de óxido-reducción, fagocitosis, cadena de transporte de electrones mitocondrial, autooxidación de catecolaminas, síntesis de prostaglandinas, oxidación de la xantina e hipoxantina por la xantina oxidasa, complejo enzimático NADPH oxidasa y metabolismo de la SON [Klein & Ackerman, 2003; Halliwell & Gutteridge, 1999].

4. Sistemas de defensa antioxidante

Halliwell y Gutteridge [1999] definieron un antioxidante como: una sustancia que cuando está en bajas concentraciones comparado con algún sustrato oxidable previene la oxidación del sustrato. El



termino sustrato oxidable incluye todo tipo de moléculas encontradas *in vivo*. Los sistemas de defensa antioxidante celulares pueden ser clasificados en dos grupos, enzimáticos y no enzimáticos.

4.1 Antioxidantes enzimáticos

Durante el estrés oxidante la rápida sobreproducción de radicales libres y especies reactivas rebasa la respuesta antioxidante del organismo, que cuenta con enzimas antioxidantes y de detoxificación como son:

- **Superóxido dismutasa (SOD).** Es un grupo de metaloenzimas presentes con frecuencia en los organismos aerobios y anaerobios facultativos. La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ para formar H_2O_2 (Reacción 2), el cual es eliminado por la catalasa y la glutatión peroxidasa. En humanos existen tres isoformas: citosólica, mitocondrial y extracelular. La isoforma citosólica tiene en su grupo prostético Cu y Zn unidos por un residuo de histidina (CuZnSOD). La isoforma mitocondrial, contienen en su grupo prostético Mn (MnSOD) y se encuentra protegiendo a las proteínas de membrana y al ADN mitocondrial del $O_2^{\bullet-}$ generado en la cadena respiratoria. La isoforma extracelular (EC-SOD) es una glicoproteína de secreción la cual también tiene Cu y Zn en su centro activo. Se ubica en el espacio intersticial, así como en fluidos extracelulares como el plasma y la linfa [Mates & Sánchez-Jiménez, 1999].
- **Catalasa (CAT).** Es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, que contiene en su centro activo un grupo hemo y NADPH. En la célula se localiza en el citosol, la mitocondria y en organelos subcelulares como los peroxisomas. Dependiendo de



la cantidad de H_2O_2 que se genere, tiene dos actividades enzimáticas. Cuando hay altas concentraciones de H_2O_2 lo descompone para formar O_2 y H_2O , mientras que si hay bajas concentraciones reacciona con donadores de hidrógeno como metanol, etanol o formol y los oxida para remover peróxidos de forma similar a las peroxidasas [Matés & Sánchez-Jiménez, 1999].

- **Glutation Peroxidasa (GPx).** Contiene un residuo de selenocisteína en cada una de sus cuatro subunidades idénticas, que es esencial para la actividad enzimática. Cataliza la reducción del H_2O_2 o de lipoperóxidos utilizando glutatión reducido (GSH). Existen cinco isoformas en mamíferos: la GPx citosólica, la GPx mitocondrial (cGPx o GPx1), la GPx plasmática o extracelular (GPxp), la GPx gastrointestinal (GPxgi), la GPx de fosfolípidos (GPxpl) y la más reciente la GPx expresada en el epidídimo (GPx5) [Whitin *et al.*, 1998; Sies *et al.*, 1997].

4.2 Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes de tipo no enzimático pueden dividirse en:

- **Endógenos:** los que se sintetizan en el organismo (GSH, bilirrubina y ácido úrico) [Franco & Cidlowski, 2009]
- **Exógenos:** los adquiridos en la dieta, sobre todo de frutas y verduras (vitaminas C, E y los carotenos) [Sies, 1999; Chan, 2001].

También se pueden clasificar de acuerdo a su solubilidad en:



- **Hidrosolubles.** Como la vitamina C o el ácido ascórbico, que se localiza tanto en citosol como en espacio extracelular; el glutatión reducido (GSH), que es el tripéptido γ -L-glutamil-L-cistein-glicina y el ácido úrico que es el producto final del metabolismo de las purinas.
- **Liposolubles.** Como la vitamina E y los carotenos, que se encuentran en las membranas biológicas y la bilirrubina que se genera de la degradación del grupo hemo en mamíferos.

5. Extracto de ajo envejecido

El ajo (*Allium sativum*), originario de Asiacentral, se ha utilizado desde la antigüedad por sus múltiples propiedades medicinales [López, 2007].

El efecto protector del ajo en varios modelos ha sido asociado a su potente acción antioxidante, a su capacidad para estimular respuesta inmunológica y a su modulación en la síntesis de prostanoïdes [Borek, 2001]

Existen en el mercado algunos productos disponibles de ajo, como el extracto de ajo envejecido, el cual es resultado de la prolongada extracción del ajo fresco a temperatura ambiente. El proceso de envejecimiento modifica, mediante reacciones químicas naturales y enzimáticas, los compuestos irritantes del ajo [revisado en Herrera-Mundo *et al.*, 2009]. El principal cambio durante el proceso de envejecimiento es la completa hidrólisis de la γ -glutamil cisteína a S-alil cisteína (SAC) y S-1-propenil cisteína (Figura 8). El contenido de SAC es altamente estable manteniéndose después de tres meses en el extracto de ajo envejecido, mientras que el contenido de S-1-propenilcisteína empieza a disminuir.

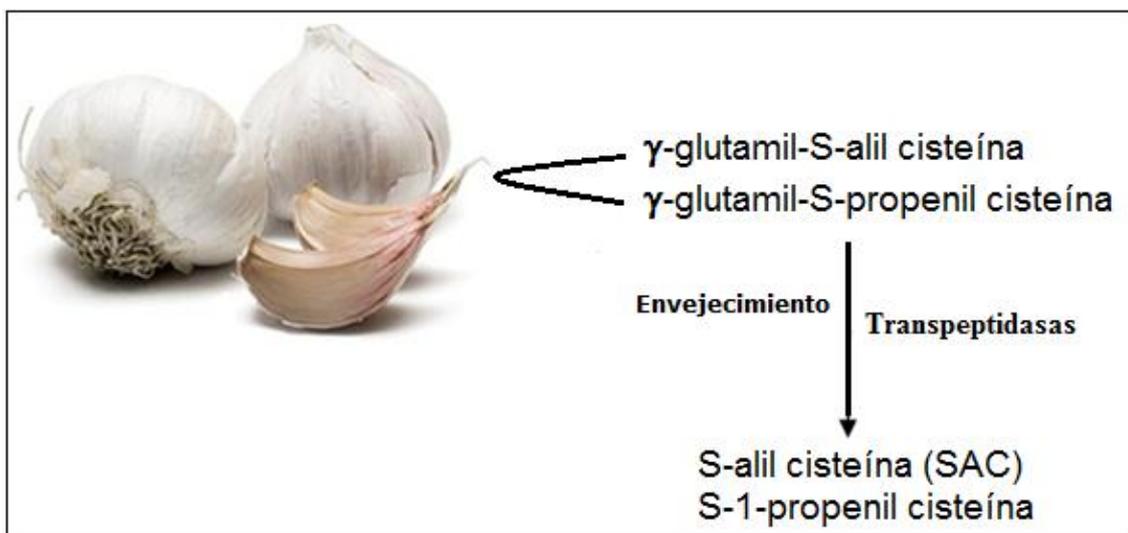


Figura 8. Hidrólisis que ocurre durante el proceso de envejecimiento en el extracto de ajo envejecido por acción de las transpeptidasas, y que da lugar al producto mayoritario, la SAC.

De las presentaciones del ajo, el EAE es en la única que se ha demostrado su actividad biológica tanto en humanos [Yeh & Liu, 2001] como en ratas [Numagami *et al.*, 1996].

5.1 S-alil cisteína (SAC)

La SAC es el compuesto organosulfurado mayoritario del extracto de ajo envejecido.

Se forma por el catabolismo de la γ -glutamyl-S-alil cisteína mediante la enzima γ -glutamyltransferasa (Figura 9A) [Kodera *et al.*, 2002]; aunque también puede ser obtenida por síntesis química (Figura 9B) [Nagae *et al.*, 1994; Maldonado *et al.*, 2003].

La SAC es un compuesto que por sus propiedades fisicoquímicas es muy estable, ya que en solución acuosa permanece como tal alrededor de 2 años. Tiene un punto de fusión de 223.3-223.7°C, es un polvo blanco cristalino con olor característico, no higroscópico. Se absorbe en el tracto gastrointestinal después de su



administración oral y se distribuye principalmente en el plasma, el hígado y el riñón [Chang-Kai & Fan-Dian, 2005; Nagae *et al.*, 1994].

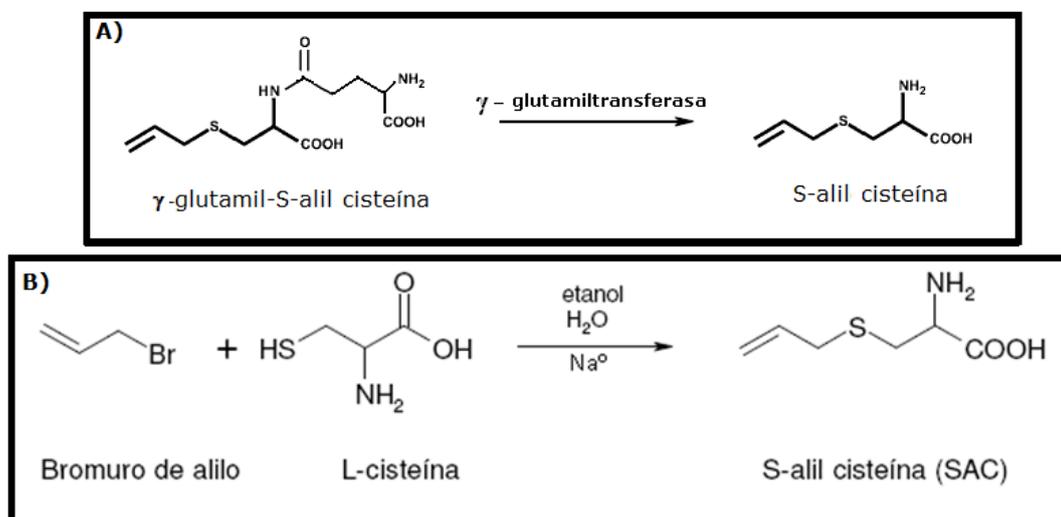


Figura 9. A) En el ajo la γ -glutamyl-S-alil cisteína es convertida a S-alil cisteína (SAC) por la γ -glutamilttransferasa [Modificado de Herrera-Mundo, *et al.*, 2009]. B) Síntesis química para la obtención de la SAC [Nagae *et al.*, 1994; Maldonado *et al.*, 2003].

La SAC es 30 veces menos tóxica que otros compuestos del ajo como la alicina, el dialildisulfuro o el dialiltrisulfuro. La dosis letal 50 (DL₅₀) de la SAC por vía oral en ratas machos es de 10.9 g/Kg y en hembras es de 9.5 g/Kg [revisado en Herrera-Mundo *et al.*, 2009], mientras que por vía intraperitoneal es de 3.34 g/Kg tanto en hembras como en machos. Después de la administración oral de SAC se observa una alta biodisponibilidad tanto en ratas como en humanos [Kodera *et al.*, 2002].

Nagae y colaboradores [1994], encontraron en ratas que la SAC se excreta en la orina como N-acetil-SAC (aproximadamente del 30 al 50% de la dosis) y menos del 1% como SAC.

Se ha reportado que la SAC es uno de los compuestos biológicamente activos del ajo ya que ha mostrado ser un potente antioxidante en modelos donde el estrés oxidante juega un papel



muy importante, incluyendo órganos como cerebro, corazón, hígado, riñón [revisado en Herrera-Mundo *et al.*, 2009]. Recientemente, se ha estudiado su capacidad para atrapar diferentes especies radicales y oxidantes [Medina-Campos *et al.*, 2007], reportada como concentración inhibitoria media (CI₅₀), que es la concentración a la cual la SAC es capaz de atrapar el 50% de la especie o el radical libre producida(o) en un ensayo específico (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la SAC respecto a los compuestos de referencia [Modificado de Medina-Campos *et al.*, 2007].

ERO	Compuesto de referencia	CI₅₀ (mM) compuesto de referencia	CI₅₀ (mM) SAC
O₂^{•-}	N-acetil cisteína	3.39	14.49
H₂O₂	Piruvato	2.83	68
OH[•]	Dimetil tiourea	0.47	0.68
HOCl	Ácido lipoico	2.29	2.86
ONOO⁻	Penicilamina	0.03	0.08

En cerebro se ha reportado que la SAC previene la formación del edema en animales isquémicos debido a que inhibe la peroxidación lipídica y la producción de radicales libres [Numagami *et al.*, 1996; Numagami & Ohnishi, 2001]. Apoyando estos resultados, el tratamiento con SAC restauró el nivel de ATP, el glutatión reducido (GSH), la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en un modelo de isquemia cerebral. Además, disminuyó la lipoperoxidación, la carbonilación de proteínas y el contenido de H₂O₂; y mejoró significativamente el déficit neurológico, previno la formación de edema y el área de infarto cerebral [Atif *et al.*, 2009]

Recientemente, se reportó que la SAC es capaz de inducir el factor de transcripción Nrf2 y la subsiguiente inducción de las enzimas de



fase II en el hígado, confiriendo un estado de protección en un modelo de toxicidad inducido por dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en hepatocitos de rata [Kalayarasan *et al.*, 2008]. Sin embargo, este mecanismo no se ha explorado en cerebro.

6. Factor de transcripción Nrf2 (factor relacionado al factor nuclear erotroide-2)

Pertenece a una familia de proteínas básicas con un cierre de leucinas característico en la región C-terminal. El Nrf2 en condiciones normales está unido a la proteína Keap1 (proteína 1 asociada-ECH Kelch-like) en citoplasma, cuando las células son expuestas a estrés oxidante, el Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo uniéndose al elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés) (Figura 10), activando la expresión de genes de varias enzimas citoprotectoras conocidas como enzimas de fase II. Estas incluyen a: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), la γ -glutamil cisteín ligasa (GCL), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatitón-S-tansferasa (GST), la hemooxigenasa 1 (HO-1), la tioredoxina, entre otras, las cuales contrarrestan el daño inducido por el estrés oxidante [Lakhan *et al.*, 2009; Surh *et al.*, 2008] al participar como captadores, detoxificadores de xenobióticos y manteniendo el potencial redox [Nguyen *et al.*, 2009].

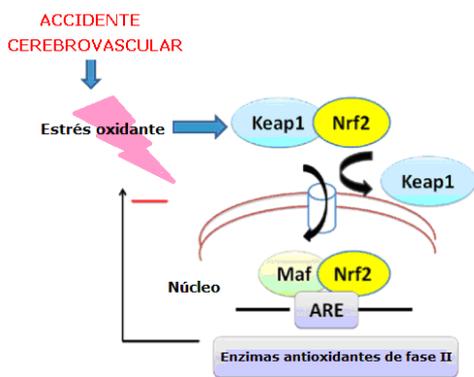


Figura 10. Respuesta antioxidante del factor Nrf2 en un accidente isquémico. Nrf2 es el principal factor de transcripción que regula el elemento de respuesta antioxidante (ARE) mediante la expresión de enzimas de fase II o de detoxificación. [Lakhan *et al.*, 2009].

Varios estudios han demostrado que la activación del factor Nrf2 es neuroprotectora en modelos *in vitro* de excitotoxicidad mediada por glutamato, estrés oxidante y sobreproducción de Ca^{2+} [Johnson *et al.*, 2008].

La administración del bien caracterizado inductor del factor Nrf2, la *ter*-butil hidroquinona (*t*BHQ), un metabolito hidroxianisol butilado ampliamente utilizado como antioxidante alimenticio, mostró una mejoría significativa en el daño motor y en la histología en dos modelos de isquemia/reperfusión en ratas y ratones [Shih *et al.*, 2005]. En este trabajo la inducción del factor Nrf2 antes del accidente cerebrovascular logró salvar el área de penumbra pero no el núcleo isquémico. El tratamiento profiláctico mejoró la recuperación funcional después de un mes de reperfusión, sugiriendo que la activación previa del factor Nrf2 puede reducir la muerte de células neuronales mediante el retraso de la apoptosis y la inflamación que se induce después de la isquemia cerebral [Lakhan *et al.*, 2009].

Por otro lado, ratones deficientes en la expresión de Nrf2 son significativamente más propensos al daño cerebral isquémico y al déficit neurológico, comparado con los ratones silvestres debido a la falla en la inducción de las enzimas de fase II [Shih *et al.*, 2005].

Por otra parte, un amplio número de moléculas naturales y sintéticas han mostrado ser potentes inductores del factor Nrf2 (Tabla



2). Las de origen natural se encuentran de forma abundante en vegetales crucíferos, frutas, granos, especias, entre otros.

Tabla 2. Inductores del factor de transcripción Nrf2.

Molécula	Presente en:	Referencia
Sulforafano	Brócoli	Hong <i>et al.</i> , 2005; Thimmulappa <i>et al.</i> , 2002.
Ciurcumina	Turmérico	Balogun <i>et al.</i> , 2003; Garg <i>et al.</i> , 2008
Galato de epigallocatequina	Té verde	Wu <i>et al.</i> , 2006; Na <i>et al.</i> , 2008.
Dialil disulfuro	Ajo	Gong <i>et al.</i> , 2004.
Dialil trisulfuro	Ajo	Chen <i>et al.</i> , 2004.
S-alil cisteína	Extracto de ajo envejecido	Kalayarasan <i>et al.</i> , 2008.
Resveratrol	Uva	Chen <i>et al.</i> , 2005; Kode <i>et al.</i> , 2008.
Capsaicina	Chile	Joung <i>et al.</i> , 2007.
Piperina	Pimienta	Choi <i>et al.</i> , 2007.
Carnosol	Romero	Martin <i>et al.</i> , 2004.

El factor Nrf2 regula diferentes grupos de genes que actúan a diferentes niveles para generar un estado de protección, dentro de estos genes se incluyen [Lee *et al.*, 2003]:

- a.** Genes de detoxificación
- b.** Genes antioxidantes
- c.** Genes de crecimiento
- d.** Genes de defensa inmune/inflamación
- e.** Genes de señalización
- f.** Otros

La figura 11 muestra como el Nrf2 regula la expresión de genes relacionados con la detoxificación de H₂O₂ y con la homeostasis del glutatión y el NADPH.

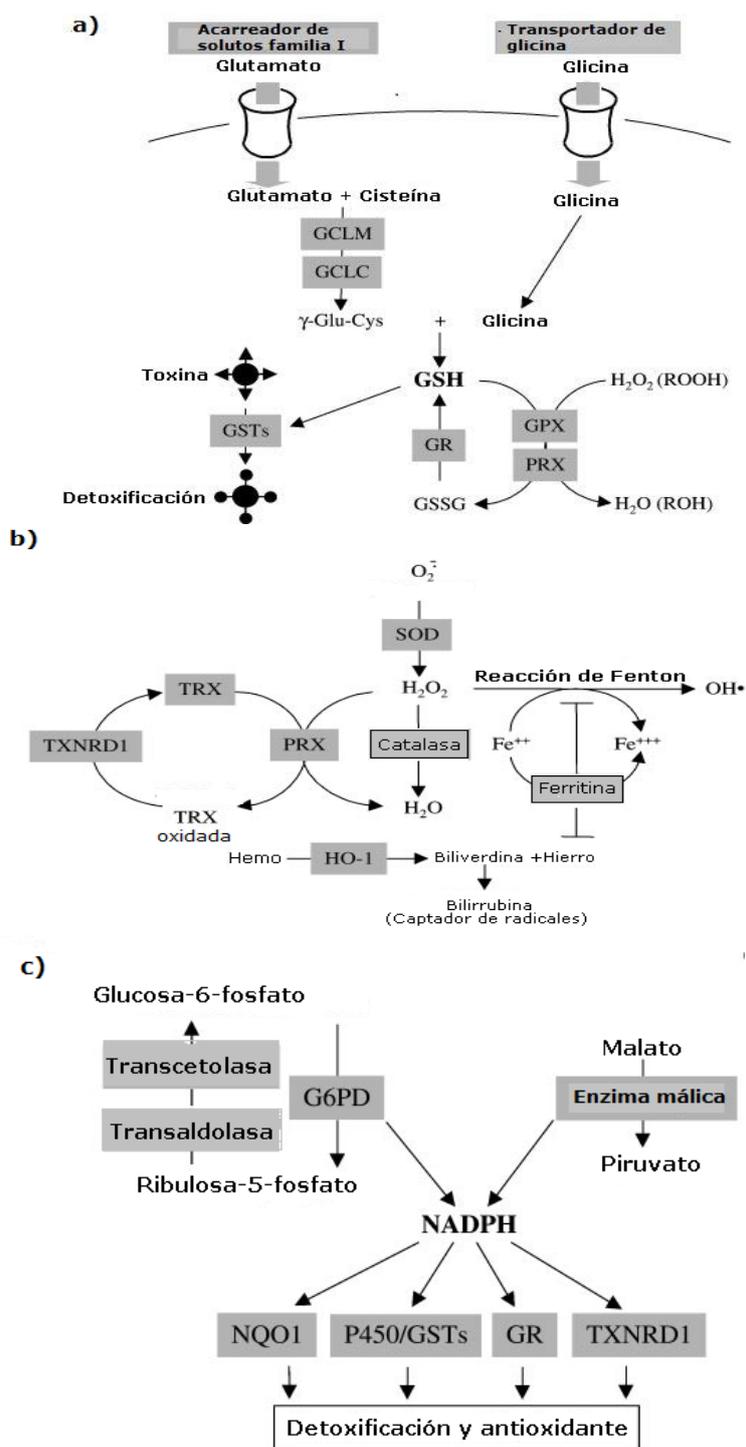


Figura 11. Regulación de los genes dependientes de Nrf2. Los genes se agrupan en base a su función y vía metabólica y se muestran en las cajas grises. a) Genes relacionados con la homeostasis del glutatión, b) genes relacionados con la detoxificación de H_2O_2 y la homeostasis del hierro y c) genes relacionados con la homeostasis del NADPH. *GCLM*, subunidad modificadora de la glutamato-cisteín ligasa; *GCLC*, subunidad catalítica de la glutamato cisteín ligasa; *GSTs* glutatión-S-transferasas, *GR*, glutatión reductasa; *GPX*, glutatión peroxidasa; *PRX*, peroxiredoxina; *SOD*, superóxido dismutasa; *TRX*, tioredoxina; *TXNRD1*, tioredoxina reductasa-1; *HO-1*, hemo oxigenasa-1; *G6PD*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *NQO1*, NADPH:quinona oxidoreductasa-1; *P450*, citocromo P450 [Lee et al., 2003].



II. JUSTIFICACIÓN

En países industrializados, el infarto cerebral representa la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad en adultos mayores; además, se espera que la incidencia aumente conforme la población va envejeciendo [Candelario-Jalil, 2008; Rang & Dale, 2009]. En México representa la quinta causa de muerte y la segunda de demencia [Rang & Dale, 2009]. En 1998, su incidencia fue de 32.59 casos por cada 100,000 habitantes [Aguado *et al.*, 1996] y según la Organización Panamericana de la Salud, es un problema que va en aumento en magnitud y en gravedad, lo que a futuro puede provocar un enorme costo social y económico en términos de mortalidad, morbilidad y minusvalía, ya que del 70% de los accidentes que no son mortales, representan la primera causa de discapacidad en adultos mayores de 65 años [Candelario-Jalil, 2008; Rang & Dale, 2009].

Cuando se interrumpe el flujo sanguíneo (isquemia) hacia el cerebro, se desencadena una serie de eventos (despolarización neuronal, excitotoxicidad, estrés oxidante, inflamación, apoptosis, entre otros) que pueden causar daño con diferente grado de severidad. Se ha reportado que el daño causado por algunos de estos eventos se acentúa cuando el flujo sanguíneo se reestablece (reperfusión), por lo que es importante encontrar alguna forma de disminuir y/o prevenir la muerte neuronal.

Se ha evaluado el efecto de compuestos antioxidantes, anti-apoptóticos o anti-inflamatorios en modelos experimentales de isquemia cerebral, mostrando un efecto protector. Sin embargo, aun no existe un tratamiento que sea realmente eficaz en los pacientes; por ello, está ampliamente justificada la búsqueda de nuevos fármacos que puedan atenuar las alteraciones que presentan los pacientes que sufren un infarto cerebral.



La SAC es el compuesto organosulfurado mayoritario del extracto de ajo envejecido y su efecto protector en diferentes modelos se ha asociado: 1) a su potente acción antioxidante [revisado en Herrera-Mundo *et al.*, 2009]; 2) a que regula la producción del $\cdot\text{ON}$, lo cual está asociado con una respuesta anti-inflamatoria [Kim *et al.*, 2001]; y 3) recientemente, se reportó que induce el factor de transcripción Nrf2 y la subsiguiente producción de diferentes enzimas de fase II [Kalayarasan *et al.*, 2008]. Los dos primeros mecanismos ya han sido ampliamente estudiados, incluso en modelos cerebrales; sin embargo, la inducción del factor Nrf2 ha sido poco estudiada y en cerebro este mecanismo aún no se ha evaluado. Por ello, en este trabajo se propone evaluar este mecanismo.



III. HIPÓTESIS

Si la SAC es capaz de activar al factor de transcripción Nrf2, el cual promueve la transcripción de las enzimas de fase II; entonces su administración previa atenuará y/o disminuirá el daño inducido por 1 h de isquemia y 24 h de reperusión.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto de la administración de la S-alil cisteína (SAC) sobre el daño cerebral que se induce en un modelo experimental de isquemia cerebral en rata.

2. Objetivos particulares

- ✓ Evaluar el efecto de la administración de la SAC sobre las alteraciones conductuales y el daño morfológico que se induce en un modelo experimental de isquemia/reperusión.
- ✓ Evaluar el efecto del tratamiento con SAC sobre el área de infarto en un modelo de isquemia-reperusión.
- ✓ Evaluar si la SAC induce la activación del factor de transcripción Nrf-2 en cerebro.



V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso de 280 a 320 g, criadas en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía bajo condiciones controladas de iluminación (ciclos de 12 h de luz y oscuridad), temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 10\%$). Se les suministro alimento comercial para rata (Laboratory rodent diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (4 ratas por caja). Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y a los parámetros locales sobre el Uso Ético de Animales por el Ministerio de Salud de México. Durante todos los experimentos se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

2. Reactivos

La SAC fue sintetizada en el laboratorio como se menciona a continuación (sección 4.1).

La parafina, la hematoxilina, la eosina y el cloruro de 2,3,5-trifeniltarazolio (TTC) se adquirieron de Sigma Chemical Co (St Louis, CA, USA).

El trizol fue de invitrogen (Carls bad, CA, USA). El kit para sintetizar ADNc fue de Roche (Alemania).

El xilol, el alcohol etílico y el carbonato de litio se adquirieron de J.T. Baker (México).

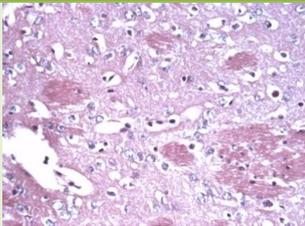
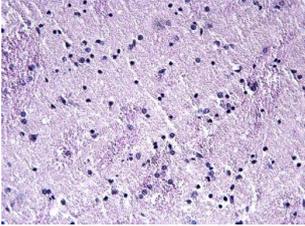
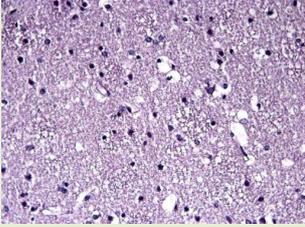
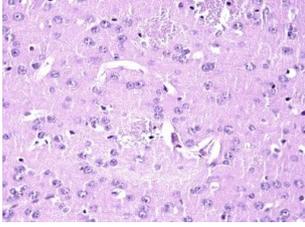
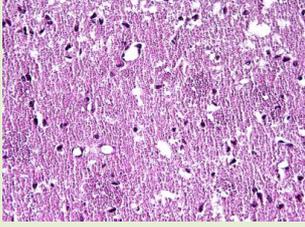
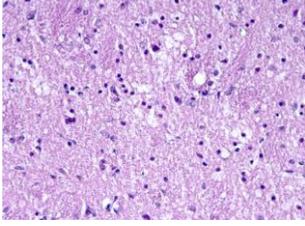
3. Diseño experimental

Se evaluó el efecto de diferentes dosis de SAC (50, 75, 100, 125 o 200 mg/Kg de peso, *ip*) y diferentes esquemas de administración (cada 24 h durante 3, 4, 5 ó 7 días previos a la



inducción de la isquemia cerebral) sobre el daño que se induce en un modelo de isquemia cerebral (Tabla 3). Estas pruebas se realizaron para elegir una dosis de SAC que mostrara un efecto protector.

Tabla 3. Efecto de diferentes dosis de S-alil cisteína (SAC) sobre el daño neurológico inducido por la isquemia/reperfusión (IR).

Dosis/esquema SAC	Imagen	Resultado
Grupo IR. Administrado con solución salina.		No aplica. Grupo CT que muestra el daño que se induce con la isquemia reperfusión
Grupo IR + SAC 50 mg/Kg, ip durante 7 días		No hay protección
Grupo IR + SAC 75 mg/Kg, ip durante 5 días		No hay protección
Grupo IR + SAC 100 mg/Kg, ip durante 5 días		Si hay protección
Grupo IR + SAC 125 mg/Kg, ip durante 4 días		No hay protección
Grupo IR + SAC 150 mg/Kg, ip durante 3 días		No hay protección
Grupo IR + SAC 200 mg/Kg, ip durante 3 días	Las ratas murieron	No hay protección



El mayor efecto protector de la SAC sobre las alteraciones morfológicas, se observó con la dosis de 100 mg/Kg de peso, administrada cada 24 h durante 5 días. Por esta razón esta fue la dosis que se empleó en los experimentos posteriores.

Se emplearon 5 grupos de ratas (n=4) divididas al azar como se menciona a continuación:

- a) Control (CT), inyectados con solución salina.
- b) Sham, animales sometidos al procedimiento quirúrgico, sin inducción de isquemia.
- c) Control con SAC (SAC), inyectados con SAC.
- d) Sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión (IR) e inyectados con solución salina.
- e) IR+SAC.

La dosis de solución salina (grupos CT, Sham e IR) o SAC (grupos SAC e IR+SAC) fue 100 mg/Kg de peso, cada 24 h durante 5 días, vía intraperitoneal (*ip*).

Los animales de los grupos IR, IR+SAC y Sham se sacrificaron 24 h después del inicio de la reperfusión. En el caso de los grupos CT y SAC se sacrificaron 25 h después de la última administración de solución salina o SAC, respectivamente. A todos los animales se les midió el déficit neurológico justo antes del sacrificio. En un grupo independiente de animales se midió: 1) el daño neurológico 2) el área de infarto y 3) el nivel del ARNm del factor Nrf2.

4. Metodología

4.1 Síntesis de SAC

La S-alil cisteína fue sintetizada mediante la reacción de la L-cisteína con bromuro de alilo (Figura 9) y purificada por recristalización con etanol [Lawson *et al.*, 1991]. El producto final



se comparó con para su identificación con un estándar de SAC por resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹H) y por la medición de su punto de fusión.

4.2 Inducción de la isquemia cerebral

Los animales se anestesiaron en una cámara de halotano y se sometieron al procedimiento quirúrgico para inducir el daño cerebral isquémico, a través de la oclusión temporal de la arteria cerebral media (durante 1 h), siguiendo la técnica propuesta por Longa y colaboradores [1989].

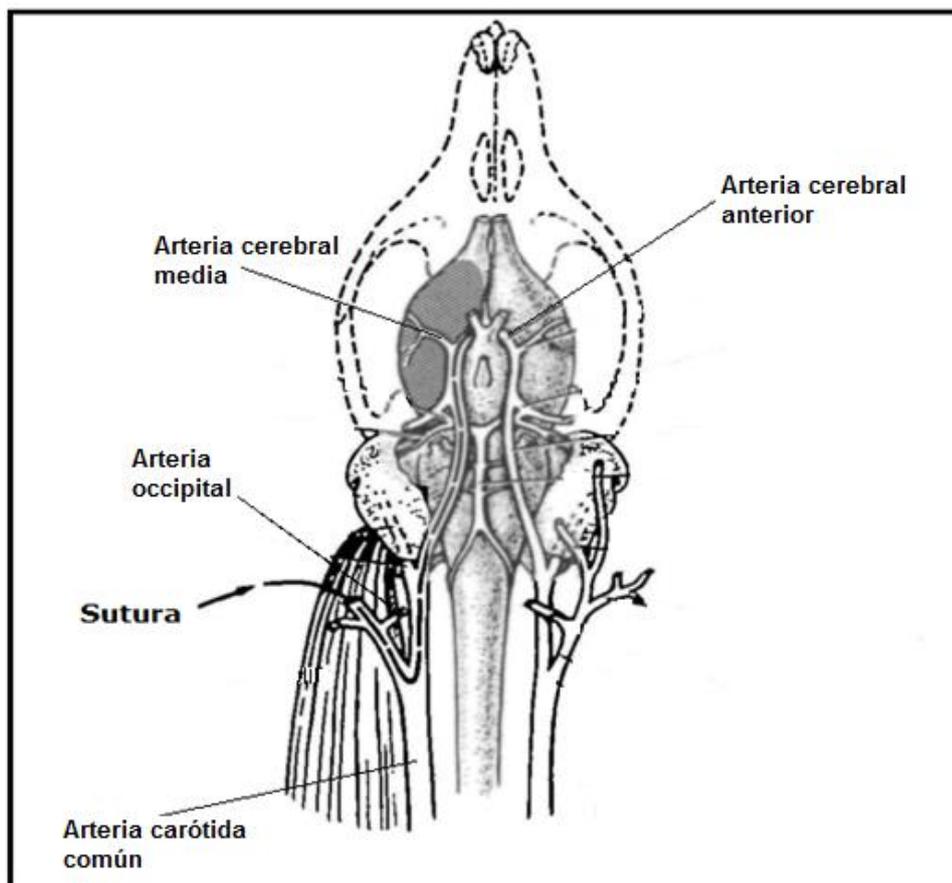


Figura 12. Diagrama que muestra la posición del filamento de nylon para realizar el modelo de la oclusión de la arteria media cerebral [Modificado de Longa *et al.*, 1989].



4.3 Déficit neurológico

Se evaluó determinando los cambios en la actividad motora de las ratas realizando cinco pruebas [Menzies *et al.*, 1992; Modo *et al.*, 2000; Van der Staay *et al.*, 1996]: 1) Movilidad espontánea: el animal se coloca en una superficie plana (1 m²) y debe iniciar la exploración en un tiempo menor a 10 seg; 2) Reflejo de agarrar: el animal se sostiene por la cola y se aproxima a un cable. El animal debe asirse empleando las patas delanteras de manera simultánea; 3) Barra horizontal: se colocan las patas delanteras de la rata sobre un cable y debe sostenerse durante 3 seg; 4) Prueba de colgar por la cola: la rata se sujeta por la base de la cola y se levanta 30 cm. Los animales deben extender las patas delanteras hacia el frente, los animales dañados flexionan la pata contralateral a la lesión; 5) Giros contralaterales: sobre una superficie plana, la rata se sostiene de la cola levantando solo las patas traseras. Los animales sin daño caminan hacia el frente; mientras que los animales dañados se desplazan dando giros en sentido contralateral a la lesión.

A cada prueba se le asignó un valor de 0 si el comportamiento fue normal y un valor de 1 si la conducta estuvo alterada. El daño asociado al área de infarto estuvo caracterizado por un valor igual o superior a 2 (resultados preliminares obtenidos en el laboratorio).

4.4 Histología

Los animales se perfundieron y se fijó el cerebro en p-formaldehído 4%, después de 7 días los cerebros se deshidrataron en una serie de soluciones de alcohol, seguido de xilol y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina y se montaron en portaobjetos. La cuantificación del daño se realizó en el estriado izquierdo en el área de penumbra, se obtuvo el número de células dañadas y preservadas en 5 campos seleccionados al azar, obtenidos de 3 cortes por rata. Se empleó un



analizador de imágenes, IM1000 (Leica, Cambridge, UK). El criterio general de daño fue: núcleos picnóticos, vacuolización citoplásmica, atrofia neuronal, necrosis y edema intersticial. Los datos se expresan como porcentaje de neuronas dañadas por campo.

4.5 Área de infarto

Se determinó de acuerdo al método para medir viabilidad celular propuesto por Preston & Webster [2004]. Se extrajo el cerebro, se congeló a -70°C durante 4 min y se realizaron cortes coronales de 2 mm. Los cortes fueron teñidos con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio 1% (TTC) en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 a 37°C durante 30 min en agitación suave y en oscuridad. Los cortes se fijaron en p-formaldehído al 4%.

El TTC es una sal de tetrazolio incolora que al ser reducida por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial del tejido viable da lugar a la formación de 1,3,5-trifenilformazán un compuesto de color rojo. No sucede así cuando la actividad mitocondrial se encuentra disminuida pues el TTC se mantiene oxidado y no hay generación de color (área de infarto, color blanco). El área de infarto se determinó con un analizador de imágenes Quantity One de BioRad. El área se midió en las 3 rebanadas frontales que muestran el estriado y la corteza. Los datos se expresaron como % de área de infarto y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ área de infarto} = \frac{\text{área infartada}}{\text{área total}} \times 100$$

4.6 Determinación del nivel de ARNm del factor de transcripción Nrf2.

El ARN total se aisló de la corteza usando el reactivo de Trizol y 5 μg de ARN total se utilizaron para la síntesis de ADNc.



La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) fue realizada usando el Sistema Maestro Taqman LightCycler y el instrumento LightCycler 2.0 de Roche (Roche, Germany).

Cada 10 μL de mezcla de reacción consistió de: 2 μL de Taqman Master 5X, 0.1 μL de la sonda específica universal (10 μM), 0.2 μL de cada primer (10 μM) y 2 μL de ADNc templado (plantilla). Las secuencias de los primers fueron para Nrf2: izquierda 5'-agcatgatggacttgaattg-3' y derecha 5'-cctccaaaggatgtcaatcaa-3' con una sonda Universal #3; y para L32 (gen constitutivo): izquierda 5'-ccggaagtttctggtccac-3' y derecha 5'-cagcacagtaagatttgttgac-3' con una sonda universal #17. El ciclo termal consistió de un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos a 94°C por 10 s, a 60°C por 30 s y a 72°C por 1 s.

La expresión relativa de los niveles se calculó después de la normalización con el gen de la proteína ribosomal L32 (gen constitutivo) y los resultados se expresan en relación a la corteza de los animales CT.

5. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm EEM y se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba de Tukey (datos de conducta e histología). Se realizó una *t* de Student para analizar el área de infarto. Para la determinación del ARNm del factor de transcripción Nrf2 los datos se expresaron como la media \pm DE. La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por una *t* de Student. Todos los análisis se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Identificación de la SAC obtenida por síntesis química

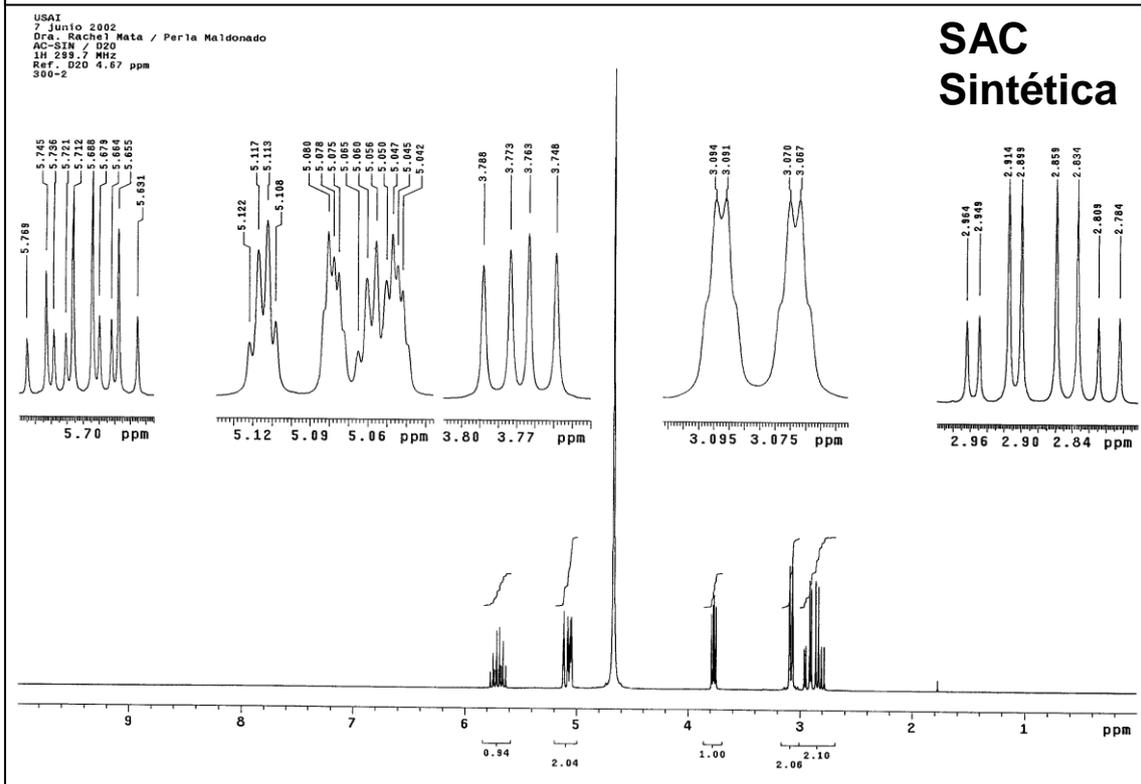
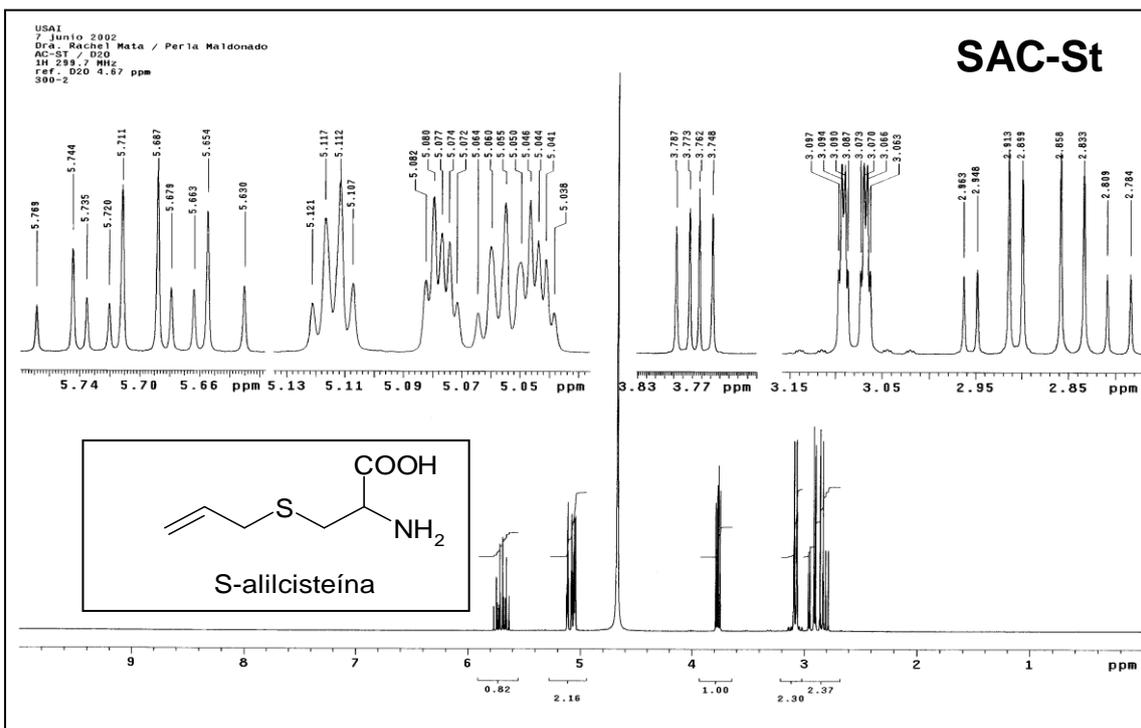
El punto de fusión del compuesto obtenido por síntesis química fue de 217°C, el cual se comparó con el punto de fusión del compuesto empleado como estándar y que fue de 222°C. El rendimiento de la reacción fue de 75.2%.

En la tabla 4 se observa que los desplazamientos del derivado sintético, son idénticos a los del compuesto empleado como estándar.

Tabla 4. Desplazamientos de RMN¹H del estándar de SAC y del compuesto obtenido por síntesis química¹.

Posición	δ_H Estándar	δ_H Derivado sintético
H ₂	3.8	3.8
H _{3a}	2.9	2.9
H _{3b}	2.8	2.8
H _{5a}	3.1	3.1
H _{5b}	3.1	3.1
H ₆	5.7	5.7
H _{7a}	5.1	5.1
H _{7b}	5.1	5.1

Los espectros de RMN¹H del compuesto obtenido por síntesis química y del estándar (SAC-St), se muestran a continuación:





2. Déficit neurológico

Las pruebas conductuales evalúan el déficit neurológico causado por la oclusión de la arteria cerebral media.

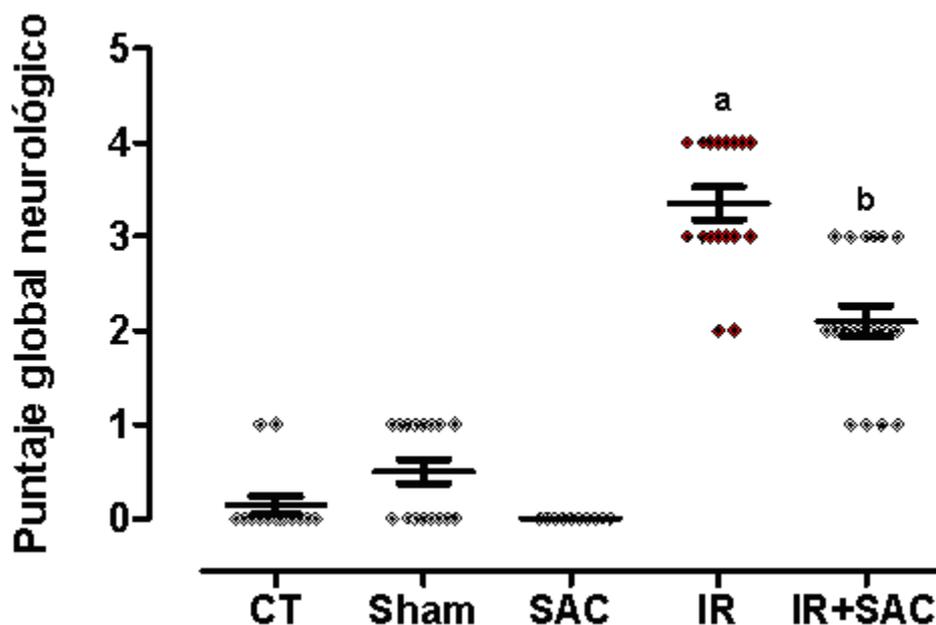


Figura 13. Evaluación conductual neurológica. CT, control; Sham, animal operado sin oclusión arterial; SAC, control con SAC; IR, 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión. La dosis de SAC fue de 100 mg/Kg de peso administrada cada 24 h durante 5 días previos de la oclusión. Los valores se expresan como la media + EEM. ^aP<0.001 vs. CT, Sham y SAC; ^bP<0.001 vs. CT, Sham, SAC e IR.

Los resultados muestran que los animales de los grupos CT, Sham y SAC no presentaron alteraciones conductuales, mientras que el grupo IR muestra un déficit neurológico grave causado por la oclusión del flujo sanguíneo y la reperfusión pues ambos eventos conducen a procesos como excitotoxicidad, estrés oxidante e inflamación, los cuales provocan daño y/o muerte celular [Jefayri *et al.*, 2000; Dalsing *et al.*, 1983; Lakhan *et al.*, 2009].

El grupo IR+SAC muestra un menor puntaje con respecto al grupo IR, mostrando que el mayor número de animales se mantiene por debajo de la media (Figura 13).



Hay reportes que sugieren que el uso de antioxidantes ayuda a prevenir el déficit neuro-conductual [Yousuf *et al.*, 2007; Shuaib *et al.*, 2007]. Por lo tanto, en éste estudio la disminución del puntaje global neurológico se le puede atribuir a la capacidad antioxidante de la SAC [Kim *et al.*, 2001; Ide & Lau, 2001], ya que al evitar el daño causado por el estrés oxidante se impide que las células que están en la zona de penumbra progresen a apoptosis, previniendo una exacerbación del daño neuro-conductual.

3. Histología

Durante la isquemia focal, las células del núcleo isquémico mueren en pocos minutos y se forma un área necrótica evidente [Suresh *et al.*, 2007]. Sin embargo, las neuronas de la penumbra isquémica muestran alteraciones de carácter funcional ya que aun conservan una mínima actividad metabólica; esto hace que preserven su actividad estructural durante más tiempo y sigan un patrón de muerte por apoptosis caracterizada por: condensación de la cromatina, fragmentación internucleosomal del ADN, perdida del volumen celular, mantenimiento de la integridad de la membrana celular hasta fases tardías y activación de las caspasas [Suresh *et al.*, 2007]. Por ello, es importante instaurar a tiempo un tratamiento adecuado y de esta forma evitar que mueran las células de la zona de penumbra [Back, 1998; Pulsinelli, 1992].

El conteo de las células neuronales teñidas con hematoxilina-eosina se realizó en la zona de penumbra del estriado izquierdo y evidenció que los animales de los grupos CT, SAC y Sham tuvieron un porcentaje de células dañadas del 6%, 10% y 3%, respectivamente (Figura 14B). En el grupo IR la mayoría de las células presentan picnosis nucleosomática, kariorexis y edema intersticial en el neuropilo (Figura 14A) lo que corresponde a un porcentaje de células



dañadas de 82% (Figura 14B). En el grupo IR+SAC, se observa una disminución significativa del daño morfológico mostrando sólo algunas células dañadas y un escaso edema intersticial (Figura 14A) con un porcentaje de células dañadas de 22% (Figura 14B). La protección conductual esta asociada al menos en parte al menor daño que se observa en el análisis histológico.

La protección observada en el grupo IR+SAC se puede justificar mediante la evidencia de que la SAC mejora potencialmente el daño inducido por la isquemia y la reperfusión en ratas, esto debido a sus propiedades antioxidantes, pues es capaz atrapar ERO como el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 y el OH^{\bullet} [Kim *et al.*, 2001; Ide & Lau, 2001; Medina-Campos *et al.*, 2007]. También reduce el edema mediante un mecanismo que parece inhibir la peroxidación lipídica previniendo el daño [Numagami & Ohnishi, 2001] y regulando la producción del óxido nítrico ($^{\bullet}ON$) contribuyendo a su efecto anti-inflamatorio [Atif *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2001].

Así mismo, se ha reportado su capacidad de conferir un estado de protección ante retos oxidantes mediante la inducción del factor de transcripción Nrf2 [Kalayarasan *et al.*, 2008].

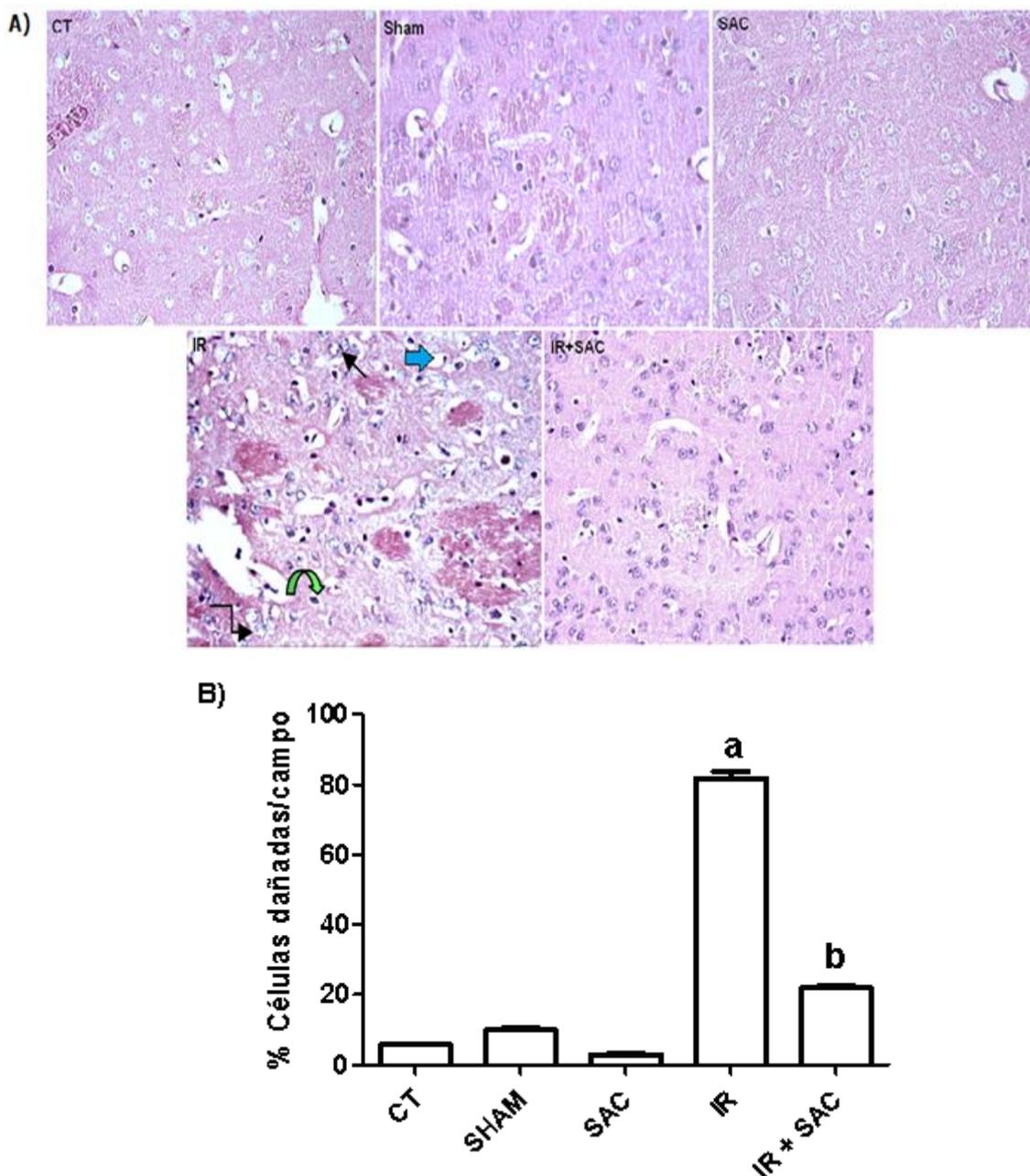


Figura 14. Efecto de la S-allyl cisteína (SAC) sobre las alteraciones morfológicas inducidas por 1 h de isquemia y 24 h de perfusión (IR). A) Fotografía representativa por microscopía de luz de cada grupo. En los grupos CT, Sham y SAC, las células presentan un aspecto normal; el grupo sometido a IR muestra edema en el neuropilo () picnosis nucleosomática (), kariorexis () y células alteradas (); en el grupo IR+SAC el daño disminuye significativamente. B) Cuantificación de las células dañadas por campo. Los resultados se expresan como la media + EEM (n=4). ^aP<0.001 vs. CT, Sham y SAC; ^bP<0.001 vs. CT e IR.

Se ha reportado que inhibidores de la lipoperoxidación y atrapadores de ERO y ERN exhiben un efecto neuroprotector contra el daño cerebral inducido por la isquemia/reperfusión [Young *et al.*,



1988; Floyd & Carney, 1992]. De esta forma la SAC, al ser un poderoso atrapador de ERO, inhibidor de la lipoperoxidación mediada por ERO y de la muerte celular en un modelo de isquemia cerebral [Numagami & Ohnishi, 2001] constituye un potente agente neuroprotector y podría ser un atractivo agente terapéutico para mejorar la calidad de vida del paciente y atenuar las secuelas de un paciente que ha sufrido un infarto cerebral.

4. Área de infarto

Durante la isquemia focal cerebral la duración de la oclusión del flujo sanguíneo y la reperfusión juegan un papel vital en la magnitud del daño [Li *et al.*, 2000].

Para cuantificar el área de infarto se utilizó la tinción con 2,3,5-trifeniltetrazolio, el cual es un marcador de viabilidad celular que al ser reducido a formazán, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa, da la coloración roja característica al tejido; mientras que, la porción infartada no se tiñe debido a que las células han muerto. Los resultados muestran que el pretratamiento con SAC (100 mg/Kg durante 5 días) protege contra el daño inducido por isquemia/reperfusión observándose un área significativamente menor en comparación con el grupo IR (Figura 15 A). El porcentaje del área infartada (calculada para las rebanadas del cerebro donde se observa zona de infarto) fue de 56% para el grupo de IR y de 20% para el grupo IR+SAC, mostrando una reducción del 35% (Figura 15B).

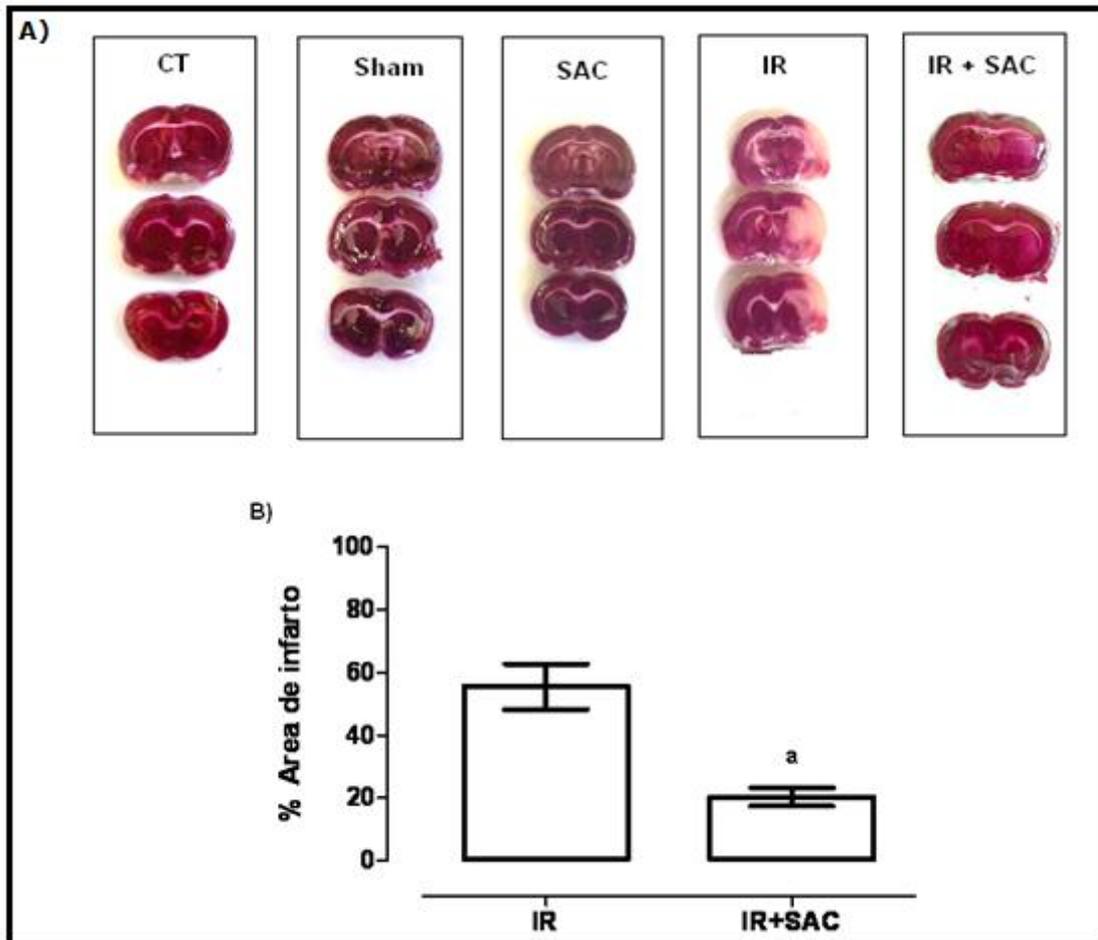


Figura 15. Reducción del área de infarto en el modelo de oclusión arterial cerebral media en ratas tratadas con SAC (100 mg/Kg, 5 días). El área de infarto se determinó con la tinción de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). A) Imágenes representativas de cada grupo. El tratamiento con SAC (IR+SAC) previno la aparición del área de infarto inducida por la isquemia cerebral (IR). B) Análisis cuantitativo del área de infarto en el grupo de IR y el grupo tratado con IR+SAC. Los valores se muestran como la media + EEM (n=4). ^a P < 0.003 vs. IR.

Estos resultados apoyan lo encontrado en la histología y lo reportado en la literatura acerca de que la SAC disminuye la disfunción mitocondrial (debido a que inhibe la lipoperoxidación y que atrapa ERO) inducida en la isquemia cerebral, previniendo de esta forma la aparición del área de infarto [Atif *et al.*, 2009].



5. Determinación del nivel de ARNm del factor de transcripción Nrf2

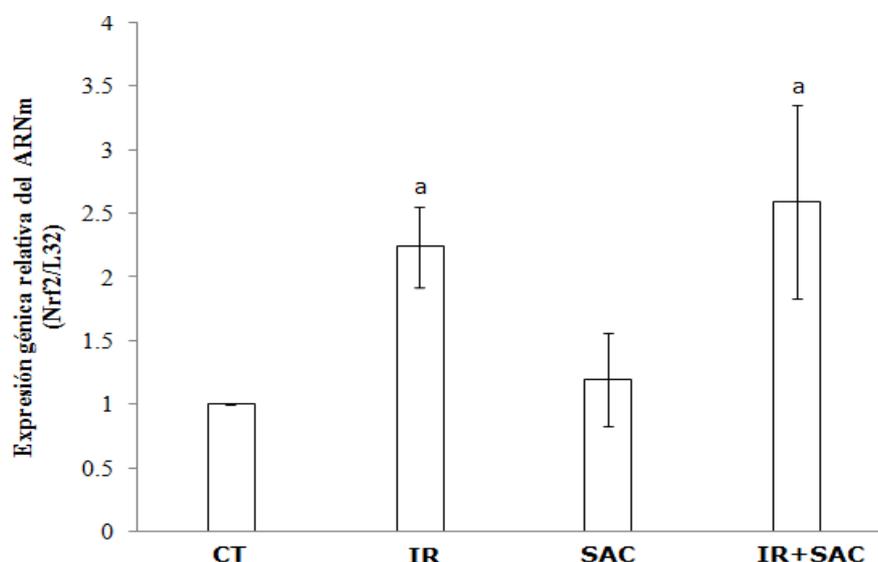


Figura 16. Expresión génica relativa del factor de transcripción Nrf2 en corteza en los diferentes grupos. CT; control; IR, 1h de isquemia 3h de reperusión; SAC; control con SAC 100 mg/kg durante 5 días. Los datos se muestran como la media \pm DE. ^aP<0.05 vs. CT.

En la figura 16 se observa una mayor expresión del ARNm del factor Nrf2 en los grupos IR e IR+SAC similar a lo que ya se ha reportado [Lakhan *et al.*, 2009; Surh *et al.*, 2008; Leonard *et al.*, 2006 & Shih *et al.*, 2005]; ya que en condiciones de estrés oxidante (como ocurre en la isquemia/reperusión) se modifican las interacciones entre el complejo Keap1-Nrf2, provocando la fosforilación de Nrf2 y su translocación al núcleo [Lakhan *et al.*, 2009]. Por otra parte, aunque se observa una ligera tendencia a que la SAC aumente el nivel del ARNm del factor Nrf2 en corteza, 3 h después del inicio de la reperusión, este efecto no es estadísticamente significativo.

Aunque el efecto de la SAC sobre el mensajero aún no se ha estudiado, se esperaba que el nivel de expresión del mensajero fuera mayor con el tratamiento con SAC porque el ARNm del Nrf2 también es regulado por ARE. No obstante, proponemos que debe realizarse un curso temporal para descartar si efectivamente la SAC no tiene



efecto sobre la expresión del mensajero del Nrf2, ya que los animales se sacrificaron a las 3 h del inicio de la reperfusión.

Por otro lado, es posible que el mecanismo de acción de la SAC este asociado con la activación del factor como ocurre con otros inductores como es el caso del sulforafano, el cual posee la particularidad química de interactuar con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de Keap1 ya sea por oxidación o alquilación, siendo esta la vía por la que el sulforafano induce la liberación del Nrf2 del complejo Keap1-Nrf2 y la consecuente transcripción de genes antioxidantes de las enzimas de fase II [Dinkova-Kostova *et al.*, 2001]

Sin embargo, ya se ha reportado que la SAC es capaz de activar al factor Nrf2 en hígado [Kalayarasan *et al.*, 2008] y por lo tanto la activación de varios genes para generar un estado de protección.



VII. CONCLUSIONES

1. La administración previa de la S-alil cisteína, protege contra el daño ocasionado por 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión, ya que reduce las alteraciones morfológicas, el área de infarto y el déficit neurológico.
2. El efecto protector de la SAC podría estar asociado a su capacidad antioxidante y con su capacidad de inducir el factor de transcripción Nrf2, que induce enzimas de fase II generando un estado de protección ante retos oxidantes, aunque esto aun debe ser demostrado.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Determinar la expresión génica del factor de transcripción Nrf2 a tiempos mayores (elaboración de un temporal).
2. Evaluar la activación de la proteína del factor Nrf2.
3. Determinar que enzimas de fase II están involucradas en la generación del estado de protección en el modelo utilizado.



IX. REFERENCIAS

Aguado JM, Agustí A, Aguilar JL. Medicina Interna 13^a Ed. España: Mosby-Doyma; 1996 [Capítulo 28].

Alacaraz-Zubeldia M, Rios CC. Isquemia cerebral. Temas selectos de neurociencias III. UAM. 2004: 1-11.

Atif F, Yousuf S, Kumar AS. S-Allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res* 2009; 1265: 128-137.

Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra-revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 621-638.

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 2003; 371: 887-895.

Beckman KB, Ames BN. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Am Physiol Soc* 1998; 78: 547-581.

Benov L. How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* 2001; 217: 33-36.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49: 3-8.

Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001; 131: 1010S-1015S.

Candelario-Jalil E. Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: new experimental evidences. *Pharmacol Res* 2008; 57: 266-273.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educ Quím* 2005; 17: 114-123.

Castillo C, Benedito JL, López-Alonso M, Miranda M, Hernández J. Importance of oxidative stress in cattle: its relationship with the physiological condition (pregnancy and parturition) and nutrition. *Arch Med Vet* 2001; 33: 5-20.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 309-316.



Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 2–14.

Chang-Kai Y, Fan-Dian Z. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 5: 61-69.

Chavko M, Auker CR, McCarron RM. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide* 2003; 9: 18-23.

Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair S. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1578–90.

Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates hemeoxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 993–1000.

Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Invest Clin* 2006; 58: 350-358.

Choi BM, Kim SM, Park TK, Li G, Hong S, Park H, Chung HT, Kim BR. Piperine protects cisplatin-induced apoptosis via heme oxygenase-1 induction in auditory cells. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 615–622.

Dalsing MC, Grosfeld JL, Shiffler MA, Vane DW, Hull M, Baehner RL, Weber TR. Superoxide dismutase: a cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res* 1983; 34: 589-596.

Díez-Tejedor E, Del Brutto OH, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol* 2001; 33: 455-464.

Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talay P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3404-3409.

Floyd, RA, Carney, JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32: S22–S27.

Franco R, Cidlowski J. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1303–1314.



Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 13-18.

Garg R, Gupta S, Maru G. Dietary curcumin modulates transcriptional regulator(s) of phase I and phase II enzymes in benzo[a]pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1022-1032.

Ghadge GD, Lee JP, Binodokas VP, Jordan J, Ma L, Miller RJ, Roos RP. Mutant superoxide dismutase-1- linked familial amyotrophic lateral sclerosis: molecular mechanisms of neuronal death and protection. *J Neurosci* 1997; 17: 8756-8766.

Gong P, Hu B, Cederbaum AI. Diallylsulfide induces hemoxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys* 2004; 432: 252-260.

Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 133-140.

Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed, Clarendon Press, Oxford, United Kingdom 1999.

Herrera-Mundo N, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A, León-Aparicio D, Maldonado PD, Antioxidant effect of S-allylcysteine, a garlic compound, in several experimental disease models. In: Pro-Oxidant Reactions: Physiological and Pathological Implications. Díaz-Muñoz and Santamaría A (eds). *Research Signpost*. Kerala. 2009: 67-84.

Hong F, Freeman ML, Liebler DC. Identification of sensor cysteines in Human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 1917-1926.

Ide N, Lau BH. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kB activation. *J Nutr* 2001; 131: 1020S-1026S.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Hombres y mujeres 2010.

Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int*. 2000; 85: 1007-1013.

Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of



oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 61-69.

Joung EJ, Li MH, Lee HG, Somparn N, Jung YS, Na HK, Kim SH, Cha NY, Surh YJ. Capsaicin induces heme oxygenase-1 expression in HepG2 cells via activation of PI3K-Nrf2 signaling: NAD(P)H:quinone oxidoreductase as a potential target. *Antioxid RedoxSignal* 2007; 9: 2087-2098.

Kalayarasan S, Sriram N, Sureshkumar A, Sudhandiran G. 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. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 908-919.

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

Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration. *J Clin Invest* 2003; 111: 785-793.

Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: L478-L488.

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

Lakhan SE, Kitchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 2009; 7: 97-108.

Latchaw RE, Alberts MJ, Lev MH, Connors JJ, Harbaugh RE, Higashida RT. Recommendations for imaging of acute ischemic stroke: a scientific statement from the American Heart Association. *Stroke* 2009; 40: 3646-3678.

Lau BH. Suppression of LDL oxidation by garlic. *J Nutr* 2001; 131: 985S-988S.



Lawson LD, Wang ZJ, Hughes, BG. γ -Glutamyl-S-alkyl-cysteines in garlic and other *Allium* spp.: precursors of AGE-dependent *trans*-1-propenil. *J Nat Prod* 1991; 54: 436-444.

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Wai KY, Johnson JA Jeffrey A. Identification of the NF-E2-related Factor-2-dependent Genes Conferring Protection against Oxidative Stress in Primary Cortical Astrocytes Using Oligonucleotide Microarray Analysis. *J Biol Chem* 2003; 278: 12029-12038.

Leonard MO, Kieran NE, Howell K, Burne MJ, Varadajaran R, Dhakshinamoorthy S, Porter AG, O'Farrelly C, Rabb H, Porter CT. Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2006; 20: 2624-2626.

Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 871-890.

Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence of the stimulatory effect of resveratrol on Ca-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 1035-1045.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.

López LM. El ajo: propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM*. 2007; 26: 78-81.

Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, PedrazaChaverri J. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 317-324.

Margaill I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 429-443.

Martin D, Rojo AI, Salinas M, Dias R, Gallardo G, Alam J. Regulation of hemeoxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 2004; 279: 8919-8929.

Mates JM, Sanchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; 15: D339-D345.



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

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.

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.

Na HK, Kim EH, Jung JH, Lee HH, Hyun JW, Surh YJ. (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476: 171-177.

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

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009; 284: 13291-13295.

Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Zagrean AM, Zagrean L. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion—a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 163-170.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-1312.

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.

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.

Phillis JW. A "radical" review of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994; 42: 441-448.



Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet* 1992; 339: 533-536.

Preston E, Webster J. A two-hours window for hypothermic modulation of early events that impact delayed opening of the rat blood-brain barrier after ischemia. *Acta Neuropathol* 2004; 108: 406-412.

Rang HP, Dale MM. Farmacología 6ª Ed. España: Elsevier; 2009 [capítulo 35].

Sayre L, Perry G, Smith M: Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 172-188.

Sies H: Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:916-921.

Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27812-27817.

Shih AY, Li P, Murphy TH. A small molecule inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J Neurosci* 2005, 25: 10321-10335.

Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U, SAINT II Trial Investigators. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 375: 562-571.

Suresh LM, Namratta M, Ram R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* 2007; 54: 34-66.

Surh YJ, Kumar KJ, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 2008; 74: 1526-1539.

Tanovic´c A, Alfaro V. Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. *Rev Neurol* 2006; 42: 607-616.

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the



chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002; 62: 5196–5203.

Torregrosa G, Salom JB, Jover-Menguar T, Alborch E. Fisiopatología básica de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En: Fisiopatología de la isquemia cerebral. Montaner J (Ed), Marge Medica Books, Barcelona, España: 2007: 14-20.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344.

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.

Whitin JC, Tham DM, Bhamre S, Ornt DB, Scandling JD, Tune BM, Salvatierra O, Avissar N, Cohen HJ. Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renal proximal tubule function. *Mol Genet Metab* 1998; 65: 238-245.

Wu CC, Hsu MC, Hsieh CW, Lin JB, Lai PH, Wung BS. Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci* 2006; 78: 2889–2897.

Yeh YY, Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J Nutr* 2001; 131:989S-993S

Young W, Wojak JC, DeCrescito V. 21-Aminosteroid reduces ion shifts and edema in the rat middle cerebral artery occlusion model of regional ischemia. *Stroke* 1988; 19: 1013–1019.

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.