



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL DIALIL TRISULFURO SOBRE LOS CAMBIOS
CONDUCTUALES, BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS
QUE SE INDUCEN EN UN MODELO DE ISQUEMIA
CEREBRAL EN RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

CARLOS ALFREDO SILVA ISLAS



MÉXICO, D.F.

2012



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: Dr. José Pedraza Chaverri**

VOCAL: **Profesor: Dra. María Elena Ibarra Rubio**

SECRETARIO: **Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

1er SUPLENTE: **Profesor: Dr. Euclides Ávila Chávez**

2do SUPLENTE: **Profesor: Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig**

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA. "MANUEL VELASCO SUÁREZ"

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez.

SUSTENTANTE:

Carlos Alfredo Silva Islas.

AGRADECIMIENTOS:

SE AGRADECE AL **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)** POR LA BECA OTORGADA AL ALUMNO (**NUMERO DE BECARIO 16221**) DURANTE EL PERIODO DE ENERO 2011 A SEPTIEMBRE 2011.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR UN DONATIVO DE **CONACYT No. 103527**.

SE AGRADECE AL **COLEGIO DE PROFESORES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM Y A LA SECCIÓN 024 DEL AAPAUNAM** POR LA CÁTEDRA **“ANGELINA QUINTERO”** OTORGADA AL ALUMNO DURANTE EL PERIODO DE SEPTIEMBRE 2011 A FEBRERO 2012.

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 AL ALUMNO DURANTE EL PERIODO DE FEBRERO 2012 A JULIO 2012.

Agradecimientos:

A mis padres Lucia y Valentín porque a pesar de todas las dificultades me dieron la maravillosa oportunidad de concluir una licenciatura, por el gran apoyo incondicional y esfuerzo que hicieron para sacarme adelante. Por todo el cariño y consejos que me proporcionaron, por haber estado presentes en todas las dificultades y cuando más los necesite, porque a pesar de todos los errores cometidos siempre tuve su apoyo. Este trabajo es dedicado a ustedes con todo cariño como una pequeña recompensa de todo el esfuerzo que han tenido hacia mi, muchísimas gracias. Los quiero mucho.

A mis hermanos Pepe, Moy, Israel, Mariela y Angélica por su cariño, apoyo y comprensión, por todos los consejos, por estar siempre presentes en las buenas y en las malas, porque sin su apoyo mi formación no hubiese sido posible. A todos mis tíos y tías que también me brindaron un gran apoyo. A mis primos por hacer mis fines de semana más tranquilos, después de semanas pesadas de clases.

A mis amigos Manolo S., Analí, Aglae, Ivonne, Lalo, Piña, Cynthia, Roy, Ely, Paulina por su gran amistad, por todo el apoyo que me han brindado, por no dejarme caer en momentos de dificultad y hacerme la vida en la facultad mas ligera. A mis compañeros y amigos de departamento Ely, Carlos, Toño, Josué, Luis por hacer amena la estancia en el departamento.

A la Dra. Perla Maldonado por todas las enseñanzas y los consejos, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haberme tenido la paciencia durante la elaboración de este trabajo, muchas gracia Dra.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Ricardo, Ana, Frida, Susana, Silvia, Cristy, Felipe, Pepo, Ceci, Rudolf, Anahi, Ana Lilia, Yazek, Jorge por haber tenido la paciencia de enseñarme las técnicas, por su amistad y por haber hecho una estancia muy agradable en el laboratorio. A las Doctoras Ma. Elena, Irma, Penélope por el apoyo brindado.

A Norma Castellanos y María Alejandra Morineli por su paciencia, consejos y conocimientos que me proporcionaron, a todos los profesores de la faculta que me formaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por abrirme las puertas y haberme formado. Orgullosamente UNAM, Facultad de Química.

Por mi raza hablara el espíritu.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.	1
II.	RESUMEN.	2
III.	INTRODUCCIÓN.	4
	1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	4
	2. ISQUEMIA CEREBRAL.	6
	2.1. Zona de infarto, zona de penumbra y circulación cerebral.	7
	2.2. Síntomas y factores de riesgo predisponentes en isquemia cerebral.	11
	2.3. Fisiopatología de la isquemia cerebral.	12
	3. EXCITOTOXICIDAD.	15
	3.1. Excitotoxicidad en la isquemia cerebral.	18
	4. ESTRÉS OXIDANTE.	20
	4.1. Estrés oxidante en la isquemia cerebral.	22
	5. DAÑO POR REPERFUSIÓN.	26
	6. DAÑO A LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.	27
	7. EDEMA.	29
	8. INFLAMACIÓN.	31
	9. MUERTE CELULAR EN ISQUEMIA CEREBRAL.	32
	10. DEFENSAS EN EL CEREBRO ANTE EL ESTRÉS OXIDANTE PRODUCIDO POR LA ISQUEMIA CEREBRAL	35
	11. VÍA KEAP 1/Nrf2/ARE.	42
	12. DIALIL TRISULFURO.	46
IV.	JUSTIFICACIÓN.	50
V.	HIPÓTESIS.	52
VI.	OBJETIVOS.	53
	1. Objetivo general.	53
	2. Objetivos particulares.	53
VII.	METODOLOGÍA.	54
	1. Reactivos.	54
	2. Animales.	54

3. Diseño experimental.	54
4. Inducción de la isquemia cerebral.	58
5. Conducta.	58
6. Histología.	59
7. Inmunohistoquímica.	60
8. Preparación de extractos nucleares.	61
9. Activación de factor de transcripción Nrf2.	62
10. Actividad enzimática.	63
10.1. Preparación de los homogenados	63
10.2. Cuantificación de proteína por el método de Lowry	63
10.3. Actividad de catalasa.	64
10.4. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).	64
11. Análisis estadístico.	64
VIII. RESULTADOS.	65
1. Determinación del esquema de dosificación.	65
2. Conducta.	68
3. Histología	69
3.1. Histología en estriado	69
3.2. Histología en corteza.	71
4. Activación del factor de transcripción Nrf2.	73
5. Niveles de enzimas de fase 2.	74
6. Actividad enzimática.	87
IX. DISCUSIÓN.	90
X. CONCLUSIÓN.	97
XI. PERSPECTIVAS.	98
XII. BIBLIOGRAFÍA.	99

I. ABREVIATURAS.

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete.
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico.
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo.
AMPA	2-amino-3-(3-hidroxil-5-metilisoxazol-4-il)propionato.
ARE	Elemento de respuesta antioxidante.
CAT	Catalasa.
Cu-ZnSOD	Superóxido dismutasa de cobre-zinc.
DATS	Dialil trisulfuro.
ERN	Especies reactivas de nitrógeno.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
GCL	γ -Glutamin cisteín ligasa.
GPx	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
GST	Glutación S transferasa.
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno.
HClO	Ácido hipocloroso.
IR	Isquemia-reperfusión.
Keap1	Proteína asociada-ECH kelch-like.
MnSOD	Superoxido dismutasa de manganeso.
NMDAr	Receptor N-metil-D-aspartato.
$\text{NO}_2\cdot$	Dióxido de nitrógeno.
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2.
ONOO^-	Peroxinitrito.
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical anión superóxido.
PKC	Proteína cinasa c.
SON	Sintasa de óxido nítrico.
TrxR	Tiorredoxina reductasa.

II. RESUMEN.

La enfermedad cerebro vascular es un problema grave de salud en México, debido a que representa la quinta causa de muerte y la primera de discapacidad en adultos mayores. La de tipo isquémico es la más frecuente (85% de los casos) y ocurre por la disminución de la perfusión hacia el tejido cerebral, provocando una serie de eventos conocidos como cascada isquémica que finalmente llevan a la muerte del tejido cerebral; siendo el estrés oxidante uno de los principales mecanismos involucrados. En respuesta al estrés, una de las defensas que tiene el cerebro es la activación de la vía proteína asociada (KEAP1)/Factor relacionado (Nrf2)/elementos de respuesta (ARE); lo cual se puede lograr con moléculas como el dialil trisulfuro (DATS), que induce un aumento en las defensas antioxidantes celulares mediante la producción de enzimas de fase II (conjunto de enzimas y proteínas detoxificadoras y antioxidantes que pueden responder ante un estímulo oxidante). Debido a esto, el DATS podría representar una terapia prometedora para los pacientes que han sufrido de un infarto cerebral, ya que hasta ahora no existe una terapia eficaz que disminuya las secuelas que se presentan en estos pacientes. El DATS está presente en el aceite de ajo y su mecanismo de acción se ha asociado con propiedades como: 1) antioxidante directo, ya que atrapa diferentes especies reactivas de oxígeno; y 2) antioxidante indirecto, ya que es capaz de inducir la respuesta de fase II. En este trabajo se propone evaluar el efecto del DATS sobre el daño morfológico, conductual y bioquímico que se inducen en un modelo de isquemia cerebral en rata.

Se buscó la dosis de DATS que mostrara un efecto protector ante el daño morfológico inducido por las siguientes condiciones: A) 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión, B) 2 h de isquemia y 24 h de reperfusión y C) 1 h de isquemia y 7 días de reperfusión. Se evaluaron 3 esquemas profilácticos para A y B y 2 esquemas terapéuticos para C. La mayor protección se observó con los esquemas terapéuticos (1 dosis de 15 mg/Kg i.p. antes de la reperfusión y 4 dosis de 15 mg/Kg/24 h i.p. iniciando la primera administración antes de la reperfusión) y por ello éstos fueron los que se usaron para los demás experimentos.

Se observó que la lesión isquémica de 1 h y 7 días de reperusión aumenta el puntaje neurológico (marcador de daño) mientras que el tratamiento con DATS disminuyó dicho puntaje. Del mismo modo, el tratamiento con DATS disminuyó el daño morfológico producido por la isquemia-reperusión (IR) en el estriado y la corteza.

Por otro lado, la administración de 4 dosis de DATS aumentó la activación del factor Nrf2 en los grupos DATS e IR + 4 dosis de DATS. Consecuentemente, también se observó un incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa dependiente de Cu-Zn (Cu-ZnSOD), Superóxido dismutasa dependiente de Mn (MnSOD) en el estriado y la corteza, y de Glutación S transferasa (GST) en el estriado.

Finalmente, el tratamiento con DATS incrementó la actividad de catalasa (estriado) y glutación peroxidasa (corteza) en los grupos IR, IR + 1 dosis de DATS e IR + 4 dosis de DATS.

El DATS protege el tejido cerebral contra el daño morfológico y conductual provocado por la IR, generando una mayor protección el esquema de administración terapéutico, con 4 dosis de DATS (15 mg/Kg *i.p.*). Efecto que podría estar asociado con la capacidad del DATS de activar al factor Nrf2 e inducir la expresión de las enzimas Cu-ZnSOD, MnSOD y GST.

III. INTRODUCCIÓN.

1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.

La enfermedad cerebrovascular es un síndrome clínico (Tegos et al., 2000) causado por un trastorno circulatorio cerebral, en donde uno o varios vasos sanguíneos están afectados por un proceso patológico (Díez-Tejedor et al., 2001), alterándose transitoria o definitivamente, el funcionamiento de una o varias partes del encéfalo (Díez-Tejedor, 2006).

En países industrializados la enfermedad cerebrovascular representa la tercera causa de muerte (Candelario-Jalil, 2008; Margail et al., 2005; Tegos et al., 2000) y la primera de discapacidad industrial (Candelario-Jalil, 2008; Markus, 2011). En México, representa un grave problema de salud pública ya que es la quinta causa de muerte (Figura 1) y la primera de discapacidad en personas adultas. Tan solo en 2010, se reportaron 32306 muertes provocadas por esta enfermedad (INEGI, 2010).

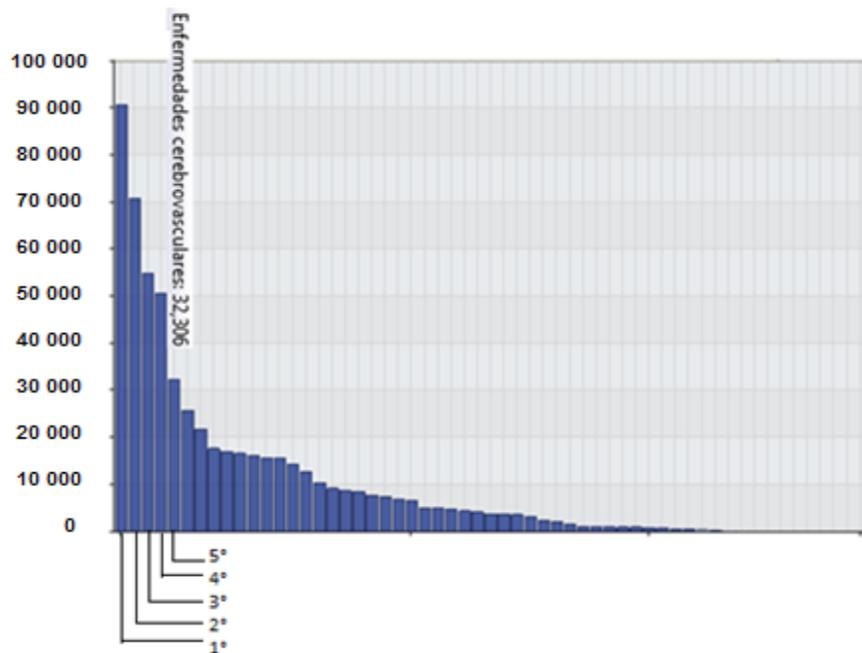


Figura 1. Las enfermedades cerebrovasculares ocupan la quinta causa de muerte en México, se ubican después de las enfermedades endocrinas y metabólicas (1°), enfermedades isquémicas del corazón (2°), enfermedades del aparato digestivo (3°) y enfermedades del aparato respiratorio (4°) (INEGI, 2010).

Además de ser un problema de salud, la enfermedad cerebrovascular también representa un problema económico en muchos países, ya que del 15 al 30% de los sobrevivientes, quedan permanentemente discapacitados, mientras que un 20% requiere cuidados institucionales (Lankhan et al., 2009). Por otra parte, se espera que conforme la población envejezca, la enfermedad cerebrovascular crecerá de forma proporcional, ya que el 70% de los casos ocurre en personas mayores de 65 años (Allen & Bayraktutan, 2008; Donnan et al., 2008; Lakhan et al., 2009).

Diversas patologías constituyen un factor de riesgo para la enfermedad cerebrovascular como: la aterosclerosis, las malformaciones arteriales, la dilatación aneurismática, la trombosis, el embolismo, la disminución de la perfusión y la ruptura de un vaso, entre otras (Kistler et al., 1991). La trombosis, el embolismo y la hemorragia son las causas más comunes (Donnan et al., 2008; Lakhan et al., 2009; Mitsios et al., 2006); por ello la enfermedad cerebrovascular se clasifica en isquémica y hemorrágica (Figura 2) con una prevalencia del 85% y 15%, respectivamente (Allen & Bayraktutan, 2008; Díez-Tejedor, 2006; Lakhan et al., 2009; Mergenthaler et al., 2004).

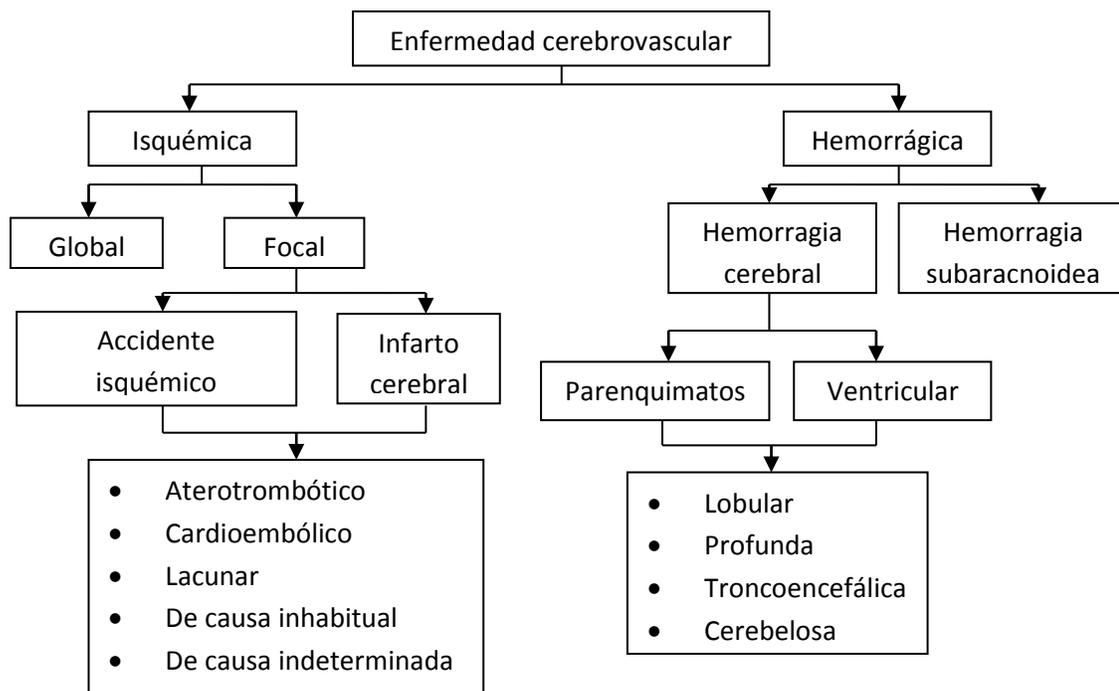


Figura 2. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular por parte de la Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares (Díez-Tejedor et al., 2001).

En este trabajo se estudia esta enfermedad dada la prevalencia de la enfermedad de tipo isquémico.

2. ISQUEMIA CEREBRAL.

La isquemia cerebral se caracteriza por la obstrucción o disminución del flujo sanguíneo al cerebro, ya sea transitoria o permanentemente (Dirnagl et al., 1999; Muralikrishna Adibhatla & Hatcher, 2006). Las principales causas están asociadas con mecanismos hemodinámicos, trombosis y embolismo (Dirnagl et al., 1999; Mitsios et al., 2006; Tegos et al., 2000); y de éstas, la trombosis es la de mayor incidencia (Allen & Bayraktutan, 2008).

Los mecanismos hemodinámicos producen isquemia cuando la perfusión global cerebral disminuye críticamente debido a una hipotensión arterial importante y el flujo colateral es insuficiente para compensarla (Díez-Tejedor et al., 2001). Por otro lado, la isquemia embólica ocurre cuando una parte de un coágulo se desprende y viaja por el torrente sanguíneo (émbolo) al cerebro, donde las grandes arterias se ramifican en vasos más pequeños. De esta forma el coágulo de sangre llega a un punto dónde ya no puede ir más lejos cortando el suministro de sangre (Allen & Bayraktutan, 2008). Finalmente, la isquemia provocada por trombosis, ocurre cuando un coágulo (trombo) bloquea el flujo sanguíneo a una parte del cerebro; puede formarse en una arteria afectada por aterosclerosis u otra lesión vascular (Díez-Tejedor et al., 2001). Por lo regular, la isquemia trombótica ocurre en la noche o en la madrugada (Allen & Bayraktutan, 2008).

Además, la isquemia cerebral puede clasificarse según la región afectada en global y focal (Figura 3), y esta última suele dividirse de acuerdo al tiempo de duración en ataque isquémico transitorio e infarto cerebral (Díez-Tejedor, 2006).

Cuando el flujo sanguíneo se encuentra comprometido en todo el cerebro, se llama isquemia cerebral global, y es provocada principalmente por un paro cardíaco; en cambio, si solo se afecta una región del cerebro, se denomina isquemia cerebral focal y se produce principalmente por un bloqueo arterial

(Muralikrishna-Adibhatla & Hatcher, 2006; Rodrigo et al., 2005). Por otra parte, el ataque isquémico transitorio se define como un episodio disfuncional neurológico breve causado por isquemia cerebral focal o de retina, que dura de 2 a 15 min, con síntomas clínicos que generalmente duran menos de 1 h y sin evidencia de un infarto agudo (Lewandowski et al., 2008). Mientras que el infarto cerebral se produce cuando la isquemia es lo suficientemente prologada en el tiempo para producir un área de necrosis tisular. Se considera como tal cuando el déficit neurológico tiene una duración de 24 h o más; sin embargo, con duraciones menores, también se pueden producir lesiones de necrosis (Díez-Tejedor et al., 2001).

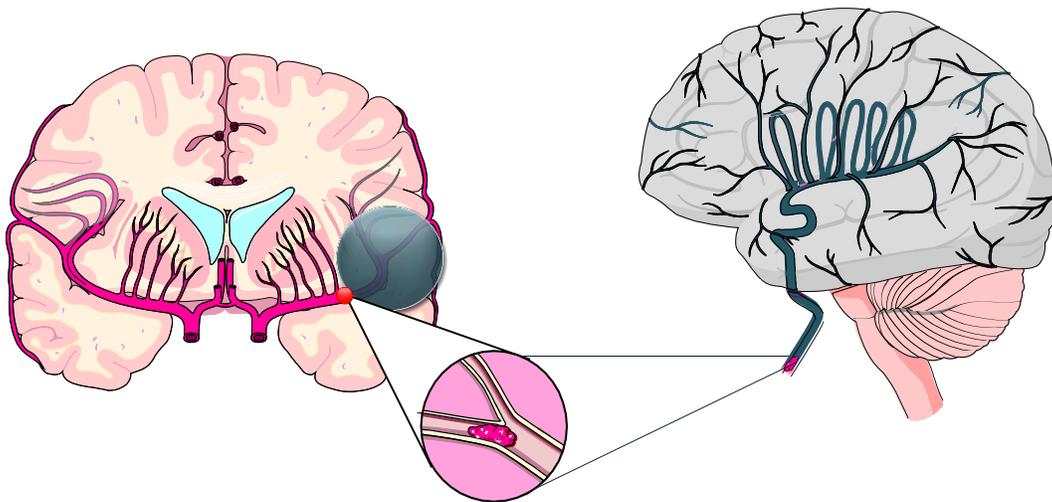


Figura 3. Isquemia cerebral focal y global. A la izquierda se representa la oclusión de la arteria cerebral media, lo cual genera una lesión isquémica focal. A la derecha se presenta la isquemia cerebral global, que se genera principalmente por paro cardíaco, aunque también se puede generar por la obstrucción de las arterias que llevan el flujo sanguíneo al cerebro, como las arterias carótidas y vertebrales.

2.1. Zona de infarto, zona de penumbra y circulación cerebral.

La irrigación sanguínea al cerebro está mediada por las dos arterias carótidas internas y la arteria o tronco basilar (Figura 4); y de estas la mayor parte de la perfusión es llevada por las arterias carótidas internas, ya que suministran alrededor del 40% cada una. Después de atravesar el seno cavernoso, la carótida interna se divide para formar las arterias cerebrales anteriores y media. Las

arterias cerebrales anteriores se unen entre sí para formar la arteria comunicante anterior cuyas ramas irrigan la cara media y la parte superior de la superficie lateral de los lóbulos frontales y parietales.

Por otra parte, las arterias cerebrales medias se distribuyen en casi la totalidad de la superficie lateral de los hemisferios. Finalmente, la arteria basilar se divide para formar las dos arterias cerebrales posteriores, que vascularizan los lóbulos temporales y occipitales.

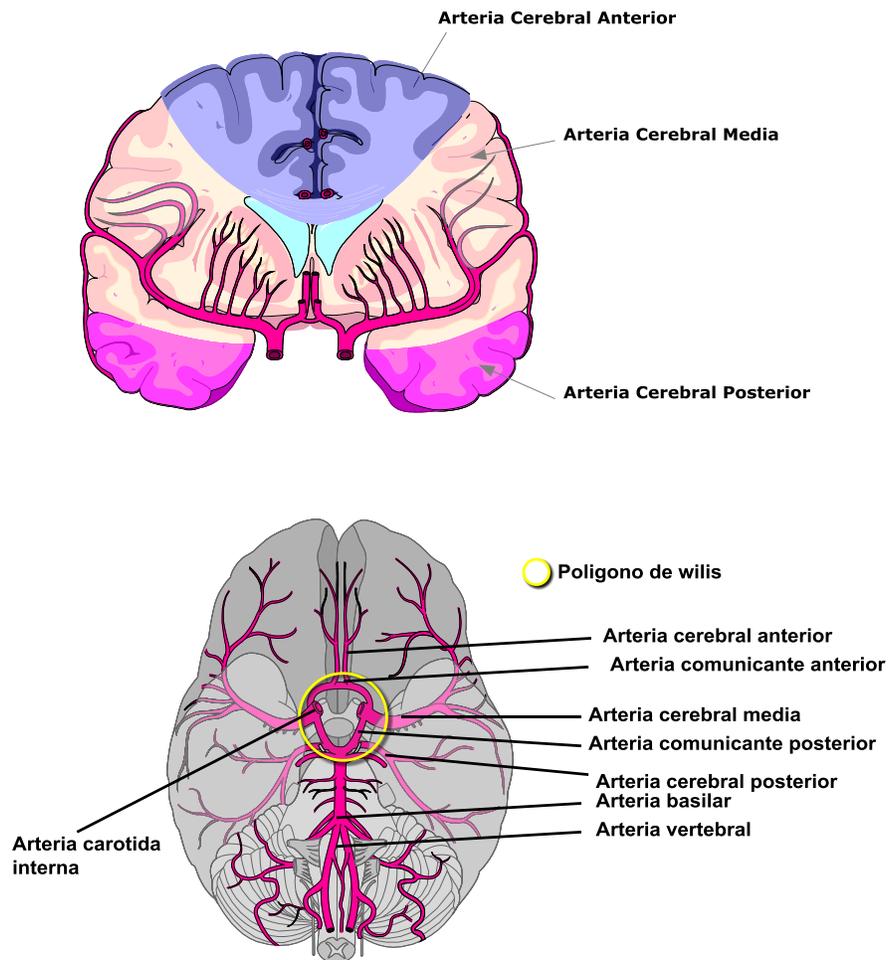


Figura 4. Irrigación sanguínea en el cerebro. En el panel superior se representan las zonas irrigadas por la arteria cerebral media, la cerebral posterior y anterior en un corte coronal. En el panel inferior se muestra la representación del polígono de Willis y la formación de las arterias que irrigan al cerebro.

Las dos arterias cerebrales posteriores se unen a la arteria carótida interna en el punto que ésta da origen a la cerebral media y anterior a través de las arterias comunicantes posteriores, creando de esta manera una conexión anastomótica entre las dos arterias vertebrales y las dos carótidas internas. Esta red de vasos sanguíneos colocados en la base del encéfalo, recibe el nombre de polígono de Willis y específicamente está formado por las dos arterias cerebrales anteriores (unidas por la arteria comunicante anterior), las arterias comunicantes posteriores y la arteria basilar (Fox, 2008; Sherwood, 2011; Tortora & Berrickson, 2006).

En condiciones fisiológicas el flujo sanguíneo cerebral es de alrededor de 50 a 60 mL/100g/min (Mehta et al., 2007; Mitsios et al., 2006). Es muy importante que se mantenga esta perfusión ya que el cerebro, para llevar un funcionamiento adecuado, requiere un aporte adecuado de sangre oxigenada y glucosa. La liberación de O₂ depende de dos variables, tal y como se describe en la ecuación de Fick: del porcentaje de volumen de flujo sanguíneo y de la cantidad de O₂ en las arterias. Una reducción en cualquiera de los dos parámetros afecta gravemente el funcionamiento cerebral (Rodrigo et al., 2005).

Gracias al tipo de flujo sanguíneo que tiene el cerebro, en un proceso de isquemia se pueden distinguir dos tipos de regiones, la zona de infarto y la zona de penumbra (Figura 5):

La zona de infarto es la región del cerebro en la cual, la mayoría de los elementos celulares están muertos (Sharp et al., 2004), debido a que esta región es la que circunda la arteria afectada y estas células dependen de la irrigación de dicho vaso. Al estar bloqueado, las células mueren por necrosis al no poder llevar a cabo sus funciones vitales.

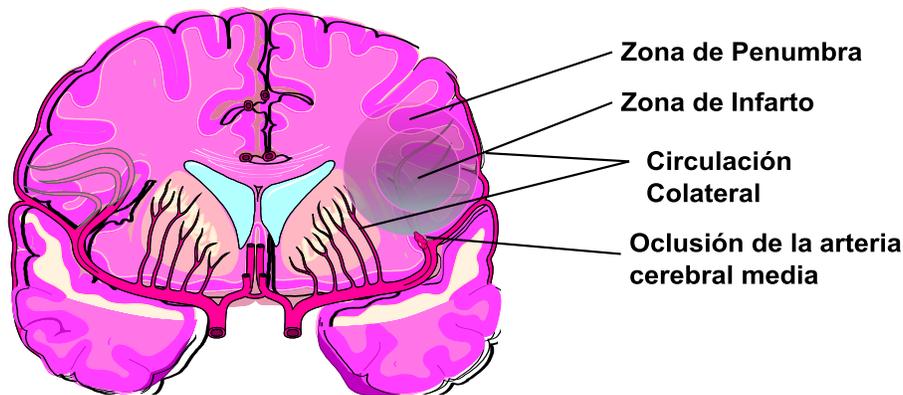


Figura 5. Isquemia cerebral focal. Al existir la oclusión de una arteria, el tejido que es irrigado por esta muere, generando una región de infarto. Del mismo modo, se genera una zona de penumbra, la cual es circundante a la región de infarto; esta región se mantiene viva gracias a la circulación colateral pero metabólicamente inactiva.

La zona de penumbra es una región de tejido cerebral poco perfundida que rodea a la zona de infarto. Tiene un suministro de sangre por debajo del umbral de viabilidad a largo plazo y debido a esto, las neuronas de esta región son susceptibles a ser rescatadas. La terapia trombolítica se centra en restablecer la perfusión vascular para rescatar la zona de penumbra, antes de que ocurra un daño irreversible y que la región de penumbra se convierta en zona de infarto (Fraser, 2011).

En condiciones de isquemia, el flujo sanguíneo disminuye por debajo de 7 mL/100g/min en la zona de infarto, y en la zona de penumbra se encuentra alrededor de 7 a 17 mL/100 g/min (Mehta et al., 2007; Mitsios et al., 2006). Sin embargo, la circulación colateral juega un papel muy importante en la evolución de la enfermedad, ya que ocurre a través de la anastomosis entre las arterias carótidas y la circulación intracraneal (Markus, 2004).

2.2. Síntomas y factores de riesgo predisponentes en isquemia cerebral.

Son múltiples los factores de riesgo en la isquemia cerebral, éstos pueden ser clasificados en modificables y no modificables; sin embargo, gran parte de ellos (alrededor del 40%) son inexplicables y se atribuyen a factores genéticos predisponentes de la enfermedad (Donnan et al., 2008; Markus, 2004). Ejemplo de éstos últimos son mutaciones en el gen NOTCH3, HTRA1 y COL4A1, así como en el gen de la enzima convertidora de angiotensina, la protrombina, entre otros (Markus, 2011). La hipertensión, la diabetes mellitus, el fumar, la enfermedad coronaria del corazón, la fibrilación atrial, la hipertrofia ventricular izquierda, la homocisteína, etc., son algunos factores de riesgo modificables. Por otra parte, la edad, el sexo y la raza, son ejemplos de factores de riesgo no modificables (Allen & Bayraktutan, 2008).

Los síntomas y manifestaciones clínicas de la isquemia cerebral, dependerán de la localización y el tamaño de la lesión cerebral, lo que a su vez dependerá del territorio arterial afectado. Dentro de las principales manifestaciones clínicas se encuentran (Díez-Tejedor et al., 2001):

- Monoparesia (disminución de la sensibilidad en una extremidad del cuerpo).
- Hemiparesia (disminución de la sensibilidad en la mitad del cuerpo).
- Deterioro del habla o lenguaje.
- Agnosia (pérdida parcial o total de la facultad de reconocer objetos o personas).
- Defectos sensitivos parciales y totales.
- Hemihipoestesia (disminución parcial de la sensibilidad en alguna región del cuerpo).
- Paresia de la mirada contralateral a la lesión.
- Afasia (defecto o ausencia de la función del lenguaje).
- Debilidad del miembro contralateral a la lesión.
- Trastornos del comportamiento.

- Incontinencia urinaria.
- Náusea.
- Vómito.
- Disfagia (dificultad para deglutir).
- Vértigo.
- Dislexia. Trastorno en la capacidad para leer.

2.3. Fisiopatología de la isquemia cerebral.

El cerebro tiene un alto consumo de glucosa y O_2 y depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa como fuente de energía para mantener su viabilidad y función normal (Dirnagl et al., 2008; Moro et al., 2005). Cuando se interrumpe el flujo sanguíneo y con ello el aporte de glucosa y O_2 al cerebro o cierta región de él, se activan una serie de eventos conocidos como cascada isquémica, los cuales incluyen (Lakhan et al., 2009; Rodrigo et al., 2005):

- Agotamiento de las reservas intracelulares de ATP.
- Glicólisis anaerobia, acidosis láctica y despolarización de la membrana.
- Excitotoxicidad.
- Estrés oxidante.
- Entrada de Ca^{2+} , Na^+ y H_2O a las células, produciendo edema citotóxico.
- Activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , disfunción mitocondrial y producción de radicales libres.
- Inflamación.
- Activación del sistema inmune.
- Sobreexpresión de ciertos genes.
- Muerte celular.

Al no existir aporte de glucosa y O_2 , la producción de ATP se ve comprometida; las reservas se agotan y las células entran en un proceso de glicólisis anaerobia, produciendo un estado de acidosis láctica (Kato & Kogure, 1999) y alterándose de

este modo, los procesos dependientes de ATP. Primeramente, se altera la bomba de Na^+/K^+ generando un desbalance en el gradiente iónico a través de la membrana y causando un incremento en la concentración de K^+ extracelular, así como una entrada excesiva de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} . El incremento inicial de K^+ extracelular se propaga rápidamente llevando a una despolarización y a la reversión de los transportadores de aminoácidos. En esas condiciones los canales dependientes de voltaje y dependientes de Ca^{2+} se activan y provocan un incremento de Ca^{2+} intracelular (Figura 6). El incremento de los aminoácidos excitadores, principalmente glutamato, se debe a la reversión de los transportadores de aminoácidos, a la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Moro et al., 2005) y a la inhibición de la recaptura presináptica de glutamato (Dirnagl et al., 1999).

El glutamato activa los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) y metabotrópicos, induciendo en las células a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. El desbalance iónico en las neuronas provoca una acumulación de H_2O intracelular produciendo un hinchamiento celular y edema citotóxico. Adicionalmente, el incremento de Ca^{2+} , causa una sobrecarga de este ión en la mitocondria, inhibiendo la producción de ATP (Moro et al., 2005).

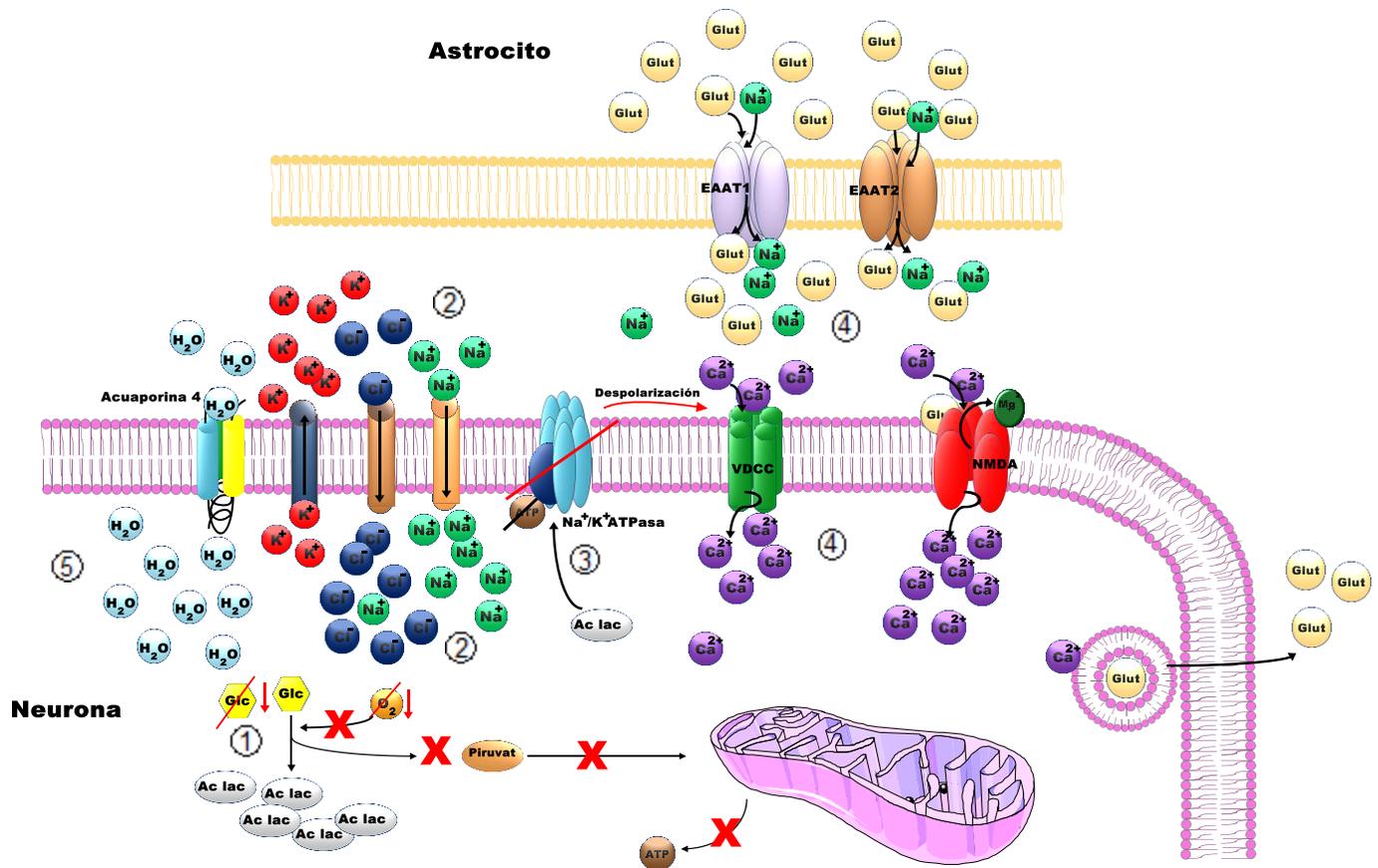


Figura 6. Fisiopatología de la isquemia cerebral. La disminución del aporte de glucosa y O₂ al tejido cerebral desencadena una serie de eventos bioquímicos, tales como ① glucólisis anaerobia, aumento de la producción de ácido láctico, ② desbalance iónico, ③ falla en los procesos dependientes de ATP, ④ aumento en la concentración extracelular de glutamato, excitotoxicidad y ⑤ edema citotóxico. Ac lac: ácido láctico; Glc: glucosa; Glut: glutamato; EAAT1: transportador dependiente de Na⁺; EAAT2: transportador dependiente de Na⁺; VDCC: canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje; NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato.

La formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN), es un proceso secundario al fenómeno excitotóxico y ocurre por mecanismos tales como disfunción mitocondrial, incremento en la concentración de Ca²⁺ y daño por reperusión e inflamación (Lakhan et al., 2009). Las especies oxidantes y los radicales libres, gracias a su gran reactividad, provocan daño en los lípidos, el DNA y las proteínas, llevando a la muerte neuronal; además, contribuyen con la ruptura de la barrera hematoencefálica y el edema citotóxico (Moro et al., 2005). Las principales especies implicadas son el radical anión superóxido (O₂⁻), el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el óxido nítrico ($\cdot NO$) y el peroxinitrito ($ONOO\cdot$) (Mergenthaler et al., 2004).

También durante la lesión isquémica, algunos mediadores inflamatorios se elevan como citocinas y moléculas de adhesión, lo que promueve la infiltración de leucocitos y la activación de la microglía (Mergenthaler et al., 2004), que contribuyen también a la muerte neuronal.

3. EXCITOTOXICIDAD.

El glutamato es el aminoácido neurotransmisor excitatorio mayoritario en mamíferos y es el responsable de procesos como: mediador de la comunicación intracelular, plasticidad, crecimiento y diferenciación. En condiciones fisiológicas, la concentración de glutamato en el espacio extracelular se mantiene en un rango micromolar de alrededor de $2 \mu M$ (Mehta et al., 2007).

Este aminoácido es responsable de la señalización postsináptica mediante la activación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Dentro de los receptores ionotrópicos se encuentra el NMDAr, el 2-amino-3-(3-hidroxil-5-metilisoxazol-4-il)propionato (AMPA) y el kainato, estos dos últimos también se conocen como no-NMDA. La activación del NMDAr tiene como consecuencia un aumento en la permeabilidad de Na^+ y Ca^{2+} , mientras que los no-NMDA sólo aumentan la permeabilidad de Na^+ , aunque se ha demostrado que algunas isoformas, también son permeables a Ca^{2+} (Tapia et al., 1999). Por otra parte, los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y necesitan de la unión de GTP, su estimulación causa una movilización de las reservas internas de Ca^{2+} (Mehta et al., 2007; Nakanishi, 1992); dentro de estos receptores se encuentran mGluR1s, mGluR2s, mGluR3s hasta mGluR8s (Chiechio & Nicoletti, 2011; Gerber et al., 2007).

La regulación de la concentración extracelular de glutamato, después de la sinapsis, es llevada a cabo en gran parte por transportadores dependientes de Na^+

conocidos como: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1) EAA4 y EAA5; los cuales se encuentran expresados tanto en neuronas (EAAT3, EAT4 y EAAT5) como en astrocitos (EAAT1 y EAAT2) (Camacho & Massieu, 2006; Hazel, 2007). En astrocitos también se expresa un transportador independiente de Na^+ , contribuyendo de una manera minoritaria a la regulación de los niveles de glutamato. Los transportadores dependientes de Na^+ , tiene gran afinidad por este aminoácido y son los de mayor prevalencia en el SNC (Anderson & Swanson, 2000). El transporte de una molécula de glutamato, del espacio sináptico al citoplasma del astrocito, por el receptor dependiente de Na^+ se lleva a cabo junto con dos moléculas de Na^+ al interior celular, mientras que un K^+ es transportado al exterior. La actividad de este transportador depende de un gradiente electroquímico de Na^+ , el cual es generado por la bomba de Na^+/K^+ (Camacho & Massieu, 2006) y es un proceso dependiente de ATP (Anderson & Swanson, 2000).

La regulación de la concentración de glutamato es muy importante, debido a que un aumento el espacio sináptico puede llevar a las neuronas a un proceso excitotóxico. La excitotoxicidad es un tipo de muerte que se induce por la sobreestimulación de los receptores de glutamato, principalmente el subtipo NMDA. Al activarse los receptores, permiten la entrada de Ca^{2+} al interior de las células, lo cual activa diversas rutas enzimáticas que llevan a la muerte neuronal, como la activación de lipasas, proteasas, fosfatasas y nucleasas (Camacho & Massieu, 2006).

Como se mencionó anteriormente, los receptores de mayor importancia en el proceso excitotóxico son los NMDA; sin embargo, los receptores AMPA también están implicados en este proceso.

Los receptores AMPA son estructuras heterotetraméricas compuestas de subunidades codificadas por los genes GluR1-4 (Arundine & Tymianski, 2003; Nakanishi, 1992). Este receptor muestra gran afinidad por el glutamato y el 2-amino-3-(3-hidroxil-5-metilisoxazol-4-il)propionato. Cada subunidad que compone al receptor tiene 4 dominios hidrofóbicos con un dominio N-terminal extracelular y

un extremo COOH-terminal citoplasmática, la cual juega un papel importante en la interacción con proteínas GRIP1 y GRIP2. En el tejido cerebral existe una gran variedad de isoformas de receptores AMPA gracias al proceso de “splicing” del RNAm (Arundine & Tymianski, 2003).

Anteriormente se creía que los receptores AMPA eran impermeables a Ca^{2+} y que su participación en este proceso era mediante su activación por el glutamato, permitiendo la entrada de Na^+ , favoreciendo la despolarización de la membrana y en consecuencia permitiendo la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L sensibles a voltaje y removiendo el Mg^{2+} que bloquea al NMDAr (Arundine & Tymianski, 2003). Actualmente se sabe que hay isoformas de receptes AMPA permeables a Ca^{2+} , como la subunidad GluR2, que contiene una glutamina en el segmento 2; sin embargo, si el RNA es editado y se codifica una arginina en esta posición, el receptor se vuelve impermeable a Ca^{2+} (Higuchi et al., 1993; Sommer et al., 1991).

Por otra parte, los NMDAr son estructuras heterotetraméricas o heteropentaméricas, que al igual que los AMPA están formados por 7 subunidades: NR1, NR2A-D y NR3A y B. La estructura de cada subunidad es muy similar a la de las subunidades AMPA. Dentro de la subunidad NR1, existe un residuo de asparagina (N598) que es responsable de la permeabilidad a Ca^{2+} . El receptor se bloquea por Mg^{2+} de manera voltaje dependiente en este residuo. Este bloqueo también se da por poliaminas, se inhibe por protones y zinc, y muestra una afinidad a glutamato y glicina (Arundine & Tymianski, 2003; Nakanishi, 1992).

Del mismo modo que los receptores AMPA, los NMDA en su dominio de COOH-terminal en el citoplasma, son capaces de interaccionar con una variedad de proteínas sinápticas intracelulares y citoesqueléticas (Arundine & Tymianski, 2003).

A pesar de que el Ca^{2+} juega un papel importante en la excitotoxicidad, su regulación es muy importante, porque interviene en procesos de señalización que son importantes para la célula. Por ejemplo, es un ion importante en la señalización intracelular, ya que lleva a cabo funciones como diferenciación y

crecimiento, excitabilidad de las membranas celulares, exocitosis y actividad sináptica. En condiciones normales, la concentración de Ca^{2+} libre es alrededor de 100 nM. Además las neuronas tienen mecanismos para mantener esta condición ya que regulan el flujo de Ca^{2+} a la célula, la salida de él, la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} y las reservas internas. Sin embargo, cuando alguno de los mecanismos de regulación falla, el aumento de Ca^{2+} lleva a la célula a una activación inapropiada de los procesos dependientes de Ca^{2+} , causando trastornos metabólicos y eventualmente llevando a muerte celular (Arundine & Tymianski, 2003).

3.1. Excitotoxicidad en la isquemia cerebral.

Al disminuir el flujo sanguíneo al cerebro, se reduce la producción de energía y las neuronas son incapaces de llevar a cabo sus funciones. De la misma manera no pueden mantener los gradientes iónicos produciendo despolarización y un aumento en la concentración de glutamato en el espacio sináptico, activando los NMDAr (Szydlowska & Tymianski, 2010) y AMPA. Esto lleva a las neuronas a un estado excitotóxico (Tapia et al., 1999), en el que se observa un aumento en la permeabilidad al Na^+ y el Cl^- lo que provoca un hinchamiento celular y edema citotóxico (Arundine & Tymianski, 2003; Lo et al., 2003), este último también se ve favorecido por el incremento de Ca^{2+} intracelular (Arundine & Tymianski, 2003).

Al igual que las neuronas, los astrocitos son susceptibles a la reducción del flujo sanguíneo, aunque presentan una mayor resistencia debida a las reservas de glucógeno. Sin embargo, cuando el cese del flujo sanguíneo es prolongado, entran en glicólisis anaerobia y como consecuencia se produce una acumulación de ácido láctico que interfiere con la producción de ATP (alrededor de un $\text{pH}=6.6$, se ve comprometida). Esto provoca un colapso en el gradiente iónico, aumentando la entrada de Na^+ y consecuentemente el transporte de glutamato hacia el espacio extracelular (Hazel, 2007) debido a un transporte reverso (Anderson & Swanson,

2000), que aumenta aún más la concentración de glutamato en el espacio sináptico e incrementa el proceso excitotóxico (Nedergaard & Dirnagl, 2005).

A pesar del aumento de Ca^{2+} mediado por los receptores NMDA y AMPA, existen otros mecanismos que llevan a un incremento en la concentración de este ion en el espacio intracelular, como los canales de la familia TRPM, principalmente TRPM2 y TRPM7, los cuales han sido asociados con la muerte celular por anoxia y por ERO. El TRPM2 es un canal catiónico no selectivo permeable a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y se ha propuesto como un mediador de la muerte celular mediante estrés oxidante. Por otra parte el TRPM7 es activado por ERO y cambios de pH, los cuales son frecuentes durante la isquemia.

Por otra parte, el glutamato al activar los receptores metabotrópicos, induce la formación del 1,2-diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato, a través de la fosfolipasa C. El Inositol-1,4,5-trifosfato se une a sus receptores en el retículo endoplásmico y estimula la liberación de Ca^{2+} de las reservas internas (Kato & Kogure, 1999).

También existen unos transportadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ llamados NCX, que son los reguladores de Ca^{2+} más potentes. Estos transportadores son intercambiadores bidireccionales que, durante la despolarización de la membrana o la apertura de los canales de Na^+ , transportan Na^+ al exterior y Ca^{2+} al interior de la neurona, lo que también contribuye al aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . Otra posible fuente del aumento de Ca^{2+} es mediada por los canales ASICs, que son activados por un bajo pH, lactato y ácido araquidónico, condiciones que se producen durante la isquemia cerebral. Así mismo, existen otros canales como los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y sensibles a dihidropiridina, la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática, los hemicanales y las panexinas (Szydłowska & Tymianski, 2010).

Además del incremento de Ca^{2+} proveniente del espacio sináptico, existen mecanismos durante la isquemia que liberan el Ca^{2+} de las reservas internas de la célula, principalmente del retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la mitocondria. En condiciones normales, la mitocondria es un almacenamiento de

Ca^{2+} , pero al aumentar la concentración de este ion en la matriz mitocondrial se reduce la producción de ATP, lo cual hace que el Ca^{2+} sea expulsado hacia el citoplasma (Szydłowska & Tymianski, 2010).

El incremento de Ca^{2+} intracelular lleva a las células a un estado de apoptosis y necrosis, debido a que activa proteasas, lipasas, fosfatasas y endonucleasas, lo que finalmente provoca daño celular y estrés oxidante. También el incremento de Ca^{2+} produce en la mitocondria un aumento en la producción de ERO y la apertura del poro de transición de permeabilidad liberando mediadores apoptóticos como el citocromo c (Szydłowska & Tymianski, 2010).

Por otra parte, la activación de los NMDAR también estimula a la fosfolipasa A_2 y por lo tanto el aumento del ácido araquidónico propiciando la generación de más ERO (Coyle & Puttfarcken, 1993).

4. ESTRÉS OXIDANTE.

El estrés oxidante se define como la condición en la cual se produce un desbalance fisiológico entre especies oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, provocando un daño potencial al organismo (Lakhan et al., 2009).

En condiciones normales, las células están expuestas a una gran variedad de ERO y ERN, de forma endógena y exógena. Entre las fuentes exógenas se encuentran la irradiación ultravioleta, algunos alimentos, medicamentos, toxinas, xenobióticos, etc. (Kohen & Nyska, 2002). La principal fuente endógena es la mitocondria, debido a la fuga de electrones durante su transporte en la cadena respiratoria: en la ubiquinona como formadora del $\text{O}_2^{\cdot-}$ en el complejo I mitocondrial y en la oxidación de la semiubiquinona en el complejo III (Konigsberg M, 2008a). Por otra parte, el citocromo P450 también genera ERO, al igual que la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Konigsberg M, 2008b,c,d).

Las ERO y ERN pueden ser clasificadas en especies radicales y no radicales. Un radical libre es un átomo o grupos de átomos que contiene uno o más electrones

desapareados y es capaz de existir independientemente (Kohen & Nyska, 2002; Miranda LD, 2008); mientras que los no radicales son moléculas que no tienen electrones desapareados si no están reducidas completamente y por lo tanto son extremadamente reactivas (Kohen & Nyska, 2002).

Las principales ERO que participan activamente en el estrés oxidante son: el O_2 ; el ozono (O_3); oxígeno singulete (1O_2), que se produce por la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 ; el $O_2^{\cdot-}$; y las especies parcialmente reducidas como el H_2O_2 y el $\cdot OH$. Por otra parte, el O_2 también forma compuestos con nitrógeno, y estos pueden ser más reactivos que el O_2 en su estado basal, dentro de estas especies se encuentran el $\cdot NO$, el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y el $ONOO^{\cdot}$, estas últimas son conocidas como ERN (Hansberg-Torres W, 2008).

La producción de ERO y ERN provoca daño celular en los diversos componentes celulares y alteran muchas funciones. Dentro de los principales blancos se encuentran las proteínas, los lípidos y el ADN.

El daño a proteínas por la acción de especies reactivas incluye peroxidación, daño a residuos de aminoácidos específicos, cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación. Como consecuencia a este daño se produce pérdida de la actividad enzimática, alteración de las funciones celulares como la producción de energía, interferencia con la generación de los potenciales de membrana, etc. Dentro de los principales daños que se localizan en las proteínas, se encuentran la formación de aductos entre el NO_2^{\cdot} con el aminoácido tirosina, produciendo la 3-nitrotirosina, el cual sirve como marcador de daño oxidante a proteínas (Kohen & Nyska, 2002).

El daño ocasionado por ERO y ERN en el núcleo puede modificar el ADN nuclear. Este daño tiene como consecuencia la producción de mutaciones, transformaciones carcinogénicas, envejecimiento celular e incluso, si no es reparado, puede llevar a la muerte celular. El $\cdot OH$ tiene una gran reactividad sobre el ADN ya que puede abstraer átomos de hidrógeno y pegarse a las bases nitrogenadas, formando aductos. Por otro lado, la guanidina es la base

nitrogenada más susceptible al daño oxidante por el $\cdot\text{OH}$ y ONOO^- , ya que forma la 8-oxo-7,8-dihidro.2'-desoxiguanosina un marcador del daño oxidante al ADN. Por otro lado las ERN como trióxido de nitrógeno (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2) y ONOO^- pueden nitrar y desaminar al ADN causando rupturas en la cadena y mutaciones. También los azúcares presentes en el ADN son susceptibles al daño oxidante (Medeiros MH, 2008).

El daño que ocasionan las ERO y ERN sobre los lípidos de las membranas biológicas genera diversos compuestos tóxicos y altera su fluidez y permeabilidad. Además, las ERO y ERN pueden modificar la actividad de las proteínas, enzimas, receptores y canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y la función celular (Zenteno-Savin T & Saldaña-Balmori Y, 2008).

El cerebro es particularmente susceptible al estrés oxidante ya que representa el 2.5% del peso del organismo, es responsable del 25% del metabolismo basal (Lee et al., 2000) y utiliza el 20% del O_2 total consumido por el cuerpo. Por otra parte, existen regiones del cerebro con altas concentraciones de hierro, lo cual favorece la producción de ERO. El cerebro tiene gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, lo que favorece la lipoperoxidación, y además tiene un bajo contenido de defensas antioxidantes (Margail et al., 2005).

4.1. Estrés oxidante en la isquemia cerebral.

Como se mencionó anteriormente, los radicales libres están implicados en la fisiopatología de la isquemia cerebral y son responsables del daño a las células y el tejido cerebral. Después de la disminución del flujo sanguíneo, la producción de radicales libres se incrementa. Este incremento depende de la intensidad, la etapa y el sitio de la isquemia, así como de la reperfusión (Heo et al., 2005).

La interrupción del flujo sanguíneo al cerebro produce una serie de eventos que termina en el agotamiento de las reservas de ATP (Moro et al., 2005), esto provoca que: 1) las defensas antioxidantes se vean disminuidas, 2) un incremento

en la producción de ERO/ERN aumente (Hazel, 2007) y 3) las células entren en un proceso de estrés oxidante. Las especies oxidantes que se generan durante el insulto isquémico y la reperfusión provocan daño a lípidos, proteínas y al ADN (Moro et al., 2005), provocando una alteración de la función e integridad celular (Coyle et al., 1993) que finalmente llevan a la muerte neuronal. Dentro de estas especies se encuentran el $\cdot\text{NO}$, el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el ONOO^- , el H_2O_2 y el $\cdot\text{OH}$ (Moro et al., 2005).

En el desarrollo de la lesión isquémica, existen varias fuentes de ERO y ERN como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la sintasa de óxido nítrico, la NADPH oxidasa, etc. (Fraser, 2011).

Durante el proceso excitotóxico, el aumento de Ca^{2+} intracelular provoca una estimulación de la fosfolipasa A_2 promoviendo la cascada del ácido araquidónico. El ácido araquidónico es transformado en prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos por la acción de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, las cuales ocupan directamente O_2 , promoviendo la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Bondy & LeBel, 1993; Coyle et al., 1993). La ciclooxigenasa cataliza la adición de dos moléculas de O_2 al ácido araquidónico produciendo prostaglandina PGG_2 que es rápidamente peroxidada a prostaglandina PGH_2 con la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Moro et al., 2005).

En condiciones normales, la xantina deshidrogenasa oxida a la xantina e hipoxantina en ácido úrico con el uso de NAD^+ como aceptor de electrones (Love, 1999); sin embargo, al aumentar la concentración de Ca^{2+} , la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa mediante una proteasa dependiente de Ca^{2+} (Coyle et al., 1993). Durante el proceso isquémico la degradación de nucleótidos de adenina produce una elevada concentración de hipoxantina, que es el sustrato de la xantina oxidasa, convirtiéndola en ácido úrico y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por otro lado, la oxidación del NADPH mediado por la NADPH oxidasa, presente en los neutrófilos infiltrados en el parénquima cerebral, contribuye también a la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Love, 1999; Moro et al., 2005) (Figura 7).

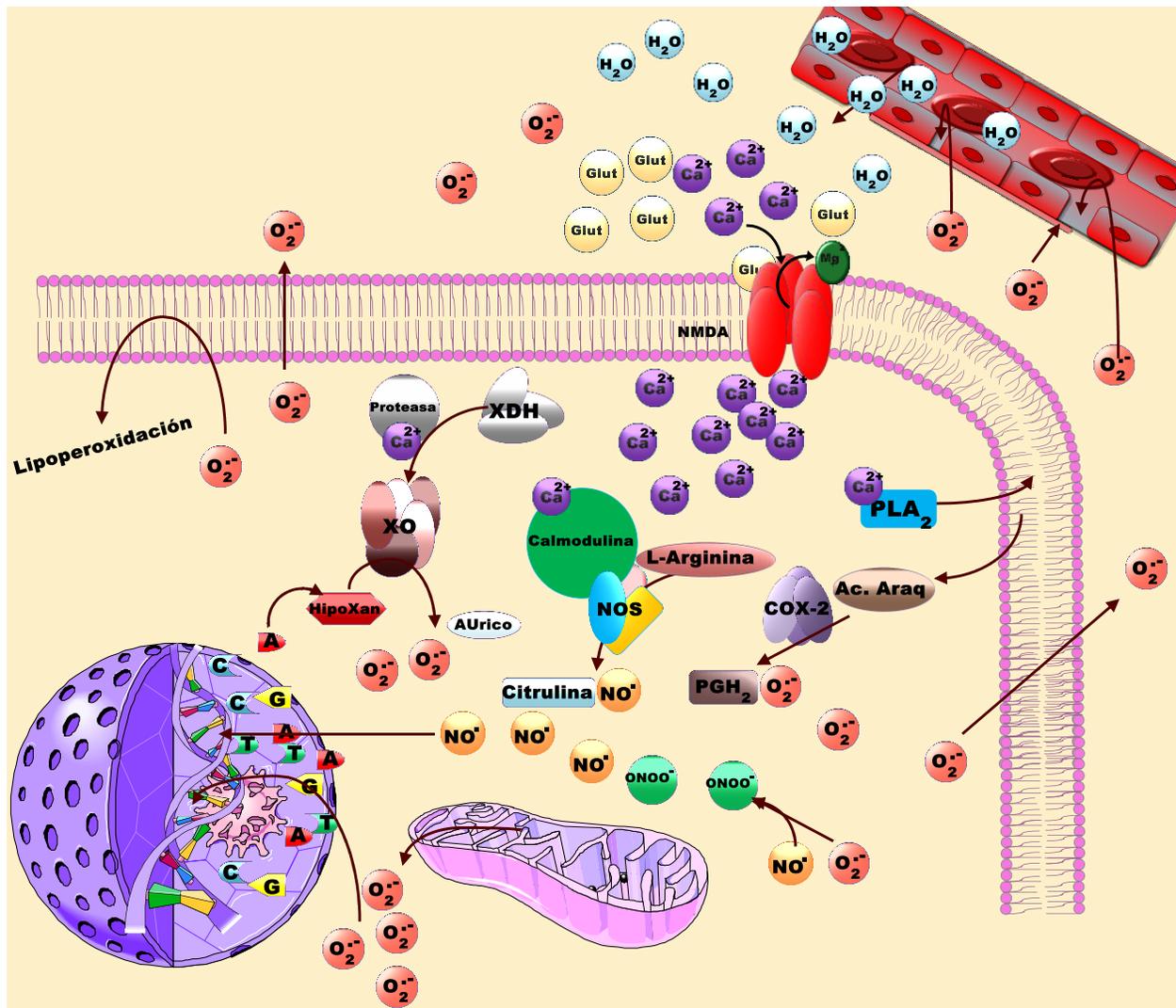
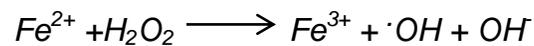


Figura 7. Producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno durante la reperfusión. Al restablecer el flujo sanguíneo al cerebro (reperfusión) un conjunto de enzimas dependientes de oxígeno y, algunas de ellas de Ca^{2+} , producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, provocando daño al DNA, lípidos, proteínas y así mismo daño a la barrera hematoencefálica, favoreciendo la entrada de agua al espacio intersticial promoviendo el edema vasogénico. NOS: sintasa de óxido nítrico; XHD: xantina deshidrogenasa; XO: xantina oxidasa; COX-2: ciclooxigenasa-2; PLA₂: fosfolipasa A2; PGH₂: prostaglandina H2; Ac. Araq: ácido araquidónico; HipoXan: hipoxantina; A. Urico: ácido úrico; NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato; Glut: glutamato; A: adenina; G: guanina; C: citocina; T: timina.

La mitocondria durante el insulto isquémico, también representa una fuente importante de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Margail et al., 2005). En condiciones normales, aproximadamente del 2 al 5% de los electrones que se transportan en la mitocondria producen $\text{O}_2^{\cdot-}$. La producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se lleva a cabo en los complejos I y III (Moro et al., 2005). En la membrana mitocondrial se encuentra

presente un fosfolípido llamado cardiolipina que es esencial para el transporte de electrones en este organelo. La hidrólisis de este fosfolípido por acción de la fosfolipasa A₂ produce una alteración en la cadena respiratoria incrementando la producción de O₂^{•-} (Muralikrishna Adibhatla & Hatcher, 2006).

Además de la producción del O₂^{•-}, también ocurre la formación de otros radicales, como el [•]OH que se forma a través de la reacción de Fenton (Reacción 1), la cual se favorece por el bajo pH que prevalece en el tejido durante y después de la isquemia, así como por la presencia de Fe²⁺ libre (Moro et al., 2005).



Reacción 1. Reacción de Fenton. El hierro (Fe²⁺) reacciona con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), proveniente de la dismutación del radical superóxido, para formar hierro oxidado (Fe³⁺), ion hidroxilo (OH⁻) y radical hidroxilo ([•]OH).

La producción del O₂^{•-} y otros radicales libres produce un aumento en la peroxidación de las membranas celulares, generando aldehídos tóxicos como el 4-hidroxi-neonenal que puede dañar canales iónicos, transportadores y proteínas citosólicas (Mehta et al., 2007). Además del daño provocado a los lípidos, el O₂^{•-}, así como el H₂O₂ al atravesar las membranas celulares, producen daño a la barrera hematoencefálica, promoviendo el edema vasogénico (Heo et al., 2005).

El [•]ON es un radical libre hidrófilo y liposoluble con diversas actividades biológicas como vasodilatador, inhibidor de la agregación plaquetaria, modulador de la neurotransmisión, promotor de la sinaptogénesis y modulador sináptico, antimicrobiano, etc. (Love, 1999). La producción de [•]ON se lleva a cabo por la sintasa de óxido nítrico (SON) que cataliza la conversión de la L-arginina, primero a N-hidroxil-arginina y después a L-citrulina y [•]ON, en una reacción acoplada al NADPH. La activación de esta enzima requiere de la unión a calmodulina y otros cofactores como el FAD, el hemo y la tetrahidrobiopterina. Actualmente se conocen tres isoformas de esta enzima, dos de las cuales son dependientes de la unión a Ca²⁺/calmodulina (neuronal SONn y endotelial SONE) y se activan con un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular. Por otro lado, la isoforma inducible

(SONi), es una isoforma que se une a calmodulina aun cuando los niveles de Ca^{2+} son muy bajos, esta isoforma se induce por citocinas y lipopolisacaridos, y se expresa en macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, microglia, astrocitos y neuronas de la zona cortical (Rodrigo et al., 2005).

La producción de $\cdot\text{ON}$ se incrementa 20 min después del inicio de la isquemia, debido a la activación de las tres isoformas. La activación de los NMDAr, resulta en un aumento en la entrada de Ca^{2+} y la subsecuente activación mediada por calmodulina de la SONn y SONE (Blomgren & Hagberg, 2006). Mientras que la SONi se activa unas cuantas horas después, permaneciendo activa incluso varios días después del evento isquémico, debido probablemente a la infiltración de neutrófilos, la activación de la microglia, etc. (Dawson & Dawson, 1996; Love, 1999; Moro et al., 2005; Rodrigo et al., 2005). La elevada concentración de $\cdot\text{ON}$ favorece el desacople de la cadena respiratoria en la mitocondria, formando aductos con la citocromo c oxidasa y favoreciendo la generación adicional de ERO (Moro et al., 2005).

El incremento de los niveles de $\cdot\text{ON}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ favorece la producción de ONOO^- , que es mucho más tóxico que sus precursores, ya que provoca lipoperoxidación, nitración de tirosinas, oxidación y nitrosilación de sulfhidrilos, así como la ruptura del ADN (Love, 1999; Moro et al., 2005). Existe también la formación de otras ERN como el radical dióxido de nitrógeno $\cdot\text{ON}_2$ y el cloruro de nitrilo (NO_2Cl), formados a partir de la reacción de nitratos, producto final del metabolismo del $\cdot\text{ON}$ con el ácido hipocloroso (HOCl), que es producido por la mieloperoxidasa en los neutrófilos (Love, 1999).

5. DAÑO POR REPERFUSIÓN.

La reperfusión es la restauración del flujo sanguíneo hacia el tejido cerebral. A pesar que es un proceso crítico para restablecer las funciones normales del cerebro, puede resultar en un daño secundario, conocido como daño por reperfusión (Lakhan et al., 2009).

Durante el periodo de isquemia, disminuye la expresión del complejo IV de la cadena respiratoria y del sitio final intramitocondrial de la fosforilación oxidativa. La pérdida de la actividad de la citocromo oxidasa provoca un daño celular durante la reperfusión al aumentar las ERO porque no hay un adecuado transporte de electrones hacia el último aceptor de éstos. Por otra parte, la disfunción mitocondrial del complejo I ocurre después de la reperfusión, incrementando la producción de ERO (Schaller & Graf, 2004).

Peters et al. (1998) encontraron que la mayor producción de ERO ocurre 20 min después del inicio de la reperfusión y se mantienen incrementados por lo menos 3 h después de la reperfusión. Por otro lado, Christensen et al. (1994) encontraron que la mayor cantidad de ERO se observa entre los 10 y los 60 min después del inicio de la reperfusión. Esto sugiere que gran parte del daño que ocurre durante la isquemia/reperfusión es debido a las ERO generadas durante los primeros minutos de la reperfusión.

Por otro lado Aguilera et al. (2011) encontraron que la administración de extracto de ajo envejecido al inicio de la reperfusión disminuye el área de infarto debido a la capacidad antioxidante del extracto de ajo envejecido al capturar ERO.

6. DAÑO A LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.

La barrera hematoencefálica sirve como una barrera física y metabólica compuesta por la unidad neuro(glio)vascular que incluye células endoteliales, astrocitos, pericitos, neuronas y una matriz extracelular alrededor de los vasos (Yang & Rosenberg, 2011). Existe también otra barrera anatómica y fisiológica importante en el metabolismo de las células del sistema nervioso central, llamada lámina basal (Mehta et al., 2007). Esta barrera expresa un gran número de canales iónicos y transportadores, y además, presenta una baja tasa de pinocitosis (Hawkins & Davis, 2005). Su integridad, particularmente los complejos de proteínas de unión estrecha intracelular (Lochhead et al., 2010), son muy importantes para mantener un equilibrio en el cerebro, ya que previene que pasen

libremente moléculas polares, iones y algunos lípidos del compartimento vascular hacia el cerebro (Fraser, 2011).

Durante la isquemia cerebral y la reperfusión, se encienden una serie de eventos que terminan en la formación de proteasas tóxicas, principalmente metaloproteinasas de matriz dependientes de zinc y ciclooxigenasas, y por otro lado se encuentra la producción de radicales libres (Mergenthaler et al., 2004). Ambos eventos están involucrados en la ruptura de la barrera hematoencefálica, a través de la perturbación de las proteínas de unión estrecha y degradando la lámina basal (Mehta et al., 2007).

Dentro de las metaloproteinasas que participan activamente en el daño a la barrera hematoencefálica se encuentran la gelatinasa-A, la estromelicina-1 y la gelatinasa-B, que actúan sobre diferentes proteínas de la matriz extracelular de la barrera hematoencefálica (Mergenthaler et al., 2004) y la lámina basal, resultando en la pérdida de contacto entre astrocitos y células endoteliales. Se ha encontrado que el incremento de estas proteasas ocurre algunas horas después (1-3 h) del inicio de la isquemia (Mehta et al., 2007; Mergenthaler et al., 2004) (Figura 8). Por otra parte, las ciclooxigenasas son enzimas importantes en la respuesta inflamatoria. La ciclooxigenasa 1 es constitutiva, mientras que la ciclooxigenasa 2 es inducible; esta última contribuye al daño de la barrera hematoencefálica como parte de la respuesta inflamatoria secundaria, que se observa 24 a 48 h después de la generación del daño (Yang & Rosenberg, 2011).

El daño a la barrera hematoencefálica dependerá del tiempo de duración de la isquemia. Mientras que un bloqueo del flujo sanguíneo de 2 h produce una región pequeña localizada solamente en el estriado, un bloqueo de 8 h produce la disrupción de la barrera hematoencefálica en casi todo el estriado y en algunas regiones de la corteza (Chen et al., 2009).

El rompimiento de la barrera hematoencefálica y la destrucción de la lámina basal por parte de las metaloproteinasas permite la migración de leucocitos,

favoreciendo así el edema vasogénico (Mergenthaler et al., 2004) y aumentando el daño al tejido cerebral.

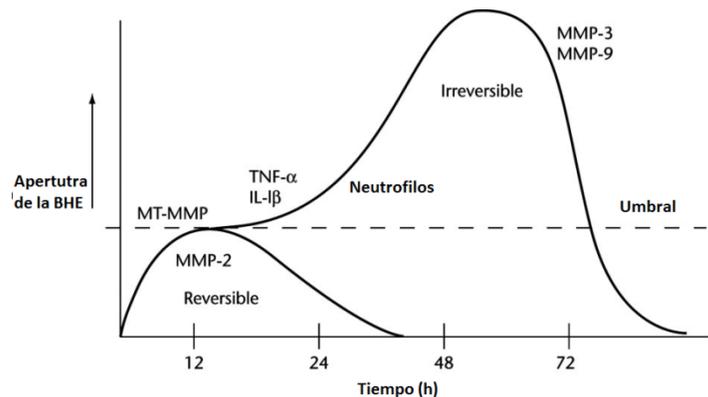


Figura 8. Activación de las metaloproteinasas por algunos factores. Modificado de Yang & Rosenberg (2011).

7. EDEMA.

El cerebro de los mamíferos está constituido por 4 tipos de fluidos, los cuales están en sus respectivos compartimentos: la sangre en la vasculatura cerebral; el fluido cerebroespinal en el sistema ventricular y el espacio subaracnoideo; el fluido intersticial, que baña a las células del parénquima cerebral; y el fluido intracelular, que está contenido en las neuronas y las células gliales. Cada fluido tiene su propio volumen y constitución, que son críticos para un correcto funcionamiento del tejido cerebral. Cambios mínimos en la composición de los iones en los fluidos extracelular o intracelular, pueden afectar significativamente la función neuronal (Kahle et al., 2009).

El edema cerebral es definido como una acumulación de fluidos anormales en el parénquima cerebral, produciendo una ampliación volumétrica de las células cerebrales o el tejido. Puede estar asociado con la acumulación de fluido anormal, ya sea intra o extracelular y es clasificado en dos principales grupos, dependiendo

del sitio de la adquisición del fluido, estos grupos son edema citotóxico y edema vasogénico (Heo et al., 2005)

- Edema citotóxico, se define como un hinchamiento de los componentes celulares en el cerebro, resultando en disturbios del metabolismo celular.
- Edema vasogénico, es causado por la ruptura de la barrera hematoencefálica, provocando un incremento en la permeabilidad de macromoléculas, lo que permite el movimiento de fluidos del espacio intravascular al extravascular.

El hinchamiento celular es el primer mecanismo responsable del edema durante la fase temprana de la isquemia, mientras que el movimiento del fluido intravascular hacia el extravascular ocurre después (Heo et al., 2005).

Durante el edema citotóxico, los astrocitos son los primeros en hincharse, después de 5 min de la disminución energética y a las 24 h mueren por necrosis, posteriormente las neuronas y los oligodendrocitos se hinchan. Al agotarse las reservas energéticas de las células, se reduce la actividad de los transportadores dependientes de ATP encargados de mantener las concentraciones de iones adecuadas, de este modo aumenta la concentración de Na^+ intracelular, seguido de un incremento de Cl^- , promoviendo el transporte de H_2O hacia el espacio intracelular a través del transportador aquaporina 4. Por otra parte, la depleción energética provoca un transporte reverso del glutamato, aumentando la concentración de este aminoácido en el espacio sináptico, activando los receptores NMDA y no NMDA, provocando un transporte de Ca^{2+} hacia el interior de las neuronas y aumentando el gradiente osmótico, lo que favorece el edema citotóxico (Amiry-Moghaddam & Ottersen, 2003; Hazell 2007; Heo et al., 2005; Kahle et al., 2009; Lee et al., 2000).

El edema vasogénico se produce por una perturbación de la función de la barrera fisiológica de microvasos, causando fugas incontroladas de los vasos hacia el parénquima circundante. Existen diversos mecanismos por los cuales ocurre la ruptura de la barrera hematoencefálica tales como: 1) la acción de las

metaloproteinasas de matriz sobre el colágeno tipo IV y la laminina, componentes principales de las membranas basales vasculares de la barrera; 2) el daño provocado por los radicales libres sobre la microvasculatura; 3) la acción del factor de crecimiento vascular endotelial, el cual contribuye a la ruptura de la barrera hematoencefálica induciendo fenestraciones en el endotelio de venas y capilares pequeños que normalmente no poseen fenestraciones, además induce alteraciones en las proteínas endoteliales de unión estrecha (Heo et al., 2005).

8. INFLAMACIÓN.

El daño producido por la isquemia y la reperfusión (IR), aparte de inducir daño en las células del parénquima cerebral, genera una respuesta inflamatoria exógena (Kato & Kogure, 1999) que exacerba el daño inicial producido por la IR en el tejido (Lee et al., 2000). El proceso inflamatorio empieza unas horas después del inicio de la isquemia (Mergenthaler et al., 2004) y se caracteriza por un aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios, ya que ocurre un aumento y activación de citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas y moléculas de adhesión en el endotelio (Mitsios et al., 2006).

Las principales citocinas que se expresan durante la IR son la IL-1, la IL-6, el factor de necrosis tumoral α y el factor de crecimiento transformante β , mientras que las principales moléculas de adhesión que se expresan en el endotelio son selectinas, integrinas e inmunoglobulinas. También se incrementa la expresión de eicosanoides y de la SONi (Mehta et al., 2007) y de la ciclooxigenasa 2 (Taoufik & Probert, 2008).

La infiltración de neutrófilos en la zona dañada ocurre de 12 a 24 h después del inicio de la isquemia (Kato & Kogure, 1999). Durante la infiltración de neutrófilos, las moléculas de adhesión juegan un papel muy importante tanto en el endotelio como en las células inflamatorias (Kato & Kogure, 1999; Mehta et al., 2007; Mergenthaler et al., 2004). Los neutrófilos, al adherirse al endotelio atraviesan la pared vascular e ingresan al parénquima cerebral (Dirnagl et al., 1999).

Posteriormente, los monocitos/macrófagos se infiltran al parénquima cerebral después de 2 o 3 días (Kato & Kogure, 1999).

La acumulación de células inflamatorias en los microcapilares y en la zona de penumbra, disminuye el flujo sanguíneo conllevando a una disrupción del flujo sanguíneo en esta área. Después de la infiltración del parénquima cerebral por estas células, el daño se exagera debido a la producción de ERO, el incremento en el nivel de proteasas y por el aumento de mediadores derivados de lípidos, los eicosanoides (Kato & Kogure, 1999; Mehta et al., 2007).

En los neutrófilos se induce la expresión de la SONi, que es una fuente importante de NO (Dirnagl et al., 1999; Lee et al., 2000) que promueve la producción de ERO a través de la formación de ONOO^- . Del mismo modo, la inducción de la ciclooxigenasa-2 favorece la producción de ERO mediante la producción de O_2^- y de prostanoïdes tóxicos (Dirnagl et al., 1999; Mehta et al., 2007).

Se ha observado la participación de las citocinas en el daño al tejido cerebral, como la IL-1, que incrementa el nivel de ácido araquidónico e induce la expresión de la SONi (Mehta et al., 2007).

Las células de la microglia también están asociadas a la respuesta inflamatoria en la isquemia cerebral, ya que son fagocíticamente activas y al activarse producen una gran cantidad de moléculas inflamatorias que promueven el reclutamiento de polimorfonucleares (Kato & Kogure, 1999; Mehta et al., 2007).

9. MUERTE CELULAR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL.

Durante la agresión isquémica, se han identificado dos tipos de muerte celular, la necrosis y la apoptosis. La necrosis se caracteriza por el hinchamiento del citoplasma y los organelos, con pérdida de la integridad de la membrana, resultando en la lisis celular con una respuesta inflamatoria. En cambio, la apoptosis se describe como un proceso fisiológico controlado y programado, usado por las células cuando mueren como respuesta a un estímulo fisiológico. En

dicho proceso, la formación de cuerpos apoptóticos provoca que no exista una respuesta inflamatoria (Taoufik & Probert, 2008). A pesar de que ambos mecanismos de muerte celular son diferentes, se ha determinado que la mitocondria se ve envuelta en ambas vías de señalización y esto depende de la severidad del daño o de la naturaleza de la vía de señalización (Dirnagl et al., 1999; Sugawara et al., 2004).

El proceso necrótico está asociado con una pérdida de la homeostasis osmótica como respuesta a un estímulo fisiológico (una anoxia aguda, repentino agotamiento de nutrientes, daño extremo ya sea físico o químico) y típicamente involucra un gran número de células dentro del tejido afectado (Mehta et al., 2007). La mayoría de las lesiones que se desarrollan en la IR hacia la periferia de la arteria ocluida son de tipo necrótico (Eltzsching & Eckle, 2011; García et al., 1995), ya que las células se hinchan por la entrada de H₂O, proceso que se ve favorecido por la sobreactivación de los receptores de glutamato (Lee et al., 2000) y el decremento rápido en la producción de ATP y glucosa, lo cual favorece la ruptura de la membrana celular, con la consecuente liberación del contenido celular al tejido circundante (Mehta et al., 2007). Este proceso es altamente inmunoestimulador y lleva rápidamente a una infiltración de células inflamatorias y a la producción de citocinas (Eltzsching & Eckle, 2011).

Por otra parte, en la zona de penumbra, el principal mecanismo de muerte celular es por apoptosis (Dirnagl et al., 1999; Taoufik & Probert, 2008) donde la mitocondria juega un papel muy importante (Green & Reed, 1998). Existen diversas vías de señalización que llevan a la célula a este tipo de muerte, como la producción de radicales libres, la deficiencia del factor de crecimiento y neurotrofinas, el daño al ADN e inducción de p53 (Mehta et al., 2007), la disfunción mitocondrial, liberación del citocromo c (Chan, 2004; Fujimura et al., 1998), entre otras.

La vía mitocondrial en neuronas, es el mecanismo predominante de apoptosis, debido a que la disfunción mitocondrial por la excitotoxicidad promueve la liberación del citocromo c, lo que activa la caspasa 9 y después la caspasa 3

(Taoufik & Probert, 2008). Las caspasas son cisteín-proteasas específicas de aspartato que existen como zymógenos en las células (Dirnagl et al., 1999) y que son activadas por la escisión de la proteína precursora (Mergenthaler et al., 2004). El citocromo c interactúa con Apaf1, con la procaspasa 9 y con el dATP para formar el apoptosoma, que activa a la caspasa 9 iniciándose así la cascada de las caspasas. La caspasa 9 activa a la caspasa 3, seguido de la activación río abajo de caspasas 2, 6, 8 y 10. La caspasa 3, también activa a la DNasa activada por casapasas que corta al ADN. Por otro lado la activación río abajo de las caspasas también provoca la ruptura de enzimas que reparan el ADN, como la poli(ADPRibosa) polimerasa, promoviendo mayor daño al material genético (Chan, 2004; Dirnagl et al., 1999; Love, 1999; Mehta et al., 2007; Mergenthaler et al., 2003; Sugawara et al., 2004; Taoufik & Probert, 2008) y llevando así a la neurona a apoptosis (Figura 9).

La activación de la caspasa 3, también puede ser llevada a cabo por la caspasa 8, que a su vez es activada por el receptor de muerte que pertenece a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (Mehta et al., 2007; Taoufik & Probert, 2008).

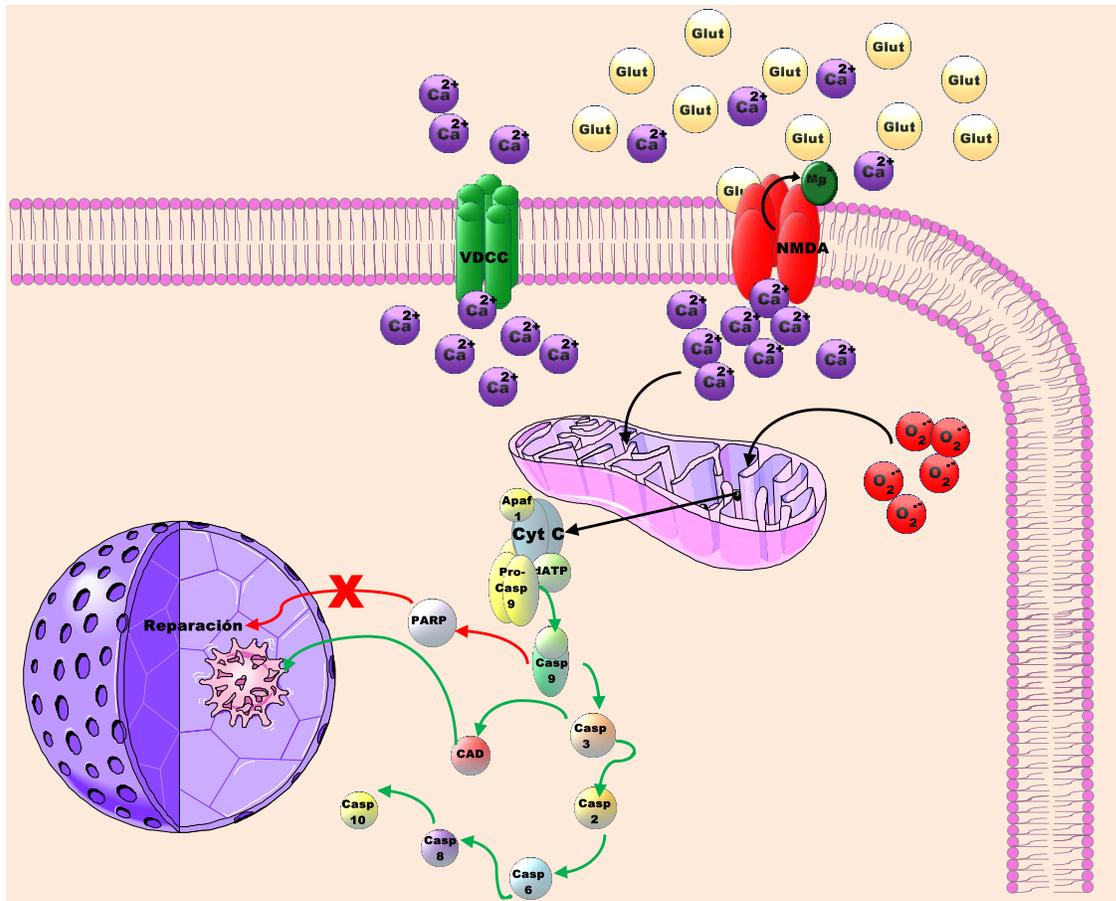


Figura 9. Apoptosis. La apoptosis es una vía de muerte celular programada que se produce en la zona de penumbra del tejido isquémico. Se inicia al liberarse el citocromo c de la mitocondria, el cual activa una cascada de proteasas denominadas caspasas, produciendo así la muerte celular. Glut: glutamato; NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato; VDCC: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje; Cyt c: citocromo c; Apaf: factor activador 1 de la proteasa de apoptosis; Casp: caspasa; CAD: DNasa activada por caspasas; PARP: poli(ADP ribosa) polimerasa.

10. DEFENSAS EN EL CEREBRO ANTE EL ESTRÉS OXIDANTE PRODUCIDO POR LA ISQUEMIA CEREBRAL.

El cerebro al consumir una gran cantidad de O_2 es susceptible al estrés oxidante. Naturalmente la formación de oxidantes ocurre durante el transporte de electrones mitocondrial, en la autoxidación de algunos neurotransmisores (norepinefrina, dopamina, etc.) o en algunos eventos que se llevan a cabo durante la IR. A pesar

de que el cerebro es susceptible al daño oxidante, éste cuenta con defensas antioxidantes para contrarrestar dicho daño (Warner et al., 2004).

Los antioxidantes son compuestos que pueden prevenir el proceso pro-oxidante y/o el daño oxidativo biológico (Halliwell 2011; Kohen & Nyska, 2002). Estas moléculas pueden ser complejas, tal es el caso de las enzimas antioxidantes o moléculas simples (Gutteridge & Halliwell, 2010).

De acuerdo al mecanismo por el cual mantienen el estado redox de las células en condiciones fisiológicas, estas moléculas se pueden clasificar en antioxidantes directos e indirectos (Revisado en Silva-Islas et al., 2012).

Los antioxidantes directos son compuestos de bajo peso molecular, que pueden llevar a cabo reacciones redox y atrapar productos reactivos oxidantes, así como ERO y ERN. Este tipo de compuestos se consumen en su acción antioxidante y requieren ser reemplazados o regenerados. Ejemplo de estas moléculas son el ascorbato, el α -tocoferol, el ácido lipoico, la ubiquinona, el glutatión (GSH), entre otros (Warner et al., 2004).

La vitamina C o ascorbato es un compuesto soluble en agua capaz de reducir a la vitamina E, así como a peróxidos y $O_2^{\cdot-}$. Esta vitamina previene la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. *La vitamina E o α -tocoferol*, es una vitamina liposoluble presente en las membranas biológicas que contiene un grupo hidroxilo que reacciona con moléculas que tienen electrones desapareados. *El ácido lipóico* es el grupo prostético esencial de la dihidrolipoil transacetilasa (E_2) un componente del complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa en la mitocondria. El ácido lipóico existe en forma reducida como ácido dihidrolipóico que tiene propiedades antioxidantes ya que puede quelar metales, disminuir la producción de radicales libres y regenerar otros antioxidantes como el glutatión (GSH), el ascorbato y la vitamina E. *La ubiquinona* (coenzima Q/Q10) es parte de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, pero se encuentra en baja concentración en las membranas celulares, en donde ejerce una función antioxidante previniendo la lipoperoxidación (Nordberg & Arnér, 2001).

El GSH es un tripéptido que se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Entre sus funciones se encuentra: 1) la detoxificación de diferentes xenobióticos y sus metabolitos; 2) el metabolismo de diversos metales (Hg, Ag, Cd, As, Pb, Au, Zn, Cu), ya sea uniéndose a ellos o participando en su movilización; 3) el mantenimiento del equilibrio redox intracelular y el estatus de los tioles protéicos esenciales; y 4) reacciona con el H_2O_2 a través de la glutatión peroxidasa (GPx), oxidándose a disulfuro de glutatión (GSSG). La reducción del GSSG a GSH lo lleva a cabo la glutatión reductasa (GR) (Fernández-Checa JC & García Ruíz C, 2008).

Por otro lado los antioxidantes indirectos, son agentes que pueden o no tener actividad antioxidante; pero sin embargo ejercen su principal mecanismo de acción a través de la inducción de la respuesta de fase 2, que involucra una serie de enzimas y proteínas con actividad antioxidante.

La inducción de esta respuesta de fase 2 protege contra agentes oxidantes y electrófilos a través de varios mecanismos como: 1) incrementando el nivel de algunos antioxidantes directos; 2) incrementando el nivel de enzimas que catalizan la activación directa de antioxidantes; 3) incrementando el nivel de enzimas que catalizan la detoxificación de electrófilos; 4) incrementando el nivel de GSH a través de la elevación de la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis y regeneración; 5) estimulando la síntesis del NADPH; 6) mejorando el transporte de drogas tóxicas vía transportadores de respuesta a multidroga; 7) inhibiendo citocinas que median la inflamación; 8) previniendo la sobredosis de hierro y consecuentemente el estrés oxidante; y 9) reconociendo, reparando y removiendo el daño a proteínas (Dinkova-Kostova et al., 2005).

Algunas enzimas y proteínas de la respuesta de fase 2 se mencionan a continuación:

Superóxido dismutasa (SOD). Es una familia de enzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ en O_2 y H_2O_2 (Reacción 2).



Reacción 2. Reacción de dismutación del radical superóxido. Dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ más dos protones por acción de la superóxido dismutasa (SOD), se transforman en una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y una de oxígeno (O_2).

En los mamíferos existen tres tipos de SOD, las cuales se encuentran en lugares específicos. La SOD 1 se ubica en el citoplasma, el núcleo y en la membrana externa de la mitocondria. Es una enzima dimérica que pesa 32 KDa con un centro catalítico de Cu/Zn. La SOD 2 se ubica cerca de la membrana interna de la mitocondria, es una enzima tetramérica con un peso de 100 KDa y tiene un centro catalítico de Mn. Finalmente, la SOD 3, se localiza en el espacio extracelular y al igual que SOD 1, su centro catalítico es de Cu/Zn. La actividad de la SOD 2 en la mitocondria es muy importante, debido a que en este organelo, la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ que se produce es relativamente alta por la fuga de electrones (4 al 5%) de la cadena respiratoria (Gómez-Quiroz LE & Cuevas-Bahia DB, 2008; Nordberg & Arnér, 2001).

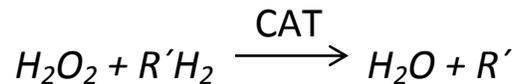
Catalasa (CAT). Las catalasas son un grupo de enzimas que descomponen el H_2O_2 directamente en O_2 y H_2O (Reacción 3). En su centro catalítico se localiza un grupo hemo y la unión de NADPH aumenta su actividad debido a que protege a la enzima de su inactivación.



Reacción 3. Reacción catalizada por la Catalasa (CAT). Por cada 2 moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) la CAT produce 2 moléculas de agua (H_2O) y 1 de oxígeno (O_2).

La CAT emplea dos moléculas de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como agente oxidante para la producción de H_2O y O_2 . La localización predominante en

mamíferos de esta enzima es en los peroxisomas. Esta enzima también participa en la destoxificación de diferentes sustratos como fenoles y alcoholes en una reacción acoplada a la reducción de H₂O₂ (Reacción 4) (Nordberg & Arnér, 2001; Peraza-Reyes L, 2008).



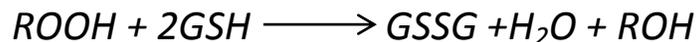
Reacción 4. Reacción de reducción del peróxido de (H₂O₂) por acción de la catalasa (CAT), usando como agente reductor al H₂O₂ y como sustrato un alcohol o fenol.

Glutación peroxidasa (GPx). Es una selenoproteína que en su centro catalítico tiene una selenocisteína. Este aminoácido es un análogo a la cisteína, pero en vez de contener un grupo tiol (contiene azufre) posee un grupo selenol (que contiene selenio). La función catalítica de esta enzima consiste en la conversión de H₂O₂ en H₂O, usando al GSH (Reacción 5) (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008).



Reacción 5. Reacción catalizada por la glutación Peroxidasa (GPx). La reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se lleva a cabo mediante la oxidación de glutación (GSH) produciendo 2 moléculas de agua (H₂O) y 1 de glutación oxidado (GSSG).

Esta familia de enzimas contiene una triada catalítica compuesta por selenocisteína, glutamina y triptófano en su centro catalítico. Existen cuatro isoenzimas de GPx, que son dependientes de Se. La GPx citosólica (GPx-1 o cGPx), la GPx gastrointestinal (GPX-2 o GPx-GI), la GPx plasmática (GPx-3 o pGPx) y la GPx de fosfolípidos (GPx-4 o PHGPx). GPx 1 y 2 reducen rápidamente el H₂O₂ y los hidroperóxidos (Reacción 6). La GPx-3 posee una débil actividad para reducir hidroperóxidos de colesterol; sin embargo, la GPx-4 puede reducir eficazmente los hidroperóxidos de fosfolípidos, pero de manera ineficaz H₂O₂ (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008; Nordberg & Arnér, 2001).



Reacción 6. Reducción de hidroperóxidos (ROOH) dependiente de glutatión (GSH) a ácidos grasos por la glutatión Peroxidasa (GPx). En todos los casos el grupo peróxido (ROOH) es reducido aun alcohol (ROH).

El mecanismo catalítico propuesto para la reducción del H_2O_2 por la GPx involucra la oxidación del sitio activo selenolato a ácido selénico (SeOH). Mediante la adición de una molécula de GSH, el ácido selénico es transformado a un aducto con GSH llamado selenilsulfuro (Se-SG), el cual es un selenolato y GSSG mediante la adición de otra molécula de GSH (Nordberg & Arnér, 2001).

Glutatión Reductasa (GR). Es una flavoproteína que se encuentra en el citoplasma y posee en un sitio activo FAD. Se encarga de restablecer el nivel de GSH debido a que cataliza la reducción del GSSG empleando al NADPH como fuente de electrones (Jones, 2002).

Glutatión S-Transferasa (GST). Es una familia de enzimas que catalizan reacciones intracelulares de detoxificación, incluyendo la inactivación de electrófilos mediante su conjugación al GSH. Las GSTs tienen diversos sustratos como lípidos peroxidados y alquenes (Kohen & Nyska, 2002). Hasta ahora se han descrito 8 isoenzimas identificadas como alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta. Se localizan en el citosol y tienen una estructura dimérica con un peso de 45-55 KDa.

Hemoxygenasa 1 (HO-1). Esta enzima cataliza la degradación del grupo hemo a monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina. La HO-1 es una enzima inducible de 32 KDa. La expresión de esta enzima ocurre como respuesta a una gran variedad de estímulos como el grupo hemo, radiación UV, hipoxia, hiperoxia, hipertermia, isquemia, H_2O_2 , etc. La acción protectora de la HO-1 en la isquemia cerebral se ha asociado con el CO y la biliverdina. El CO actúa como vasodilatador, inhibe genes proinflamatorios, aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias, actúa como antiapoptótico, etc.; mientras que, la biliverdina es una molécula

antioxidante que atrapa radical lipoperoxilo, $^1\text{O}_2$, ROO^\cdot , $^\cdot\text{OH}$, $^\cdot\text{ON}$ y ONOO^- (Orozco-Ibarra & Pedraza-Chaverrí, 2008).

Tiorredoxinas (Trx). El sistema tiorredoxina está formado por dos enzimas antioxidantes oxidoreductasas, la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR) (Nordberg & Arnér, 2001). La Trx forma parte de una familia de proteínas pequeñas (12 KDa) encontradas en un gran número de especies (Hernández & Bucio, 2008). La actividad de la Trx depende de su ubicación. En el citoplasma actúa como antioxidante y cofactor, en el núcleo regula la actividad de algunos factores de transcripción y en la mitocondria desempeña una función importante en la supervivencia celular durante el desarrollo embrionógico. Su centro catalítico está formado por dos cisteínas que se encuentran en forma de ditiol ($-\text{SH}_2$) en la enzima reducida ($\text{Trx}-(\text{SH})_2$), y que pueden oxidarse reversiblemente a disulfuro de cisteína ($\text{Trx}-\text{S}_2$). (Hernández & Bucio, 2008).

Las Trx reduce proteínas que tienen disulfuros como la ribonucleótido reductasa y algunos factores de transcripción como p53, NF- κ B, etc. (Nordberg & Arnér, 2001).

La TrxR es la única enzima conocida capaz de reducir el sitio activo de la Trx. Es una proteína homodimérica que contiene dinucleótidos de flavina y adenina, con un residuo de selenocisteína en su sitio activo. Se han identificado dos isoenzimas, la TrxR-1 de 54.4 KDa que es citosólica y la TrxR-2 de 56.2 KDa que es mitocondrial. La principal actividad de la TrxR es reducir el disulfuro oxidado de la Trx usando al NADPH como donador de electrones (Hernández-Pérez E & Bucio-Ortíz L, 2008; Nordberg & Arnér, 2001).

11. VÍA KEAP 1/Nrf2/ARE.

La inducción de la respuesta de fase 2, requiere de por lo menos tres componentes esenciales: 1) el elemento de respuesta antioxidante (ARE), que es una secuencia reguladora río arriba presente en cada gen de enzimas y proteínas de fase 2, tanto en una como en diversas copias; 2) el factor nuclear eritroide2-

relacionado al factor 2 (Nrf2), que es un factor de transcripción que se heterodimeriza con miembros de la familia pequeña Maf y se une a ARE para reclutar la maquinaria general de transcripción y de esta forma que se expresen los genes regulados por ARE; y 3) la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1), que es una proteína represora citosólica que se une a Nrf2, reteniéndolo en el citoplasma y promoviendo su degradación proteosomal (Dinkova-Kostova et al., 2005).

Keap1 tiene tres dominios funcionales, el dominio BTB/POZ, IVR (regiones intermedias) y el dominio Kelch/DGR (repeticiones dobles de glicina) (Kaspar et al., 2009; Lau et al., 2008; Watai et al., 2007). Keap 1 Actúa como un sensor del estrés oxidante en el citoplasma y en condiciones normales mantiene al factor Nrf2 secuestrado en el citoplasma (Kaspar et al., 2009; Watai et al., 2007).

El factor Nrf2 es un miembro de la subfamilia de factores transcripcionales cap 'n' collar (CNC). Nrf2 tiene 6 dominios conservados nombrados como Neh1 a Neh-6. El dominio Neh1 contiene un tipo-CNC cierre básico de leucinas, que es necesario para la unión al DNA y la dimerización con otros factores de transcripción. El dominio Neh2 es el sitio de unión para el dominio Kelch de Keap1, este dominio tiene 7 residuos de lisina que son responsables de la ubiquitinación, llevando a Nrf2 a la degradación proteosomal. El dominio Neh3 es necesario para la activación transcripcional mediante el reclutamiento de CHD6. Los dominios Neh4 y Neh5 son dominios ricos en residuos ácidos que actúan sinérgicamente e interactúan con la unión a la proteína CREB (CBP). Finalmente, el dominio Neh6 que presenta un alto contenido de residuos de serina y poco se sabe de su función (Lau et al., 2008). El factor Nrf2 es esencial para la inducción de los genes que codifican para las enzimas y proteínas de la respuesta de fase 2 (Surh et al., 2008).

Finalmente, ARE es un elemento de respuesta transcripcional que actúa en *cis* y se localiza en la región promotora de genes que codifican para enzimas detoxificantes de fase 2 (Nguyen et al., 2009). La secuencia definida para esos elementos es 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (Coople et al., 2008).

En condiciones normales (Figura 10A), el Nrf2 se mantiene en el citoplasma formando un complejo inactivo unido a un dímero de Keap1. Este último se encuentra en el citoplasma unido al citoesqueleto, específicamente a la actina mediante el dominio IPP Kelch, lo cual hace que retenga a Nrf2 con una mayor fuerza en el citoplasma. La interacción de Keap1/Nrf2 se lleva a cabo a través del dominio Neh2 de Nrf2 con el dominio DC en Keap1. Se ha propuesto un modelo de interacción entre Keap1 y Nrf2 llamado bisagra y pestillo (hinge and latch) mediante los motivos ²⁹DLG³¹ y ⁷⁹ETGE⁸². El modelo sugiere que la unión de gran afinidad del motivo ETGE proporciona la bisagra, a través de la cual Nrf2 puede moverse relativamente libre en el espacio. Por otra parte, la unión de baja afinidad provista por el motivo DLG proporciona el pestillo, que restringe a Nrf2 para tener una posición óptima de la lisina, aminoácido que es blanco para la conjugación con la ubiquitina (Coople et al., 2008; Kaspar et al., 2009; Lau et al., 2008; Surh et al., 2008; Watai et al., 2007).

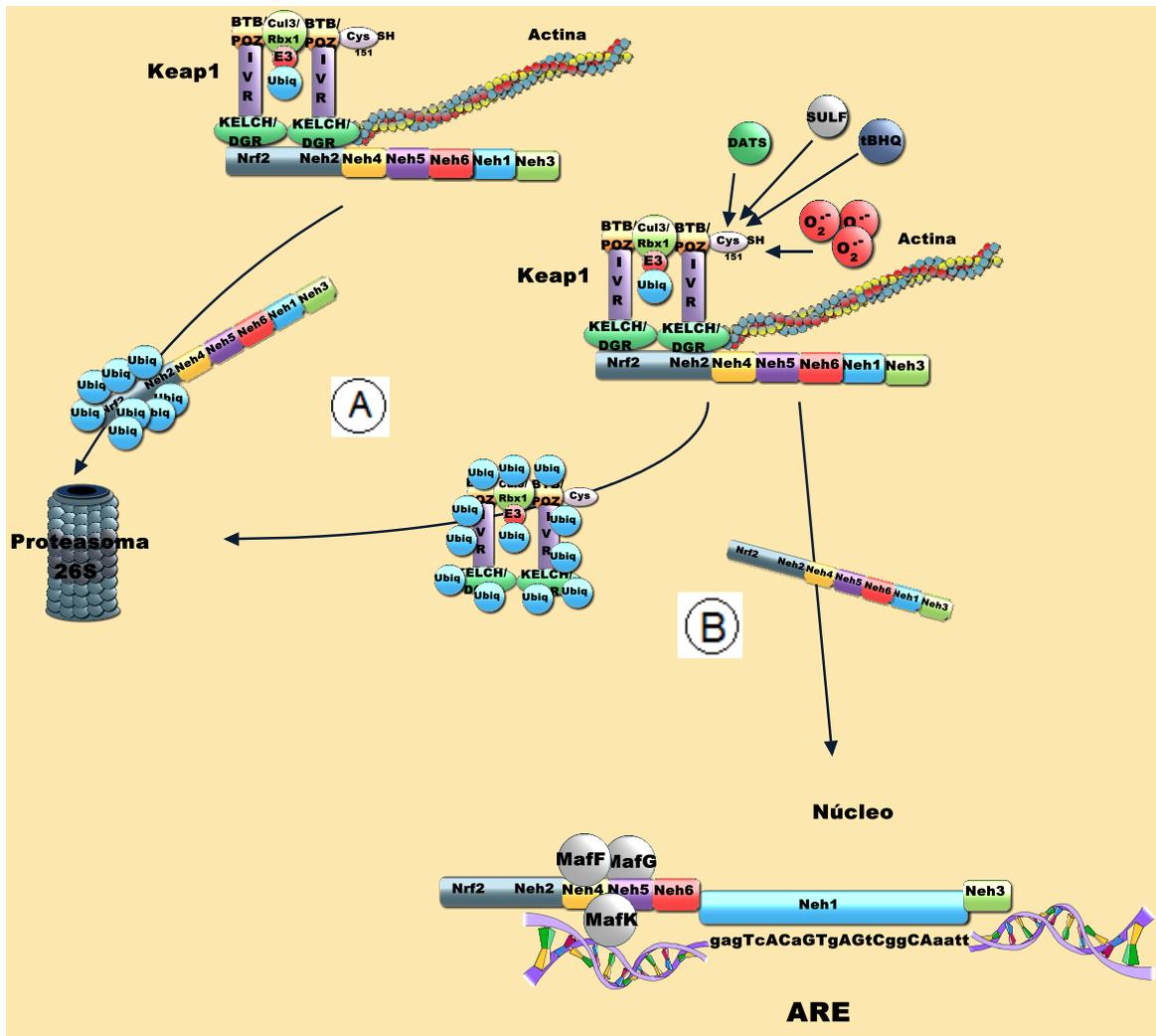


Figura 10. Activación del factor de transcripción Nrf2. (A) En condiciones normales, Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por Keap1 y es ubiquitinado y degradado vía proteasoma (lado izquierdo de la imagen). (B) En condiciones de estrés o por algunos compuestos, Nrf2 se libera de Keap 1 y es traslocado al núcleo donde, se dimeriza con proteínas Maf y se une a la región ARE.

Además de retener en el citoplasma a Nrf2, la proteína Keap1 sirve como sustrato adaptador para el complejo Culina 3/Rbx1 –dependiente de E3 ubiquitin ligasa. La proteína Keap1 se une con Cul3 a través del dominio BTB/POZ y Nrf2 se une a través del dominio Kelch promoviendo la ubiquitinación y la degradación de Nrf2 a través del proteasoma 26S (Figura 10A). En condiciones basales, el tiempo de vida media de Nrf2 es de 10 a 30 min; sin embargo, al aumentar el estrés oxidante

el tiempo de vida media se incrementa a 51 min (Coople et al., 2008; Kaspar et al., 2009; Lau et al., 2008; Surh et al., 2008; Watai et al., 2007).

La proteína Keap1 es rica en cisteínas que sirven como un sensor del estado redox y electrofílico. Dentro de las cisteínas más importantes se encuentran la Cys 151, ubicada en el dominio BTB, la Cys 272 y la Cys 288, estas dos últimas ubicadas en el dominio IVR (Watai et al., 2007). La modificación química de la Cys 151 mediante ERO, prooxidantes, electrófilos o agentes inductores de las enzimas de fase 2 (sulfurafano, curcumina, S-alilcisteína, t-butilhidroquinona, dialiltrisulfuro, etc.) promueven la disociación de Nrf2 de Keap1, mientras que las Cys 272 y 288 son esenciales para la actividad represora de Keap1 en condiciones basales. Por otra parte la modificación de la Cys 151 en Keap1 provoca un cambio conformacional en el complejo Keap1-cul3 E3, resultando en la ubiquitinación de Keap1, lo que promueve su degradación proteosomal y la liberación de Nrf2 (Figura 10B) (Coople et al., 2008; Kaspar et al., 2009; Lau et al., 2008; Surh et al., 2008).

Al liberarse Nrf2 de Keap1, éste se dirige al núcleo donde se une a la secuencia ARE. La región básica de Nrf2, justo arriba de la región del cierre de leucinas, es la responsable de la unión al ADN, mientras que la región ácida es requerida para la activación transcripcional, mediada por ARE y que requiere de la heterodimerización de Nrf2 con otras proteínas bZIP incluyendo Jun (c-Jun, jun-D y Jun-B) y proteínas Maf (MafG, MafK, MafF) (Kaspar et al., 2009), para que finalmente se expresen las enzimas de fase 2.

Aunque Keap1 es el mayor regulador de la activación de Nrf2, se ha observado que la fosforilación de Nrf2 por diferentes cinasas, como la proteína cinasa C (PKC), la cinasa extracelular regulada (ERK), la cinasa Jun N-terminal (JNK) o la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) también participan en la activación de este factor (Lau., et al., 2008).

La lesión provocada por la IR induce el aumento del ARNm de varias enzimas de fase 2 (aldehído deshidrogenasa, NADPH quinona oxidoreductasa, GST) en riñón

(Leonard et al., 2007). Por otro lado, también se ha demostrado que la hipoxia/reoxigenación aumenta la traslocación de Nrf2 al núcleo y aumenta la expresión de las enzimas de fase 2 (Leonard et al., 2007).

Dado que el daño por IR es estrés oxidante es un mecanismo importante que participa en la muerte neuronal, la inducción de una respuesta antioxidante propia podría ser una excelente terapia en este padecimiento. En este contexto actualmente existen diferentes compuestos que son capaces de activar al factor Nrf2 e inducir las respuestas de fase 2, uno de ellos es el dialiltrisulfuro (DATS), del cual hablaremos a continuación.

12. DIALIL TRISULFURO.

El ajo es un miembro de la familia Amaryllidaceae que se ha cultivado desde tiempos ancestrales (Mathew & Biju, 2008). Actualmente es un ingrediente importante en la dieta humana y también es usado en la medicina tradicional (Fisher et al., 2007; Saleem et al., 2006). Numerosos estudios han demostrado que el ajo y sus componentes tienen diversas propiedades biológicas como antioxidantes, antitumorogénicos, antiateroscleróticos, detoxificadores, antiinflamatorios, etc. (Aguilera et al., 2010; Ali et al., 2000; Colín-González et al., 2012; Fisher et al., 2007; Fukao et al., 2004; Fukushima et al., 1997).

En el mercado existen diferentes presentaciones del ajo, una de ellas es el aceite de ajo cuyo componente mayoritario es el DATS (Guo et al., 2011). El precursor inicial de este compuesto es la γ -glutamil cisteína, que se transforma en aliina y por acción de la alinasa, ésta se convierte en alicina, la cual se descompone en diferentes compuestos organosulfurados solubles en aceite, como el dialil sulfuro, el dialil disulfuro, el DATS (Figura 11), entre otros (Herman-Antosiewicz & Singh, 2004). El DATS se encuentra en un 41.5% en el aceite de ajo (Fukao et al., 2004) y se obtiene por destilación en vapor (Maldonado et al., 2009). Aproximadamente se obtienen de 0.2 a 0.5 mL de aceite de ajo por cada 100 g de ajo (Fukao et al., 2004).

El DATS ($C_6H_{10}S_3$) es un compuesto organosulfurado, soluble en acetona y parcialmente en 2-propanol, su peso molecular es 178.3386 g/mol y su densidad de 1.116 g/mL (LKT Laboratories Inc., 2012). Este compuesto presenta diversas propiedades en modelos animales como: fungicida (Davis, 2005), anticoagulante (Chan, 2007), protege contra el daño producido en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (Guo et al., 2011), entre otros.

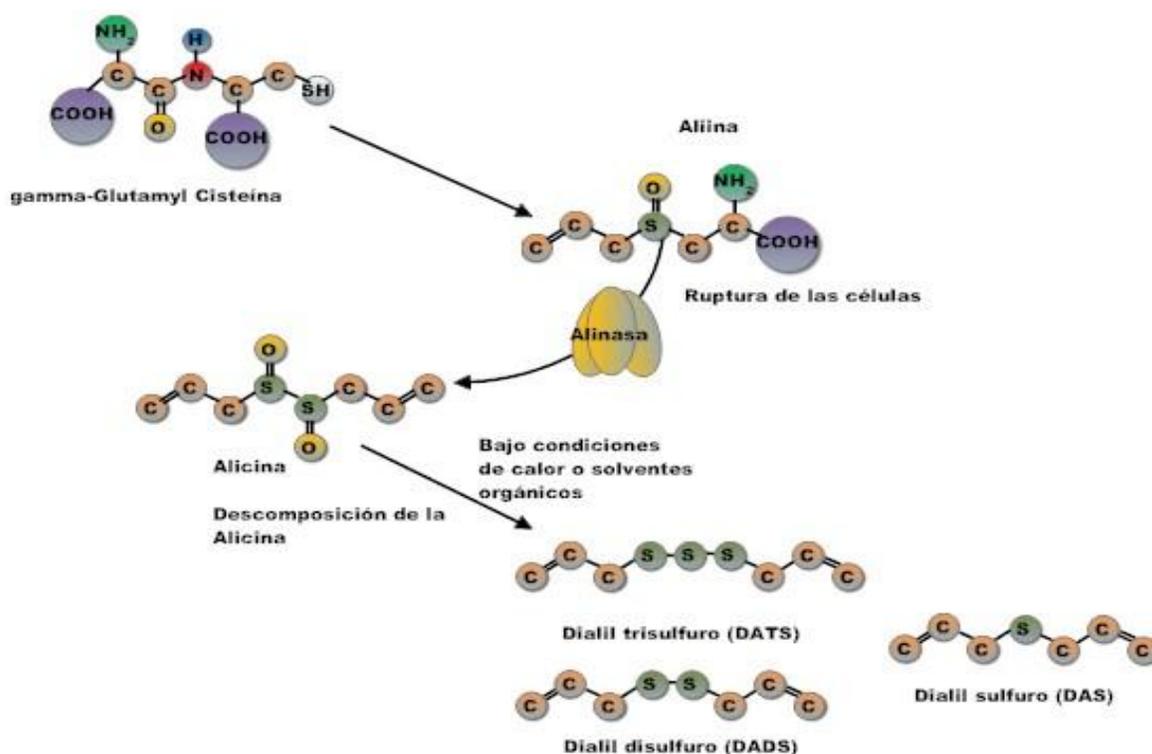


Figura 11. Ruta de síntesis del DATS. El DATS proviene de la γ -Glutamyl cisteína que se transforma en aliina y después en alicina por acción de la alinasa, la cual finalmente se descompone en dialilsulfuro, dialildisulfuro y dialiltrisulfuro.

Se han realizado estudios farmacocinéticos del DATS en ratas empleando un producto comercial llamado Chentian® y una microemulsión libre de aceite (Li et al., 2011). Después de una administración intravenosa de DATS (30 mg/Kg), en ambos preparados se observó una fase de distribución relativamente rápida (0-0.5 h) y una fase de eliminación lenta (3-36 h). Se obtuvieron concentraciones

máximas en plasma de 7.06 y 8.85 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente en un tiempo de 3 h para ambos. El tiempo de vida media fue similar en ambos compuestos 9.89 y 10.38 h, mientras que el área bajo la curva calculada de 0 a 36 h, el aclaramiento y el volumen aparente de distribución presentaron diferencia entre ambas presentaciones, para la microemulsión: 7.06 $\mu\text{g/h/mL}$, 16.09 mL/h/Kg y 232.07 mL/Kg, respectivamente y para el producto Chentian®: 45.01 $\mu\text{g/h/mL}$, 19.35 mL/h/Kg y 319.8 mL/kg, respectivamente.

También se han realizado estudios *in silico* para la determinación de algunos parámetros físico-químicos y farmacocinéticos del DATS, como el coeficiente de partición en octanol/agua (2.877), la solubilidad en agua (18.4 mg/L) y la absorción a través de la barrera hematoencefálica (1.703 [cerebro]/[sangre]) y el intestino (96.45%) (Kim et al., 2006).

Por otro lado, el DATS presenta propiedades de antioxidante directo al atrapar ERO y de antioxidante indirecto al inducir la respuesta de fase 2. Kim et al. (2006) informaron que el DATS tiene la capacidad de atrapar O_2^- incluso esta capacidad es mucho mayor que la de la SOD y que la de la vitamina C. También se ha descrito que el DATS es capaz de atrapar ONOO^- (Kim et al., 2006).

Además de la actividad de antioxidante directo, el DATS es capaz de inducir enzimas de fase 2 como la quinona reductasa, la GST y la GPx en el hígado de ratas sometidas a daño por tetracloruro de carbono. El incremento en la actividad de estas enzimas fue mayor que la que se observó con el dialil disulfuro y a una dosis 10 veces menor. Al mismo tiempo el DATS disminuyó la actividad de la aspartato amino transferasa y la lactato deshidrogenasa, dos enzimas que son marcadores de daño hepático en el plasma (Fukao et al., 2004). Por otra parte, el DATS indujo un aumento en la cantidad de proteína y la actividad de la GST, la GPx y la GR en células hepáticas de rata (Wu et al., 2002), así como un incremento en el nivel de GSH (Wu et al., 2004).

También se ha encontrado que el DATS aumenta la expresión de la HO-1 en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (Guo et al., 2011). Fisher et al (2007),

encontraron que el DATS aumenta la cantidad de ARNm de la enzima NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1; mientras que en ratones knockout Nrf2^{-/-}, la expresión del ARNm es menor. Del mismo modo, Chen et al (2004), encontraron que el DATS incrementa la cantidad de ARNm de la HO-1 y la NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1, y que este aumento está asociado con la activación de ARE y con un incremento en la cantidad de proteína de Nrf2 de forma dosis dependiente. Todos estos resultados sugieren que la activación de las enzimas de fase 2 por parte del DATS, está relacionado con la activación de la vía Nrf2/ARE.

Hasta ahora no había estudios sobre el efecto del DATS en modelos experimentales de isquemia cerebral; sin embargo, gracias a sus propiedades de antioxidante directo e indirecto, es posible que la evaluación de su efecto protector sea prometedora.

IV. JUSTIFICACIÓN.

La enfermedad cerebrovascular es un problema de salud en México y en el mundo, ya que representa la quinta y la tercera causa de muerte, respectivamente (Candelario-Jalil, 2008; INEGI, 2010; Markus, 2011) y la primera de discapacidad en adultos, debido a que el 70% de los casos, se presenta en adultos mayores de 65 años (Lakhan et al., 2009). Además, se espera que su incidencia aumente conforme la población vaya envejeciendo (Margaill et al., 2005).

Particularmente la enfermedad cerebrovascular de tipo isquémico (Allen & Bayraktutan, 2008; Lakhan et al., 2009; Mergenthaler et al., 2004), tiene una prevalencia del 85% (a nivel mundial) y actualmente no existe un tratamiento o terapia que sea eficaz contra el daño y las alteraciones conductuales que se producen en los pacientes que han sufrido un infarto cerebral; por tal motivo es necesario desarrollar protocolos dirigidos a mejorar la calidad de vida de estos pacientes, enfocados a proteger y preservar el área de penumbra, ya que se ha determinado en pacientes que el 45% del área final afectada permanece viable hasta 12 h posterior al evento isquémico (área de penumbra) (Díez-Tejedor, 2006).

La fisiopatología de la enfermedad isquémica está relacionada con el proceso excitotóxico, el aumento del estrés oxidante, el daño a la barrera hematoencefálica, la inflamación y la muerte celular. El estrés oxidante es uno de los factores que causan más daño en el evento isquémico, por tal motivo el uso de terapias antioxidantes está justificada.

El dialil trisulfuro (DATS) ejerce un efecto protector en diferentes modelos de enfermedades crónico-degenerativas (aterosclerosis, hipertensión, enfermedad de Alzheimer, etc.), así como en modelos de isquemia-reperusión, cuya patogénesis está asociada al estrés oxidante (Maldonado et al., 2009). Se han propuesto dos mecanismos de acción para este compuesto: 1) como antioxidante directo ya que reacciona directamente con diferentes especies oxidantes; y 2) como antioxidante

indirecto, a través de la inducción de las enzimas de fase 2, mediante la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE (Silva-Islas et al., 2012).

Actualmente se han evaluado diversos compuestos antioxidantes (S-alilcisteína, dialil disulfuro, aceite de ajo) en modelos experimentales de isquemia-reperfusión, disminuyendo satisfactoriamente el daño provocado a las 24 h (Ashafag et al., 2012; Gupta et al., 2003; Lin et al., 2012), pero son pocos los compuestos que presentan un efecto protector hasta los 7 días, con una disminución del daño provocado por IR poco satisfactoria, como el ginsenosido Rd (Ye et al., 2011). Por tal motivo, en este trabajo se pretende evaluar el efecto del DATS sobre las alteraciones conductuales, morfológicas y bioquímicas que se inducen en un modelo de isquemia-reperfusión cerebral a los 7 días posteriores a la lesión isquémica. Además, se estudiará el mecanismo a través del cual el DATS ejerce dicho efecto, poniendo especial énfasis en su capacidad de activar al factor Nrf2 y la subsiguiente activación de las enzimas de fase 2.

V. HIPÓTESIS.

Si el estrés oxidante es un mecanismo clave en la inducción de la muerte neuronal durante la IR cerebral, es probable que la administración al inicio de la reperfusión de DATS, un antioxidante directo e indirecto, disminuya el daño conductual y morfológico provocado por la IR, debido a que puede inducir el factor de transcripción Nrf2 y aumentar las defensas antioxidantes en el cerebro, previniendo así que la zona de penumbra, progrese a zona de infarto.

VI. OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

Evaluar el efecto del DATS sobre los cambios bioquímicos, conductuales y morfológicos que se inducen en un modelo de IR cerebral en rata.

2. Objetivos particulares.

- Establecer un esquema de administración del DATS que presente un efecto protector ante el daño inducido por la IR cerebral.
- Evaluar el efecto del DATS sobre el daño histológico y el déficit neurológico que se inducen en un modelo de IR cerebral.
- Evaluar el efecto del DATS sobre la activación del factor de transcripción Nrf2.
- Evaluar el efecto del DATS sobre la cantidad de proteína y actividad de las principales enzimas de fase 2.

VII. METODOLOGÍA.

1. Reactivos.

El DATS se obtuvo de LKT laboratorios (St. Paul, MN, USA). El tritón, el etilen diamina tetraacetato (EDTA), el nonidet P-40, el folin y el GSH, se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos policlonales contra SOD 2, SOD 1 y GST se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

El kit de ELISA TransAM para detectar la activación del factor Nrf2 se obtuvo de Active Motif (Carlsbad, CA, USA) y el Kit Universal L SAB-System HRP para la detección por inmunohistoquímica se obtuvo de DAKO (Carpinteria, CA, USA).

Todos los demás reactivos que se usaron fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

2. Animales.

Durante el desarrollo del protocolo, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 280-320 g de peso, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Los animales se colocaron en cajas de acrílico, cada una con 4 ratas y se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Los animales tuvieron libre acceso al alimento (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feed Inc., Richmon, IN, USA) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Durante el desarrollo experimental, se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

3. Diseño experimental.

El diseño experimental se realizó en dos etapas. En la primera etapa se estableció el esquema de dosificación y en la segunda, utilizando el esquema en el que se observó la mayor protección, se cuantificaron diversos parámetros para evaluar el efecto protector.

En la primera etapa se emplearon los siguientes grupos (n=4) con diferentes tiempos de isquemia y reperusión:

A) 1 h de isquemia y 24 h de reperusión.

- CT: Control.
- IR: 1 h de isquemia y 24 h de reperusión.
- DATS 40, 4c/48: DATS 40 mg/kg con 4 administraciones cada 48 h por vía i.g.
- DATS 15, 4c/24: DATS 15 mg/Kg con 4 administraciones cada 24 h por vía i.g.
- IR+DATS 40, 4c/48: 1 h de isquemia y 24 h de reperusión + DATS 40 mg/kg con 4 administraciones cada 48 h por vía i.g.
- IR+DATS 15, 4c/24: 1 h de isquemia y 24 h de reperusión + DATS 15 mg/kg con 4 administraciones cada 24 h por vía i.g.
- IR+DATS 40, 1: 1 h de isquemia y 24 h de reperusión + DATS 40 mg/Kg con 1 administración por vía i.g.

B) 1 h de isquemia y 168 h de reperusión.

- CT: Control.
- IR: 1 h de isquemia y 168 h de reperusión.
- IR+DATS I: 1 h de isquemia y 168 h de reperusión + DATS 15 mg/Kg con 1 administración por vía i.p.
- IR+DATS IV: 1 h de isquemia y 168 h de reperusión + DATS 15 mg/Kg con 4 administraciones cada 24 h por vía i.p.

C) 2 h de isquemia y 24 h de reperusión.

- CT: Control.
- IR: 2 h de isquemia y 24 h de reperusión.
- IR2+DATS 40, 1: 2 h de isquemia y 24 h de reperusión + DATS 40 mg/Kg con 1 administración por vía i.g.

Se emplearon los esquemas anteriores debido a que nos interesaba evaluar el efecto terapéutico y profiláctico del DATS. La selección de las dosis empleadas se realizó en base a reportes previos donde usan estas dosis en otros modelos experimentales y han mostrado un efecto protector (Fisher et al., 2007). Por otro lado, se empleó la administración i.g. del DATS en los esquemas profilácticos, debido a que por esta vía se podría administrar el DATS en los pacientes; sin embargo, al cambiar a los esquemas terapéuticos, la vía de administración que se usó fue i.p., debido a que la incisión que se realiza a nivel de la horquilla esternal para poder inducir la isquemia, dificulta la manipulación de los animales. Además al administrar intraperitonealmente el compuesto, esto permite disminuir la dosis debido a que la biodisponibilidad de los compuestos administrados por vía i.p. es mayor a la que se observa por vía i.g.

Se utilizó aceite vegetal como vehículo para disolver el DATS. Para la administración i.g. se utilizó una sonda de polipropileno y el compuesto se disolvió en 500 μ L del vehículo; mientras que para la administración i.p. se utilizó una jeringa de insulina y el DATS se disolvió en 200 μ L del vehículo. Las administraciones i.g. fueron preventivas (antes de la oclusión de la arteria cerebral media), mientras que las i.p. fueron terapéuticas (al inicio de la reperfusión) (Figura 12).

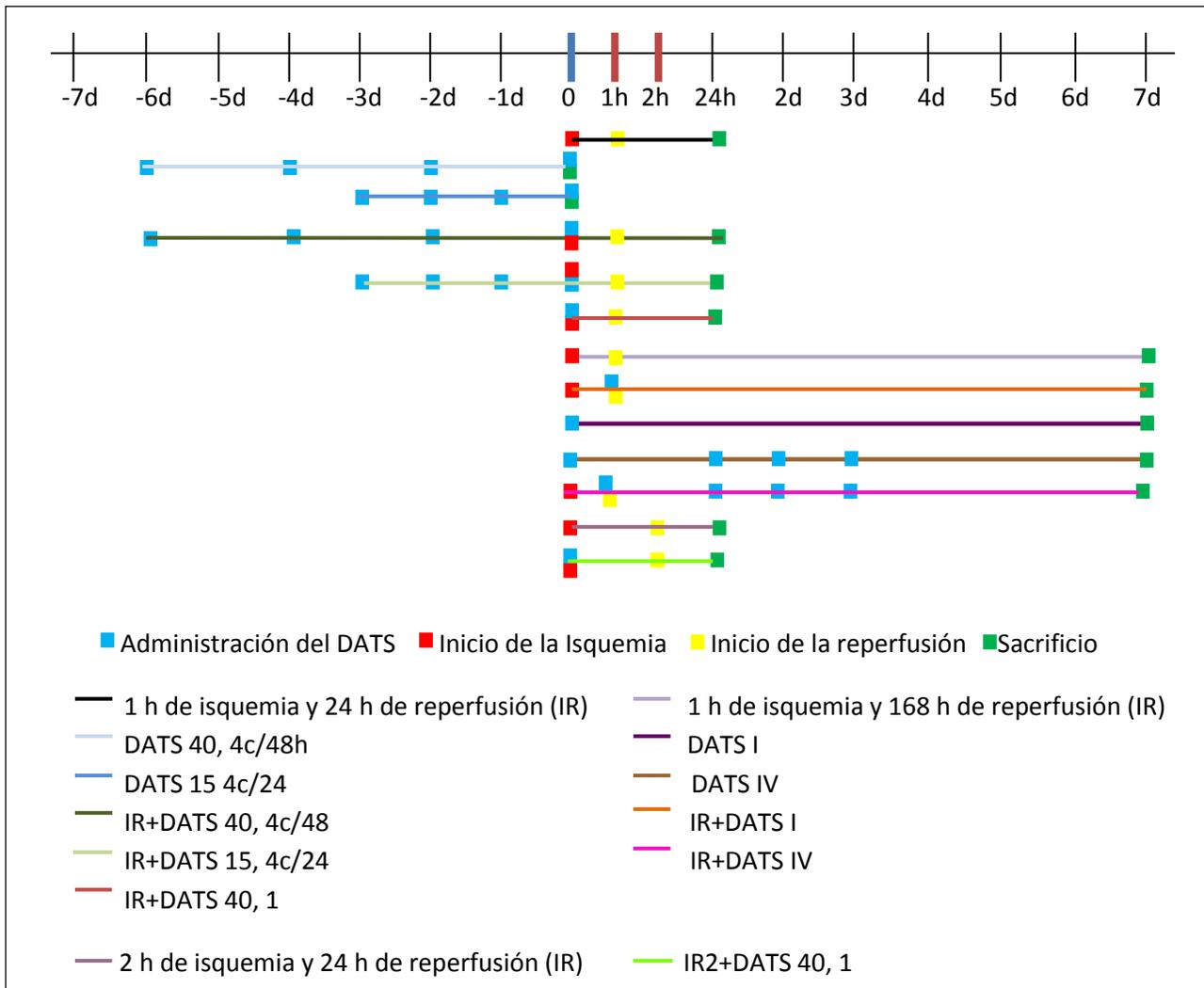


Figura 12. Dosificación del dialil trisulfuro (DATS).

Antes del sacrificio, se evaluó la conducta a todos los animales. Después los animales se anestesiaron con 500 μ L de pentobarbital y se perfundieron vía transcardíaca con SSI+heparina (500 mL/2 mL), seguido de una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Se extrajo el cerebro y se almacenó por 7 días en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Finalmente se realizó la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) como se describe más adelante, y se realizó el conteo de células vivas en la zona de penumbra del estriado izquierdo para determinar la dosis y el esquema de administración que mostrará un efecto protector.

En la segunda etapa del proyecto, se utilizaron los siguientes grupos (n=6):

- CT: Control.
- IR: 1 h de isquemia y 168 h de reperfusión.
- DATS I: DATS 15 mg/Kg con 1 administración por vía i.p.
- DATS IV: DATS 15 mg/Kg con 4 administraciones cada 24 h por vía i.p.
- IR+DATS I: 1 h de isquemia y 168 h de reperfusión + DATS 15 mg/Kg con 1 administración por vía i.p.
- IR+DATS IV: 1 h de isquemia y 168 h de reperfusión + DATS 15 mg/Kg con 4 administraciones cada 24 h por vía i.p.

El DATS se administró al inicio de la reperfusión disuelto en 200 μ L de vehículo. A todos los animales sometidos a la cirugía, se les midió la conducta 5 min antes de la administración del DATS y antes del sacrificio.

Los animales utilizados en la histología e inmunohistoquímica se perfundieron como se mencionó anteriormente y la cuantificación de ambos parámetros se realizó en la corteza y en el estriado. Por otro lado, la cuantificación de la activación del factor Nrf2 se realizó en la corteza frontal ipsilateral y la actividad enzimática se realizó en el estriado y en la corteza ipsilateral.

Los estriados se homogenizaron en 500 μ L de amortiguador de lisis pH 7.9 (tris base 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM, tritón 1% e inhibidores de proteasas 1X). El homogenizado se centrifugo a 20,817 x g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

4. Inducción de la isquemia cerebral.

La inducción de la isquemia cerebral se realizó mediante la oclusión de la arteria cerebral media siguiendo el método propuesto por Longa et al. (1989).

Los animales se anestesiaron en una cámara con una mezcla de isofluorano/O₂/N₂ 2.5/20/80%. La cirugía se inició con una incisión longitudinal de 1 cm en la región supraesternal en dirección cefálica para exponer la arteria carótida interna, externa y común. Se cauterizaron y cortaron las arterias occipital, tiroideas y pterigopalatina. Seguido de esto, se realizó tracción con una seda en la región

distal del nacimiento de la arteria carótida externa, se cuaterizó y cortó por arriba de la seda, de igual forma se realizó tracción a la región del nacimiento de la arteria carótida externa, omitiendo la cauterización. Por debajo de la sutura se colocó un clip y se realizó una micro incisión en la arteria carótida externa en el espacio comprendido entre las dos suturas por donde se introdujo un filamento de nylon (3-0) de 30 mm de longitud para llegar a la carótida interna y finalmente para bloquear el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media, dando inicio a la isquemia.

Transcurrido el tiempo de oclusión (isquemia), las ratas se anestesiaron nuevamente para retirar el filamento, dando inicio a la reperfusión.

5. Conducta.

La evaluación conductual se midió después de la reperfusión y antes del sacrificio. Se utilizaron 5 pruebas para evaluar la coordinación motora (Aguilera et al., 2010; Modo et al., 2000; Van der Staay et al., 1996). Se asignó un valor de 1 si las ratas presentaron la alteración y un valor de 0 cuando no la presentaron.

Movilidad espontánea: Las ratas se colocaron en una superficie plana de 1 m² y se observó que presentaran movimiento en un periodo menor a 10 seg. Las ratas con daño isquémico severo, así como aquellas con hemorragia no presentan movimiento en este periodo, y por ello fueron excluidas de este estudio.

Giros contralaterales: Los animales se tomaron de la cola y se levantaron con una inclinación de 45°, de modo que las extremidades delanteras tocaran la superficie. Se observó el comportamiento de las ratas y se contó el número de giros en un periodo de 30 seg. Las ratas lesionadas dan al menos 5 giros contralaterales a la lesión.

Prueba de colgar por la cola: Las ratas fueron levantadas por la cola a una distancia de 30 cm sobre una superficie y se observó el movimiento de las extremidades delanteras, principalmente la contralateral a la lesión. Las ratas dañadas flexionan la pata delantera contralateral a la lesión, mientras que las ratas no isquémicas extienden las patas delanteras hacia el frente.

Reflejo de agarrarse: Los animales se sujetaron por la base de la cola y se acercaron a un cable tres veces. Las ratas no dañadas se agarran simultáneamente con ambas patas, mientras que las lesionadas no pueden asirse del cable.

Sostenerse: En las ratas que presentaron el reflejo de agarrarse, se midió el tiempo que se sostenían del cable. Las ratas sin ningún daño se sostienen por lo menos 3 segundos, mientras que las lesionadas no soportan 3 segundos.

6. Histología.

Se evaluó el porcentaje de células vivas y el daño celular mediante la tinción de H&E.

Siete días después del inicio de la reperfusión los cerebros se colocaron en una solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente se colocaron en casetes de inclusión de forma individual y se deshidrataron en soluciones de etanol, xilol, para finalmente ser embebidos en parafina. Se realizaron cortes coronales de 5 μm de grosor en un micrótomos 820 Histo-Stat (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, USA) cada 100 μm , comenzando a 100 μm del inicio del estriado y cubriendo una distancia de 300 μm .

Los cortes se tiñeron con hematoxilina & eosina y se visualizaron al microscopio (Leica, Cambridge, UK) con el objetivo de 40X. Se obtuvieron imágenes de 5 campos por corte, mediante una cámara Leica DFC-300FX (Leica Microsystems Digital Imaging, Coldhams, Lane, UK), en la zona de penumbra del estriado y la corteza izquierda.

El análisis lo realizó una persona en ciego, tomando como criterio de daño neuronal núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática, daño en la integridad del neuropilo, edema intersticial, atrofia neuronal y rasgos de muerte necrótica. Los resultados se expresaron como porcentaje de células vivas.

7. Inmunohistoquímica.

La evaluación inmunohistoquímica se realizó para determinar semicuantitativamente el nivel de las enzimas de fase 2, SOD 2, SOD 1 y GST.

Cortes coronales de 5 μm se desparafinaron en xilol al 100% durante 30 min y se hidrataron en soluciones de etanol de concentración decreciente y finalmente en agua. Posteriormente los cortes se introdujeron en una solución de H_2O_2 1% durante 15 min para eliminar la actividad de la peroxidasa. Se lavaron con una solución de PBS+Tween20 0.1%. A partir de este punto, después de cada paso, los cortes se lavaron con PBS+Tween20 0.1%. Los cortes se permeabilizaron con una solución de PBS+Tritón100 0.2% durante 10 min.

Se secó el área circundante al corte y se contorneó con plumón hidrófobo (Liquid Blocker Super Pap Pen, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA), posteriormente se adicionaron 30 μL de ABS 1% como solución de bloqueo y se incubó durante 1 h en una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 30 μL del anticuerpo primario anti-SOD 1, anti-SOD 2 o antiGST diluidos 1:500 en PBS+Tween 1% y se incubó durante 16 h en una cámara húmeda.

Después se adicionaron 30 μL del anticuerpo secundario y los cortes se incubaron durante 1 h en una cámara húmeda. Se adicionaron 30 μL de estreptoavidina, se incubó 1 h en cámara húmeda y se adicionaron 30 μL de diaminobenzidina hasta el vire de color a café, evitando un sobreexposición. La reacción se detuvo lavando el corte con PBS + Tween 20 0.1%.

Los cortes se sumergieron en agua y se tiñeron con hematoxilina para contrastar, finalmente se deshidrataron en etanol de concentración creciente y por último en xilol. Los cortes se montaron con resina y se observaron al microscopio a 40X.

Se tomaron fotos de 3 campos en el estriado y 3 campos en la corteza, en ambos casos, los campos fueron circundantes al área de infarto, es decir, en la zona de penumbra. Se cuantificaron las neuronas positivas, todas aquellas que en su

citoplasma tuvieran una marca café, y también las negativas. Los resultados se expresaron como % de neuronas positivas para cada enzima por campo.

8. Preparación de los extractos nucleares.

La extracción de núcleos se realizó para evaluar la activación del factor Nrf2 mientras que la fracción citoplásmica se utilizó en la determinación de la actividad enzimática en corteza frontal. Se obtuvo la corteza frontal izquierda de cada animal, se colocaron en un homogenizador a 4°C con 500 µL de amortiguador HB pH 7.5 (HEPES 20 mM y EDTA 1 mM suplementado con DTT 1 mM, Nonidet P40 0.5% e inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X) y se incubaron en hielo durante 15 min. Se centrifugaron a 850 x g a 4°C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante (fracción citoplasmática) a un tubo de microcentrífuga frío y se almacenó a 4°C hasta su uso. El pellet se resuspendió en 500 µL de amortiguador HB pH 7.5 y se incubó en hielo durante 15 min.

Posteriormente, se adicionaron 25 µL de Nonidet P40 10% y se incubó 5 min más en hielo. Se agitó en vortex durante 10 seg a la máxima intensidad y se centrifugó a 14,000 x g a 4°C durante 30 seg. El sobrenadante se almacenó con la fracción citoplasmática, el pellet (núcleos) se resuspendió en 75 µL de Complete Lysis Buffer (TransAM Nrf2), se agitó en vortex por 10 seg a máxima intensidad y se incubó 30 min en hielo con agitación orbital a 150 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se agitaron en vortex 30 seg a máxima intensidad y se centrifugaron 10 min a 14,000 x g a 4°C. Del sobrenadante (extracto nuclear) se obtuvo una alícuota (10 µL) para la cuantificación de proteína por el método de Lowry y se almacenó a -70°C hasta su uso. La fracción citoplásmica se colocó en alícuota y se almacenó a -70°C para su uso posterior en actividad enzimática.

9. Activación del factor de transcripción Nrf2.

La cuantificación de la activación del Factor Nrf2 se realizó en extractos nucleares, empleando el kit de ELISA TransAM Nrf2 de Active Motif (Carlsbad, CA, USA).

Para ello, el Nrf2 activo y presente en la fracción nuclear se une a un oligonucleótido inmovilizado (placa de ELISA) que contiene la secuencia ARE. Posteriormente, el factor es reconocido mediante el uso de un anticuerpo primario (anti-Nrf2) y este último por un secundario, el cual está acoplado a peroxidasa de rábano, que produce una reacción colorimétrica fácilmente cuantificable por espectrofotometría.

La cuantificación se realizó en extractos nucleares, empleando el kit de ELISA TransAM Nrf2 de Active Motif (Carlsbad, CA, USA). A cada pozo se le adicionaron 40 μL de Complete Binding Buffer, seguido de 10 μL del extracto nuclear (5-20 μg) diluido en Complete Lysis Buffer. Para los controles positivos, se adicionaron 1.25 μg del extracto nuclear provisto en el kit diluido en 9.5 μL de Complete Lysis Buffer. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h a 100 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los pozos tres veces con 200 μL de Wash Buffer 1X.

Se adicionaron 100 μL del anticuerpo primario contra Nrf2, diluido 1:1000 en Antibody Binding Buffer 1X. La placa se cubrió, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h sin agitación y al final se lavó 3 veces con 200 μL de Wash Buffer 1X.

El anticuerpo secundario HRP-conjugado se diluyó 1:1000 en Antibody Binding Buffer y se adicionaron 100 μL a cada pozo, se cubrió la placa y se incubó 1 h a temperatura ambiente sin agitación. Se lavaron los pozos 4 veces con 200 μL de Wash Buffer 1X.

Finalmente, se adicionaron 100 μL de Developing Solution a todos los pozos y se incubó a temperatura ambiente de 2-15 min protegido de la luz directa. Se adicionaron 100 μL de Stop Solution y se leyó la absorbancia en un medidor de placas a 450 nm dentro de los primeros 5 min.

Durante el ensayo se utilizaron 2 pozos como blanco, 2 pozos como control positivo y 1 pozo por muestra.

10. Actividad enzimática.

La actividad enzimática cuantificada en corteza, se midió en la fracción citoplásmica proveniente de la extracción de los núcleos, mientras que la cuantificación en estriado se realizó en homogenizado total, como se describe a continuación.

10.1. Preparación de los homogenados.

Se extrajeron los estriados y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Posteriormente se homogeneizaron con 500 μL de amortiguador de lisis (tris base 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM, tritón 1% e inhibidores de proteasas 1X). El homogenado se centrifugó a 10,621 x g durante 20 min a 4°C . El pellet se desechó y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

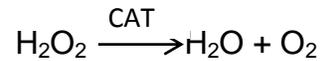
10.2. Cuantificación de proteína por el método de Lowry.

Se cuantificó la cantidad de proteína total mediante el método de Lowry, que se basa en la adición de Cu^{2+} en medio alcalino, el cual se reduce y se coordina con los nitrógenos de los grupos aminos de las proteínas, exponiendo los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas. En la segunda parte de la reacción, los residuos de tirosina y triptófano reaccionan con el reactivo de Folín (molibdato y tungstato de sodio) reduciéndolo y generando un color azul que es posible medirlo espectrofotométricamente.

Se preparó una curva patrón con albúmina (5-50 μg /200 μL) y las muestras se diluyeron 1:120. A cada muestra, blanco y estándar se le adicionaron 1 mL de solución C (50 mL de una solución de Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4% y tartrato de sodio 0.02% y 1 mL de una solución de $\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$ 5%) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de Folin 1 N con agitación y se incubó durante 30 min. Finalmente el blanco, los estándares y las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 660 nm.

10.3. Actividad de catalasa.

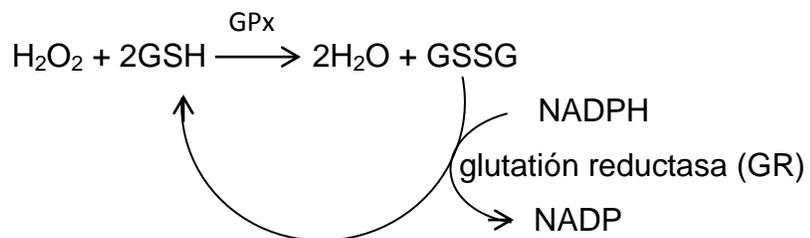
La cuantificación de la actividad de la CAT se basa en la medición espectrofotométrica de la desaparición del H₂O₂ (sustrato de la CAT), el cual absorbe a 240 nm, como se muestra en la siguiente reacción:



Se adicionaron 25 µL de la muestra sin diluir a 725 µL de la mezcla de reacción (amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 (KH₂PO₄ 6 mM y Na₂HPO₄ 4 mM). La reacción inició con la adición de 340 µL de H₂O₂ 30 mM y se midió la absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 2 min. Se usó como blanco amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0. La actividad se calculó en el intervalo de tiempo en el que la reacción fue lineal, tratándola como cinética de orden 1 y corrigiendo por la cantidad de proteína total presente en cada muestra. La actividad se expresó en k/mg proteína.

10.4. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).

La medición de la actividad de la GPx se basa en la siguiente reacción:



La cuantificación espectrofotométrica mide la desaparición del NADPH, el cual absorbe a 340nm.

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (KH₂PO₄ 30 mM y Na₂HPO₄ 20 mM), EDTA 1 mM, NaN₃ 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y GR 1 U/mL. También se preparó una solución de H₂O₂ 30mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 como sustrato de la GPx.

La actividad enzimática se cuantificó usando como blanco amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. También se utilizó un tubo inespecífico que se incubó 5 min a temperatura ambiente, compuesto por 100 μ L del amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, 800 μ L de la mezcla de reacción y 100 μ L del sustrato (H_2O_2 30mM). Las muestras se trataron como el tubo inespecífico pero en lugar de amortiguador se colocó la muestra. Se leyó la absorbancia a 340 nm cada 30 seg durante 2 min. Se obtuvo el promedio del delta de absorbancia de las muestras y se les restó el delta del tubo inespecífico, se multiplicó por un factor (0.16) proveniente del coeficiente de extinción molar del NADPH y se corrigió por la cantidad de proteína total presente en cada muestra. La actividad se expresó como U/mg proteína.

11. Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba de Tukey, usando el software Prism 5.2 (GraphPad, San Diego, CA, USA). El déficit neurológico, los niveles en la expresión de Nrf2 y la expresión de enzimas de fase 2 se analizaron con la prueba de t-student considerando como significativo un valor de $P < 0.05$.

VIII. RESULTADOS.

1. Determinación del esquema de dosificación.

El daño que se produce en el estriado tras 1 h de isquemia y 24 h de reperfusion es muy grande, debido a que la viabilidad celular se ve reducida a un 4.2%, comparado con el control que se mantiene en 87.3%. Sin embargo, al administrar 4 dosis de DATS (40 mg/Kg) cada 48 h antes de la inducción de la lesión isquémica, se ve una recuperación del tejido en un 30%, mientras que con 4 administraciones de DATS (15 mg/Kg) cada 24 h el tejido se recupera un 35.7%, sin que exista una diferencia significativa entre estos dos grupos. Por otra parte, al administrar 1 sola dosis de DATS (40 mg/Kg) antes de la lesión, la viabilidad es de 27.7% (Figura 13).

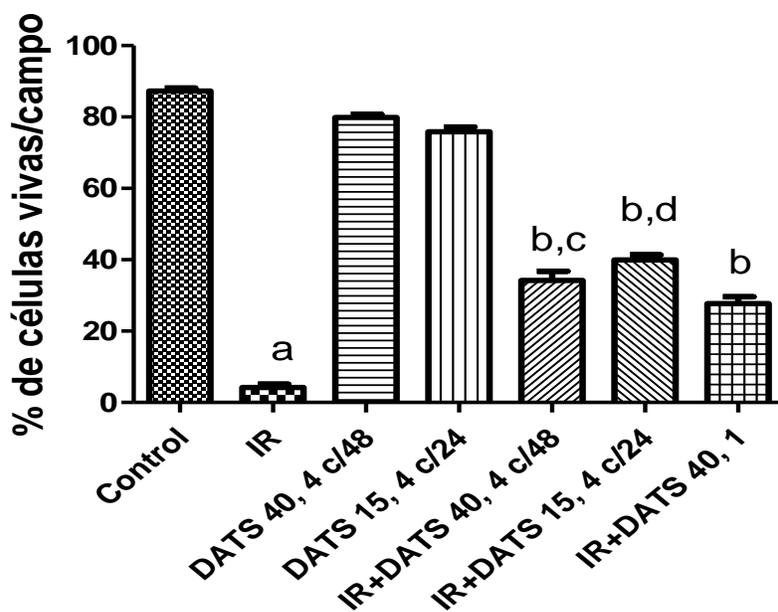


Figura 13. Porcentaje de células vivas en el estriado después de 1 h de isquemia y 24 h de reperfusion, la administración de DATS por vía i.g. se realizó antes de la inducción de la lesión isquémica (preventiva). Los grupos son Control, Isquemia/Reperfusion (IR), Control de DATS con 4 administraciones (40 mg/Kg) cada 48 h (DATS 40, 4 c/48), Control de DATS con 4 administraciones (15 mg/Kg) cada 24 h (DATS 15, 4 c/24), IR + DATS con 4 administraciones (40 mg/Kg) cada 48 h (IR+DATS 40, 4 c/48), IR + DATS con 4 administraciones (15 mg/Kg) cada 24 h (IR+DATS 15, 4 c/24) e IR + DATS con 1 administración (40 mg/Kg) (IR+DATS 40, 1). Los valores se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control, ^bP<0.001 vs. IR, ^cP<0.001 vs. DATS 40, 4 c/48 y ^dP<0.001 vs. DATS 15, 4 c/24.

La disminución de la viabilidad celular en el estriado (2.9%) es ligeramente mayor cuando los animales son sometidos a 2 h de isquemia y 24 h de reperfusion. Por otra parte, el tratamiento con 1 dosis de DATS (40 mg/Kg) previene de manera significativa el daño en un 21.5% (Figura 14).

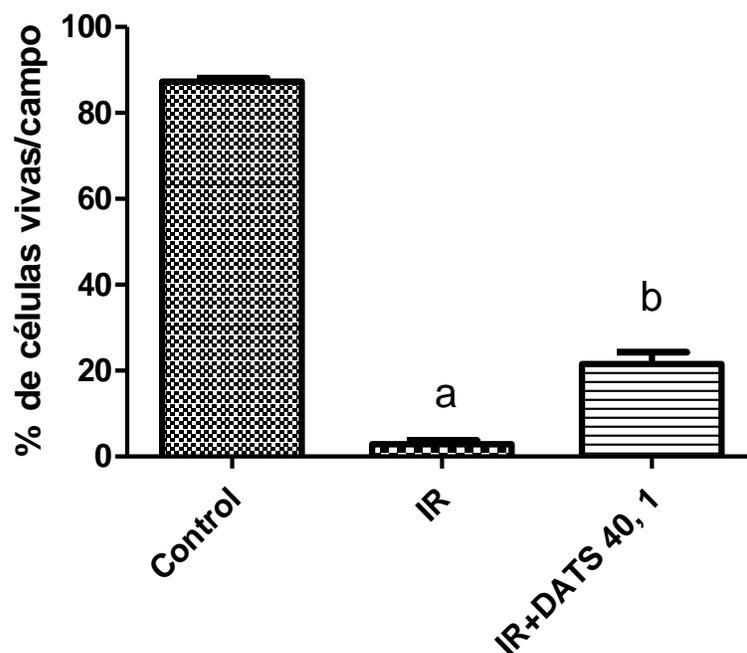


Figura 14. Porcentaje de células vivas en el estriado después de 2 h de isquemia y 24 h de reperfusion, la administración de DATS (40 mg/Kg i.g.) se realizó antes de la inducción de la isquemia. Los grupos son Control, Isquemia/reperfusion (IR) e IR + 1 administración de DATS (IR+DATS 40, 1). Los valores se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control y ^bP<0.001 vs. IR.

Finalmente, se evaluó el efecto del DATS de manera terapéutica en animales sometidos a 1 h de isquemia y 168 h (7 días) de reperfusion (Figura 15). En la gráfica se puede observar que la viabilidad en los animales con IR fue similar con 4

dosis de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) cada 24 h iniciando el esquema 3 min antes de la reperusión (70.8%) que con 1 administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) iniciando 3 minutos antes de la reperusión (63.6%).

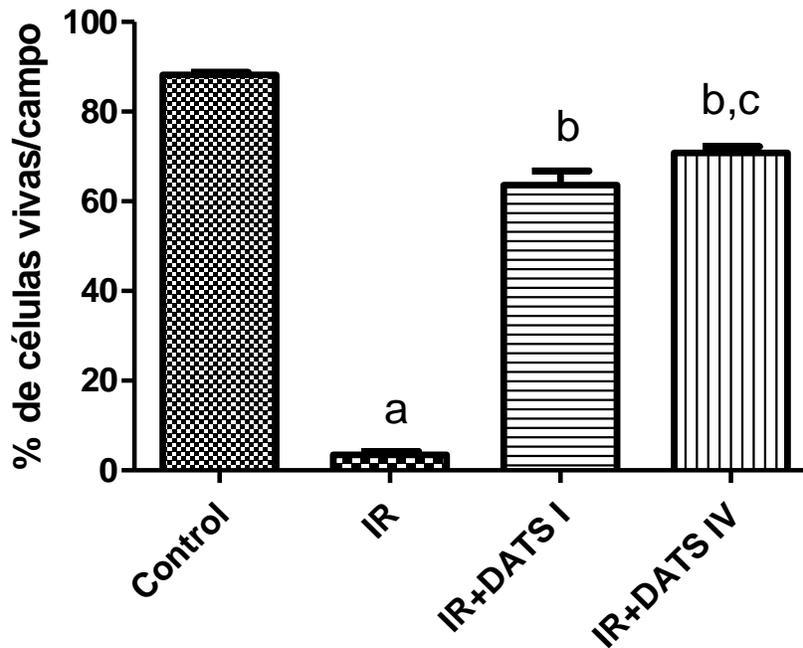


Figura 15. Porcentaje de células vivas en el estriado después de 1 h de ischemia y 168 h de reperusión, la administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperusión. Los grupos son Control, Isquemia/Reperusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control, ^bP<0.001 vs. IR y ^cP<0.05 vs. IR+DATS I.

Los resultados mostrados en las figuras 13, 14 y 15, muestran que los esquemas que presentaron el mayor efecto protector sobre la viabilidad del estriado fueron los esquemas terapéuticos: 1 dosis de DATS 15 mg/Kg al inicio de la reperusión y 4 dosis de DATS 15 mg/Kg cada 24 h comenzando la 1ª dosis al inicio de la reperusión. Por ello estos, fueron los tratamientos que se emplearon para el desarrollo de la segunda parte experimental.

2. Conducta.

En la figura 16, se muestra la evaluación conductual como marcador de daño neurológico, donde la lesión isquémica de 1 h y 168 h de reperfusión aumenta el puntaje neurológico (1.8). La administración de 1 dosis de DATS disminuyó significativamente el daño neurológico (1.14), así como 4 dosis (0.83). Entre los grupos control, DATS I y DATS IV no se observó diferencia significativa.

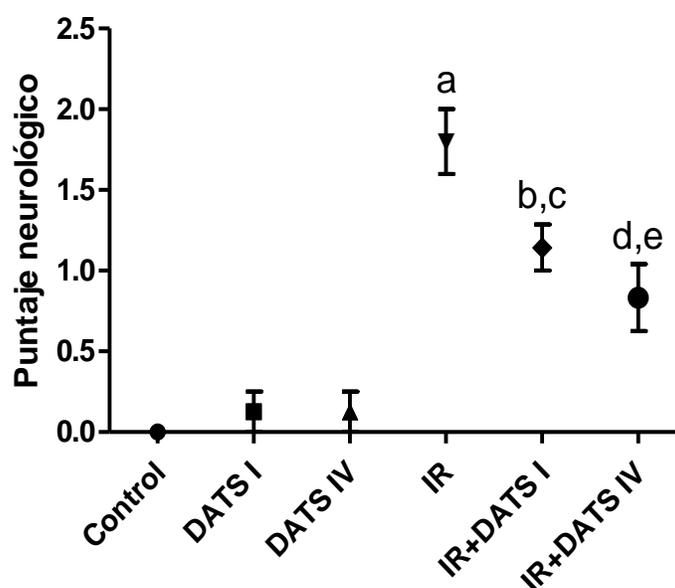


Figura 16. Evaluación neurológica 7 días después de la lesión isquémica (1 h de isquemia y 168 h de reperfusión), la administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control, ^bP<0.05 vs. IR por t-student, ^cP<0.01 vs. DATS I, ^dP<0.01 vs. IR y ^eP<0.01 vs. DATS IV.

3. Histología.

3.1. Histología en estriado.

Se realizó el análisis histológico de los diferentes grupos mediante la tinción de H&E (Figura 17) y posteriormente se hizo el conteo de las células viables en el estriado.

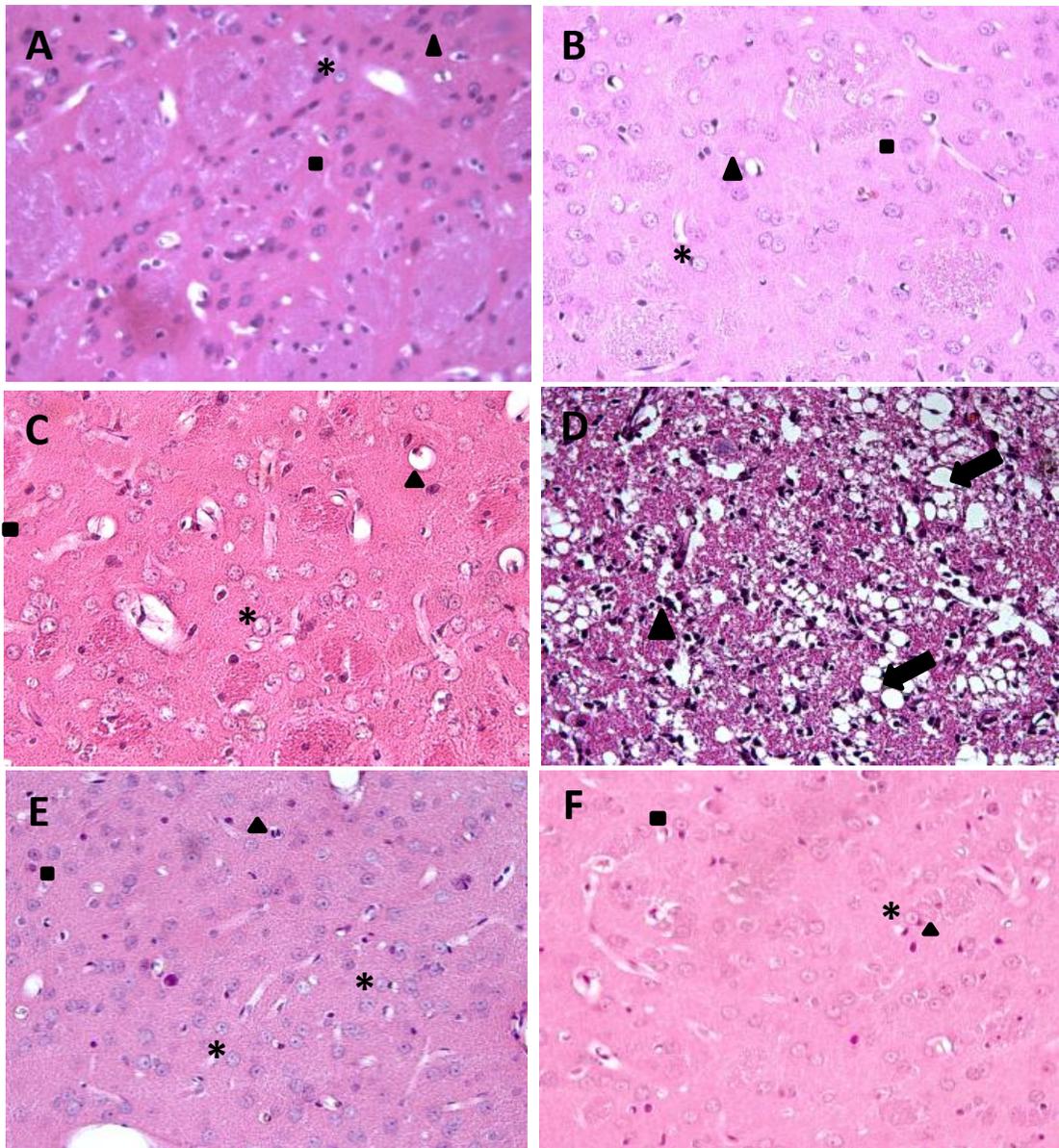


Figura 17. Efecto del DATS sobre el daño histológico inducido por la IR en el estriado. Se muestran imágenes representativas a 40X de cada grupo. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Se observa edema vasogénico en el neuropilo (flecha negra), edema citotóxico (asterisco), pincosis (triángulo negro) y células viables (cuadro negro).

El daño provocado por 1 h de isquemia y 168 h de reperfusión es muy extenso observándose claramente el daño al neuropilo, edema vasogénico, y la mayoría de las células son picnóticas (Figura 17 D). La administración de 1 y 4 dosis de DATS (15 mg/Kg) cada 24 h disminuyó el número de células picnóticas, el neuropilo se observa con mayor integridad y no se aprecia edema vasogénico, sin embargo algunas células presentan edema citotóxico (Figura 17 E y F).

En la figura 18 se presenta el conteo de las células viables en el estriado.

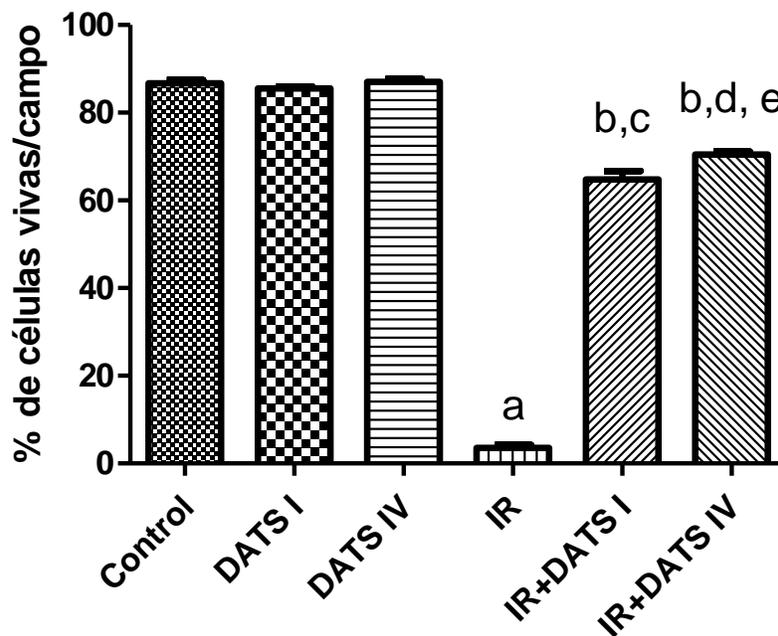


Figura 18. Porcentaje de células vivas en el estriado, analizado mediante la tinción de H&E, la administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control, ^bP<0.001 vs. IR, ^cP<0.001 vs. DATS I, ^dP<0.001 vs. DATS IV y ^eP<0.01 vs. IR+DATS I.

Se observó una disminución en el número de células viables en el grupo IR. El cual disminuye en los grupos que recibieron 1 y 4 dosis de DATS. Entre el control y los grupos con DATS solo no se observan diferencias (Figura 18).

3.2. Histología en corteza.

En la figura 19 se muestran imágenes representativas de la histología en corteza.

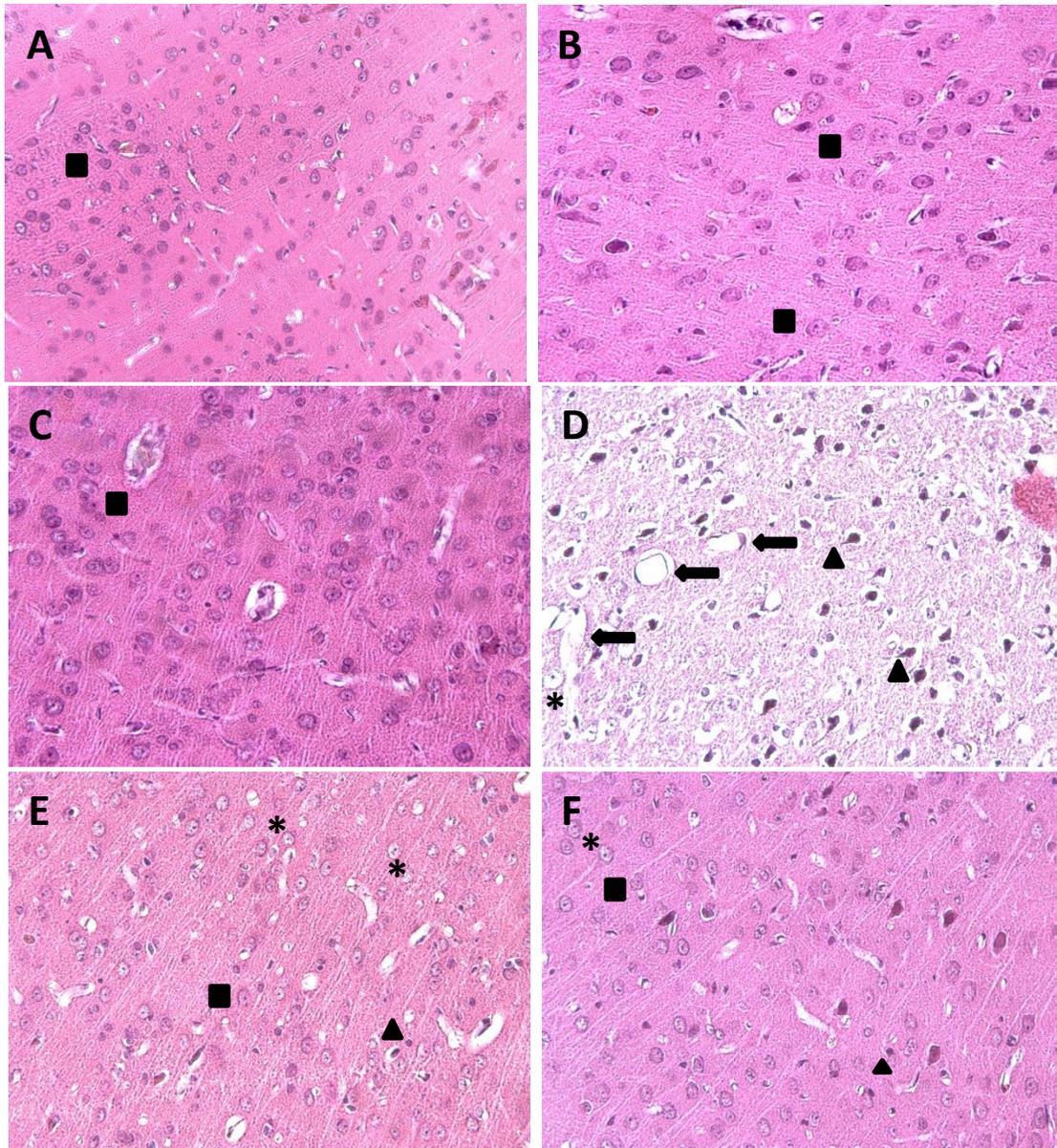


Figura 19. Efecto del DATS sobre el daño histológico inducido por la IR en la corteza. Se muestran imágenes representativas a 40X de cada grupo. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Se observa edema vasogénico en el neuropilo (flecha negra), edema citotóxico (asterisco), picnosis (triángulo negro) y células viables (cuadro negro).

En la figura 19 D se observan células picnóticas, edema vasogénico y edema citotóxico, al igual que daño en la integridad del neuropilo inducido por 1 h de isquemia y 168 h de reperfusión; mientras que en la figura 19 E se observa una disminución del daño al tejido inducida por 1 dosis de DATS, ya que se aprecia una mayor integridad del neuropilo, ausencia de edema vasogénico y una disminución en el número de células picnóticas. Finalmente, en el panel F se observa que 4 dosis de DATS protegen mejor que una sola dosis, ya que el edema citotóxico es menor que el observado en el panel E; así como la mayor integridad del neuropilo, la menor cantidad de células picnóticas y la ausencia de edema vasogénico.

En la figura 20 se observa el porcentaje de las células viables en la corteza. La

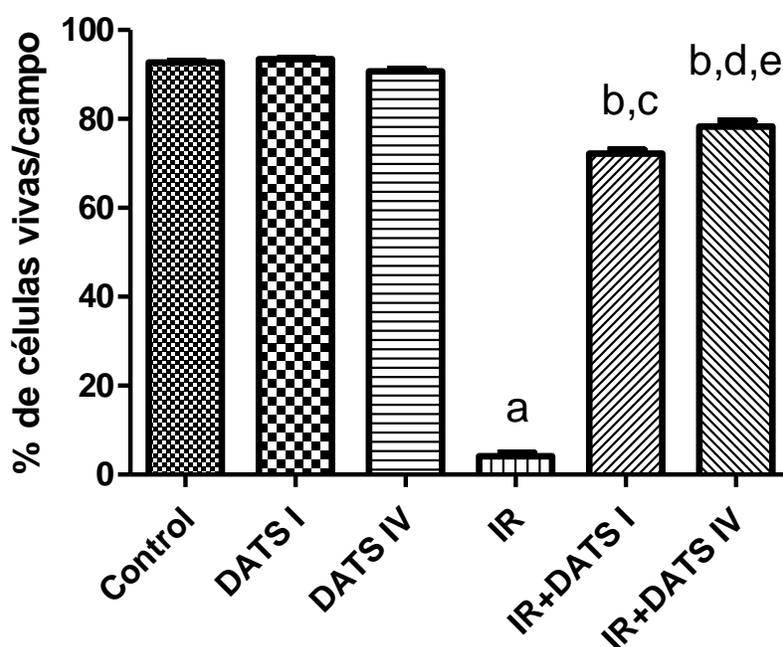


Figura 20. Porcentaje de células vivas en la corteza, analizado mediante tinción de H&E, la administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control, ^bP<0.001 vs. IR, ^cP<0.001 vs. DATS I, ^dP<0.001 vs. DATS IV y ^eP<0.001 vs. IR+DATS I.

administración de 1 y 4 dosis de DATS (15 mg/Kg) cada 24 h aumenta (78.3% y 72.2%, respectivamente) la viabilidad celular con respecto al grupo IR (4.15%).

4. Activación del factor de transcripción Nrf2.

La activación del factor de transcripción Nrf2, se evaluó mediante un ensayo de ELISA en extractos nucleares de corteza frontal (Figura 21).

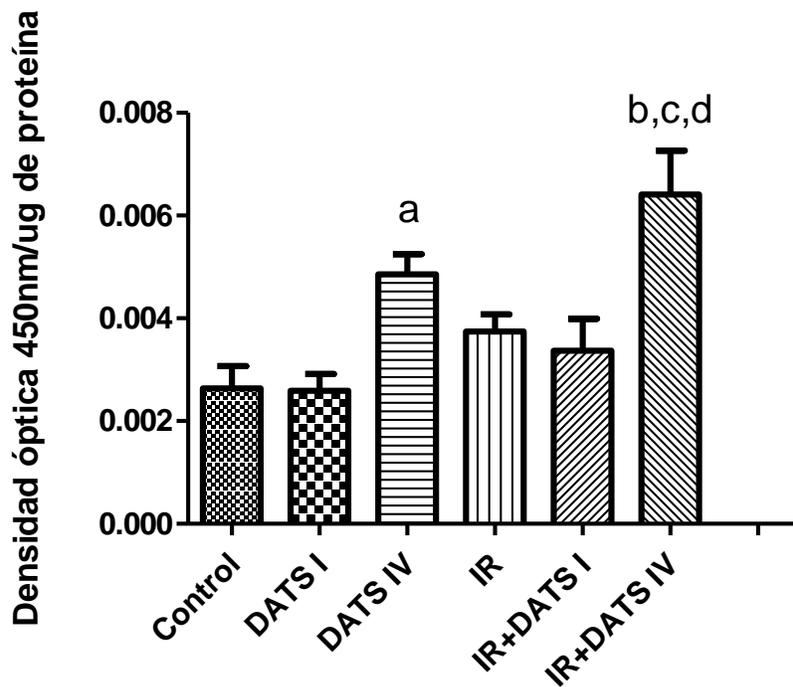


Figura 21. Activación del factor Nrf2 en la corteza frontal. La cuantificación se realizó en extractos nucleares de la corteza frontal mediante un ensayo de ELISA a 450nm. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.05 vs. Control mediante t-student, ^bP<0.01 vs. Control, ^cP<0.05 vs. IR y ^dP<0.01 vs. IR+DATS I.

En la figura 21 se observa que la administración de 1 dosis de DATS (15 mg/Kg) no activa el factor Nrf2; sin embargo 4 dosis de DATS incrementan 1.84 veces con

respecto al control. La lesión provocada por IR presenta una tendencia a activar el factor Nrf2 pero no es estadísticamente significativa con respecto al control. Por otra parte, en el grupo IR + 4 dosis de DATS (15 mg/Kg) cada 24 h el factor de transcripción Nrf2 aumento más.

5. Niveles de las enzimas de fase 2.

Se evaluaron los niveles de las enzimas de fase 2 mediante inmunohistoquímica tanto en estriado como en corteza, se cuantificaron las células positivas y los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas por campo.

En las figuras 22 y 23 se muestran las imágenes representativas de los niveles de SOD 1 mediante inmunohistoquímica en el estriado y la corteza frontal, respectivamente. En ambos casos las células positivas muestran una marca café en el citoplasma, mientras que las células negativas se ven de color azul.

En la figura 24 se observa el porcentaje de células positivas que expresan la SOD 1 en el estriado. La IR aumentó la expresión de la enzima (5.13%), así como el tratamiento solo con DATS (con una dosis: 4.74% y con 4 dosis: 19.51%). El tratamiento con 4 dosis de DATS e IR incrementan aún más los niveles (24.99%).

En la figura 25 se muestra el % de los niveles de la SOD 1 en la corteza frontal, observándose un comportamiento similar al observado en el estriado.

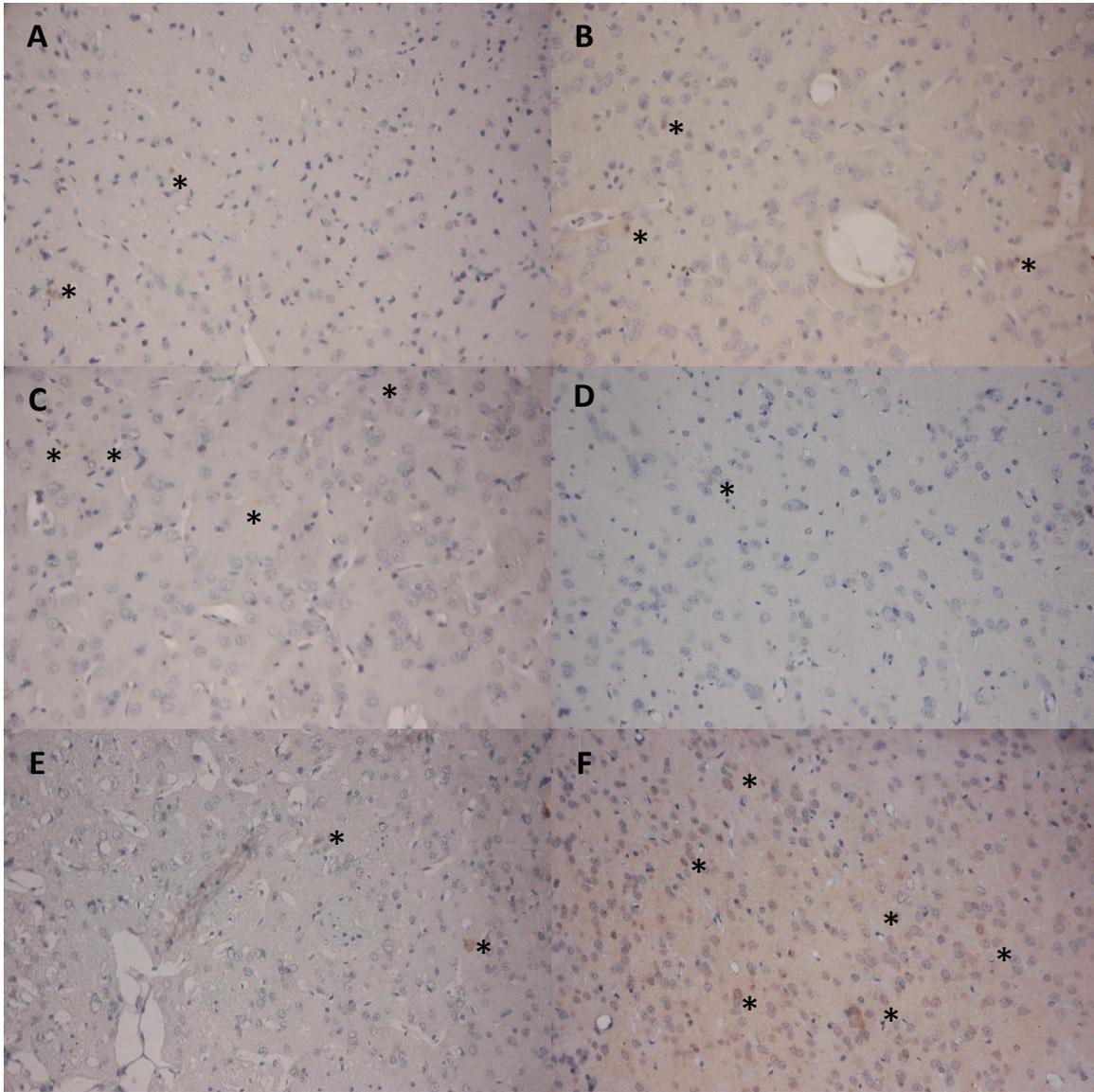


Figura 22. Efecto del DATS sobre los niveles de SOD 1 en estriado. Se presentan imágenes representativas de cada grupo de la inmunohistoquímica para SOD 1 a 40X, los cortes se contrastaron con hematoxilina. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Las células positivas presentan una marca café en el citoplasma (asterisco).

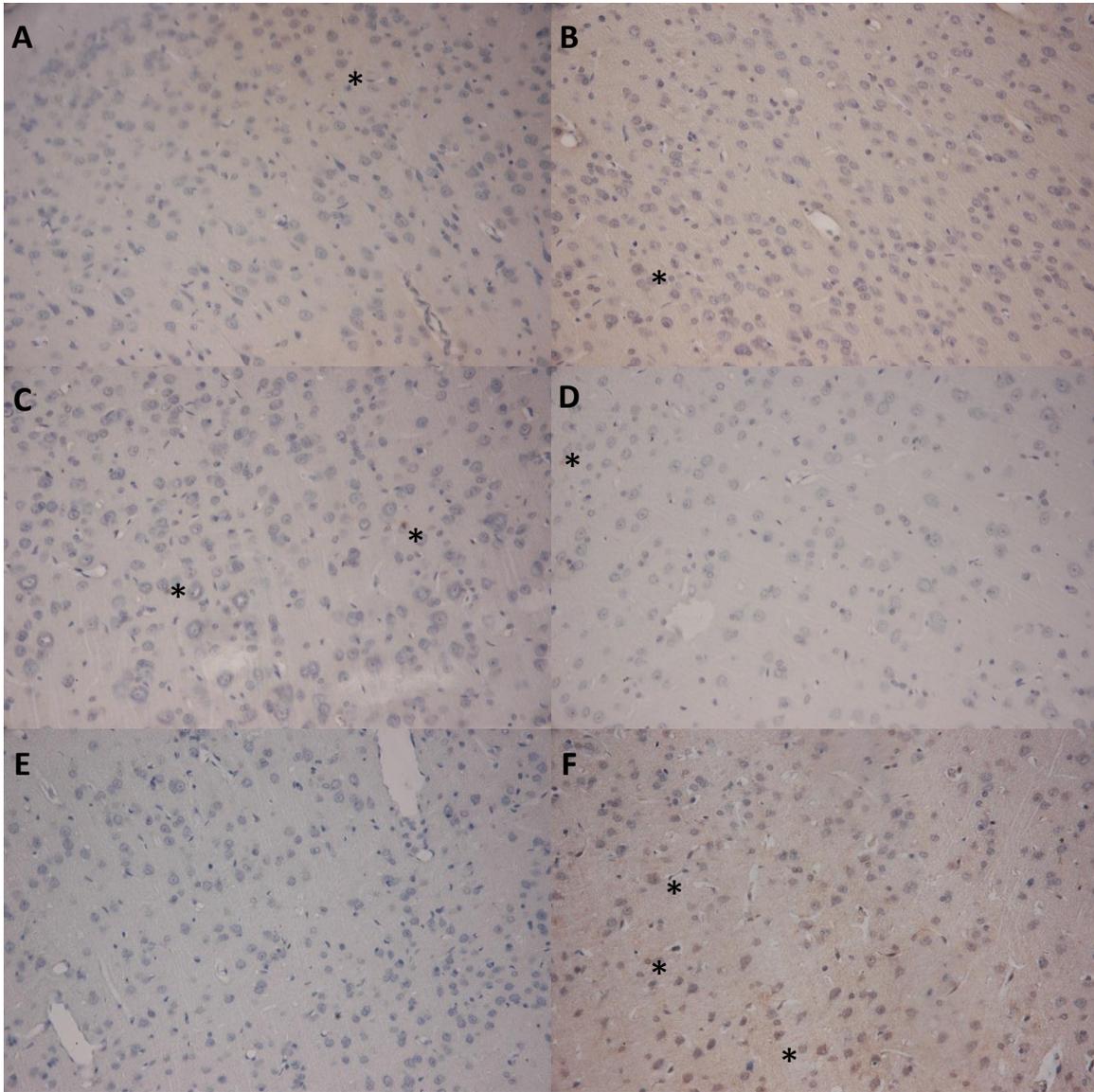


Figura 23. Efecto del DATS sobre los niveles de SOD 1 en corteza. Se presentan imágenes representativas de cada grupo de la inmunohistoquímica para SOD 1 a 40X, los cortes se contrastaron con hematoxilina. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Las células positivas muestran una marca café en el citoplasma (asterísco).

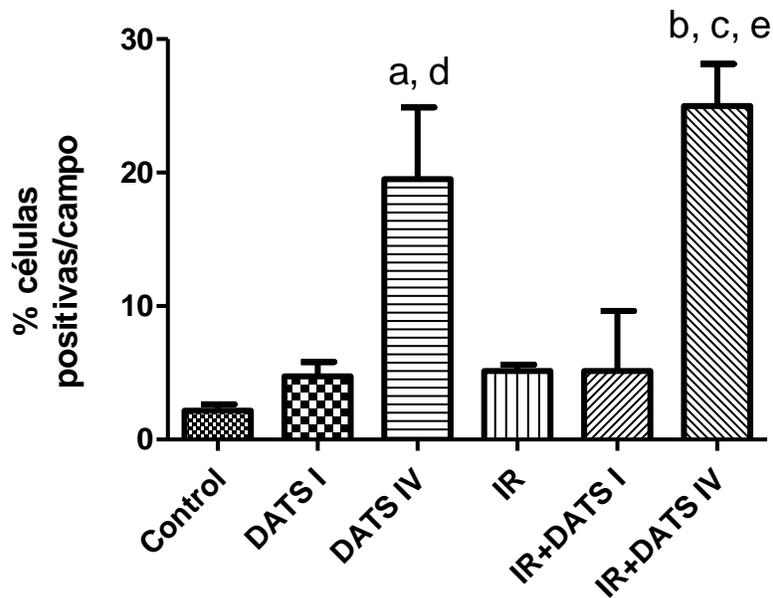


Figura 24. Niveles de SOD 1 en estriado. Se cuantificaron las células positivas en estriado para SOD 1, expresándolas como porcentaje de células positivas/campo. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.01 vs. Control, ^bP<0.001 vs. Control, ^cP<0.001 vs. IR, ^dP<0.01 vs. DATS I y ^eP<0.001 vs. IR+DATS I.

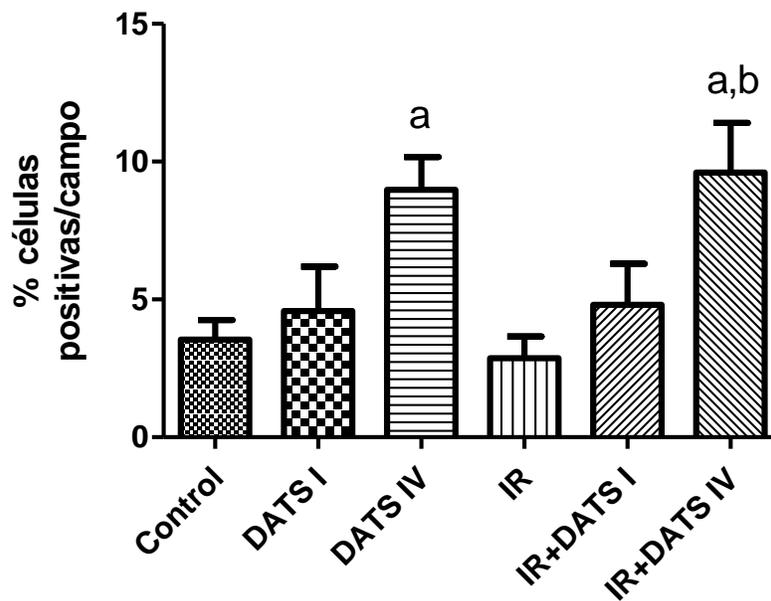


Figura 25. Niveles de SOD 1 en corteza. Se cuantificaron las células positivas en corteza frontal para SOD 1, expresándolas como porcentaje de células positivas/campo. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.01 vs. Control mediante t-student y ^bP<0.01 vs. IR.

Las imágenes representativas de los niveles de la SOD 2 en el estriado y la corteza se presentan en la figura 26 y 27, respectivamente.

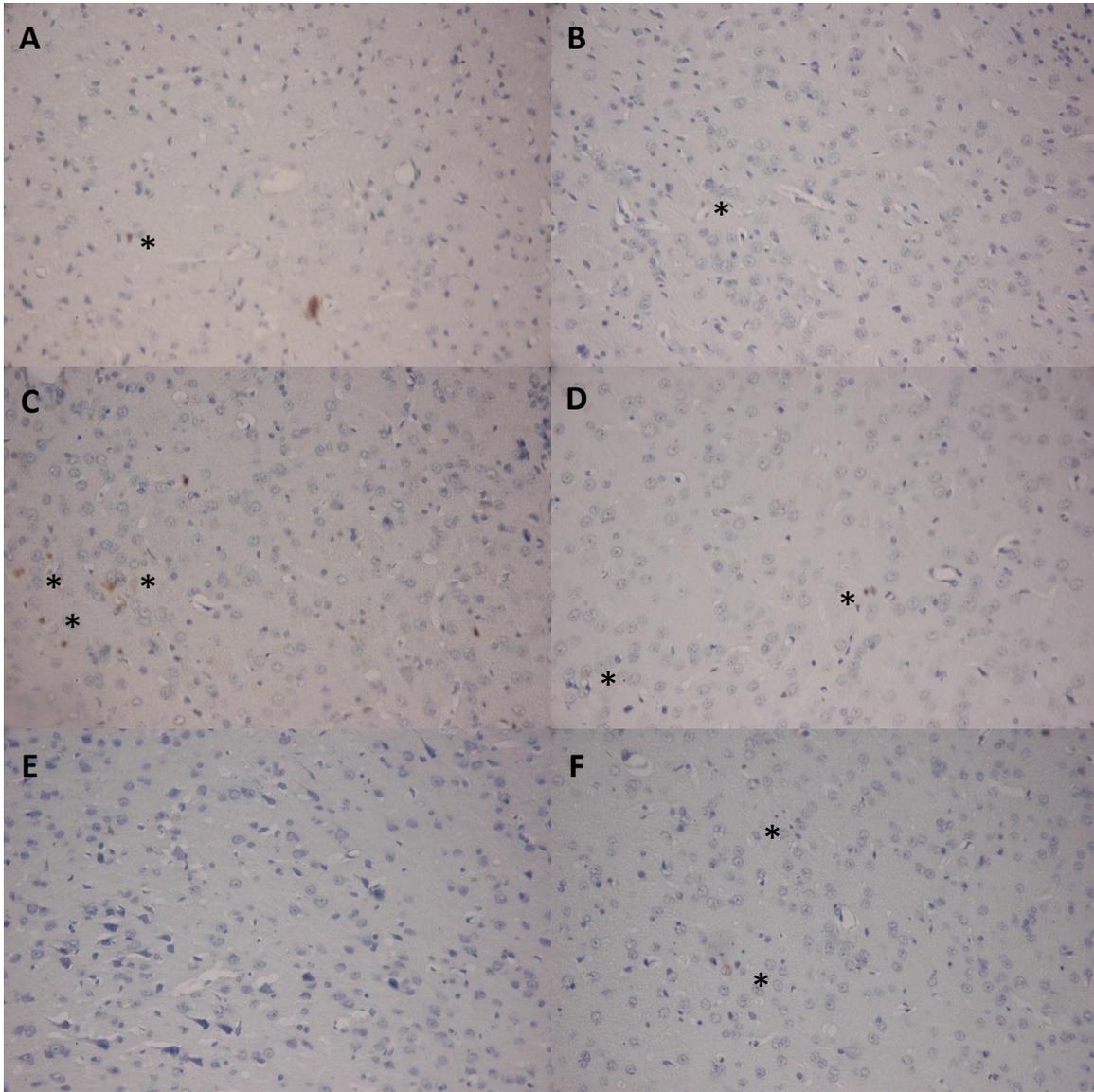


Figura 26. Efecto del DATS sobre los niveles de SOD 2 en el estriado. Se muestran imágenes representativas de cada grupo de la inmunohistoquímica para SOD 2 a 40X, los cortes fueron contrastados con hematoxilina. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Las células positivas muestran una marca café en el citoplasma (asterísco).

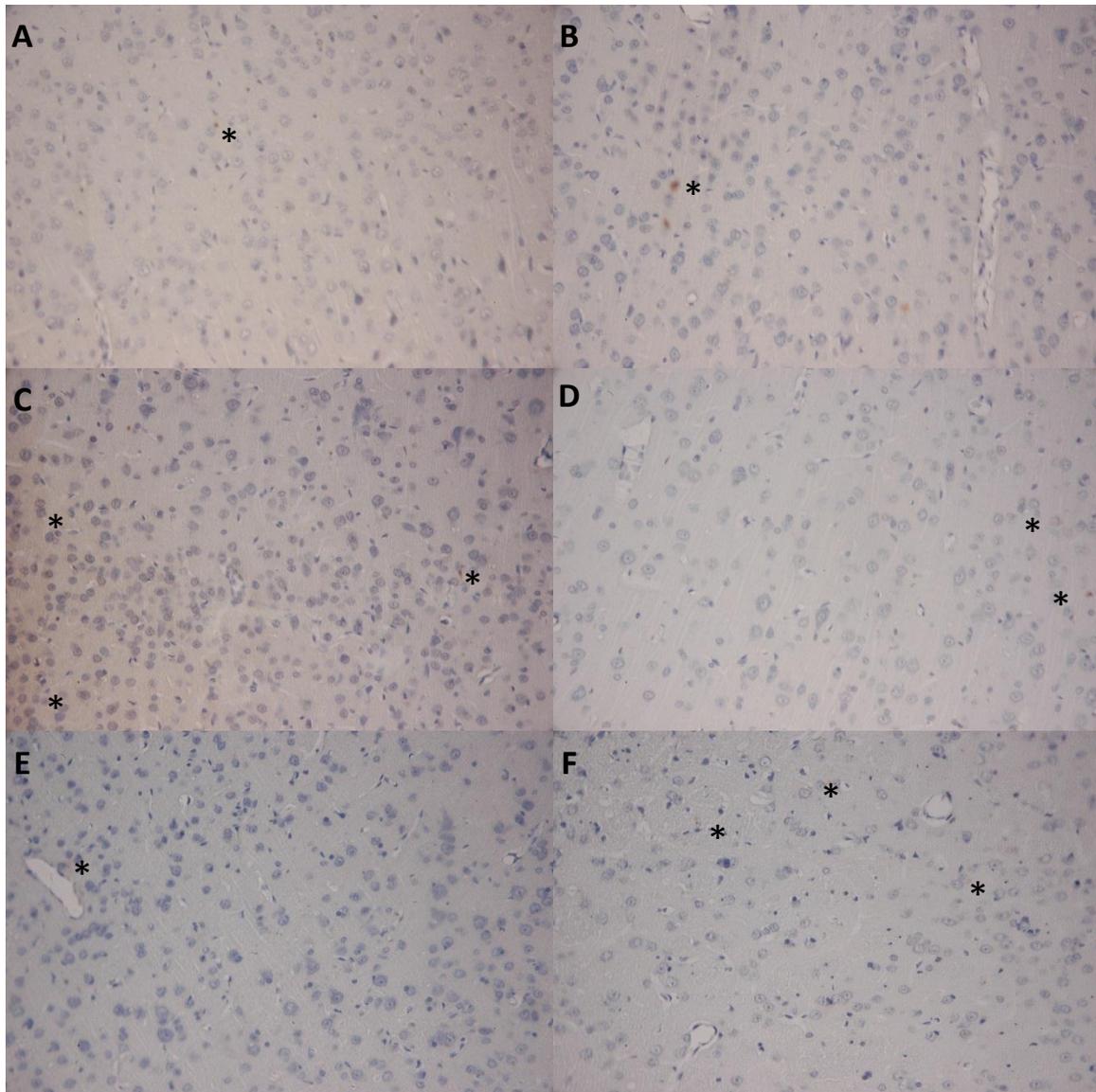


Figura 27. Efecto del DATS sobre los niveles de SOD 2 en la corteza. Se presentan imágenes representativas de cada grupo de la inmunohistoquímica para SOD 2 a 40X, los cortes fueron contrastados con hematoxilina. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Las células positivas muestran una marca café en el citoplasma (asterisco).

Las gráficas del porcentaje de los niveles de SOD 2 en el estriado y la corteza se presentan en las figuras 28 y 29, respectivamente. Se observa, que tanto en el estriado como en la corteza, la administración de 4 dosis de DATS incrementan los niveles de SOD 2 (2.95% en estriado y 5.30% en corteza) comparado con el control (0.68% en estriado y 2.01% en corteza). Por otra parte, la administración

de 1 sola dosis de DATS ni la IR producen un cambio significativo en los niveles de la enzima, 1.84% para el grupo DATS I y 1.35% para el grupo IR en estriado, mientras que en corteza los niveles fueron de 1.90 y 1.55% para los grupos DATS I e IR, respectivamente. En los grupos DATS IV e IR+DATS IV el incremento en los niveles de SOD 2 fue evidente tanto en el estriado como la corteza; en cambio, en los grupos DATS I e IR+DATS I no hubo cambio significativo en los niveles de SOD 2 en ninguna de estas regiones.

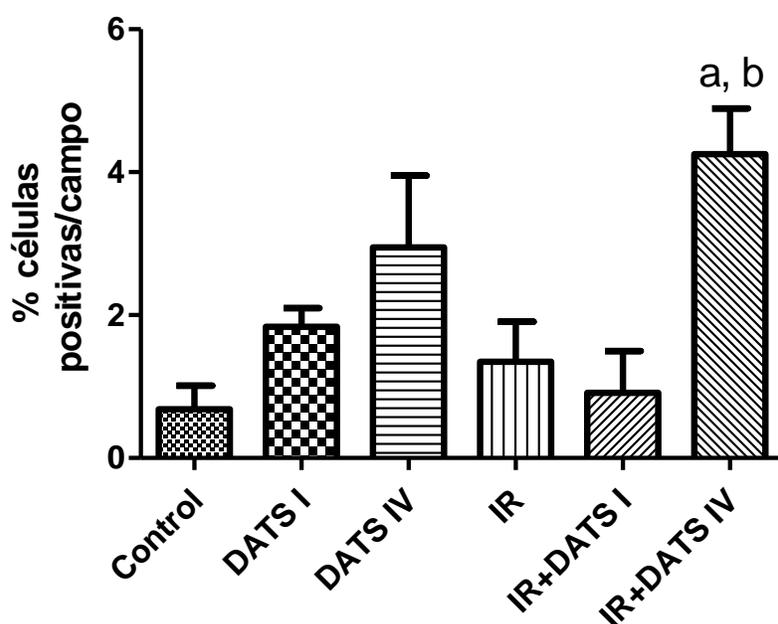


Figura 28. Niveles de SOD 2 en el estriado. Se cuantificaron las células positivas en estriado para SOD 2, expresándolas como porcentaje de células positivas/campo. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.01 vs. Control mediante t-student y ^bP<0.05 vs. IR.

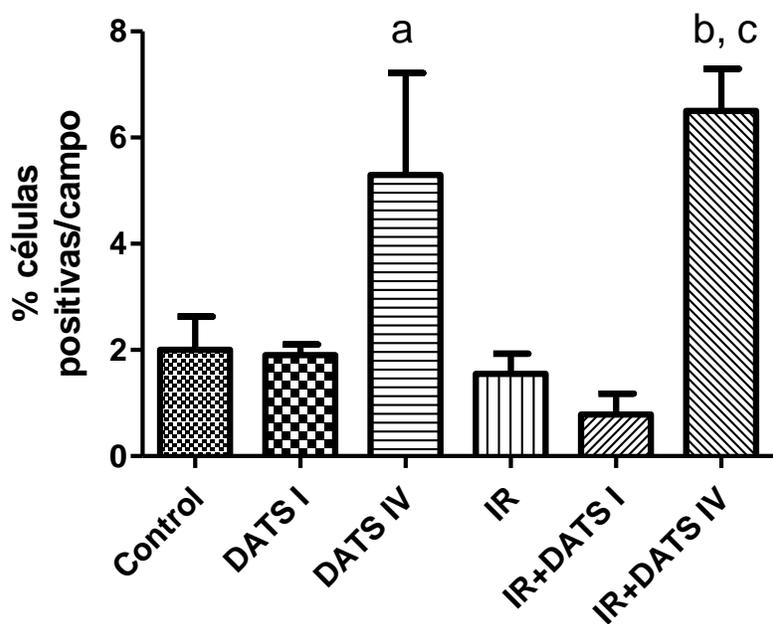


Figura 29. Niveles de SOD 2 en corteza. Se cuantificaron las células positivas en corteza frontal para SOD 2, expresándolas como porcentaje de células positivas/campo. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.01 vs. DATS I, ^bP<0.01 vs. Control y ^cP<0.001 vs. IR.

Las figuras 30 y 31 muestran las imágenes representativas de los niveles de GST en el estriado y la corteza, respectivamente.

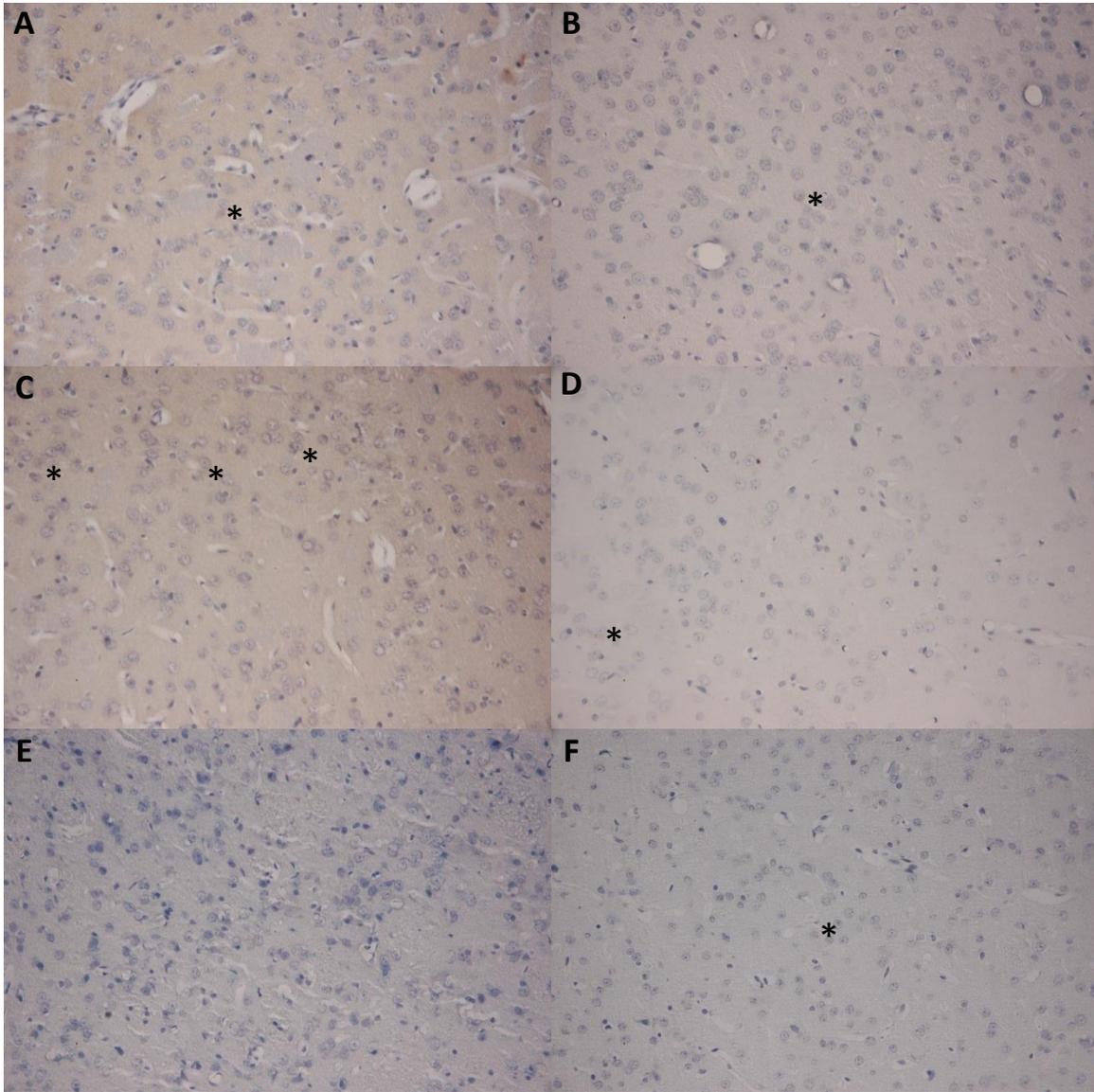


Figura 30. Efecto del DATS sobre los niveles de la GST en el estriado. Se presentan imágenes representativas de cada grupo de la inmunohistoquímica para GST a 40X, los cortes fueron contrastados con hematoxilina. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Las células positivas muestran una marca café en el citoplasma (asterísco).

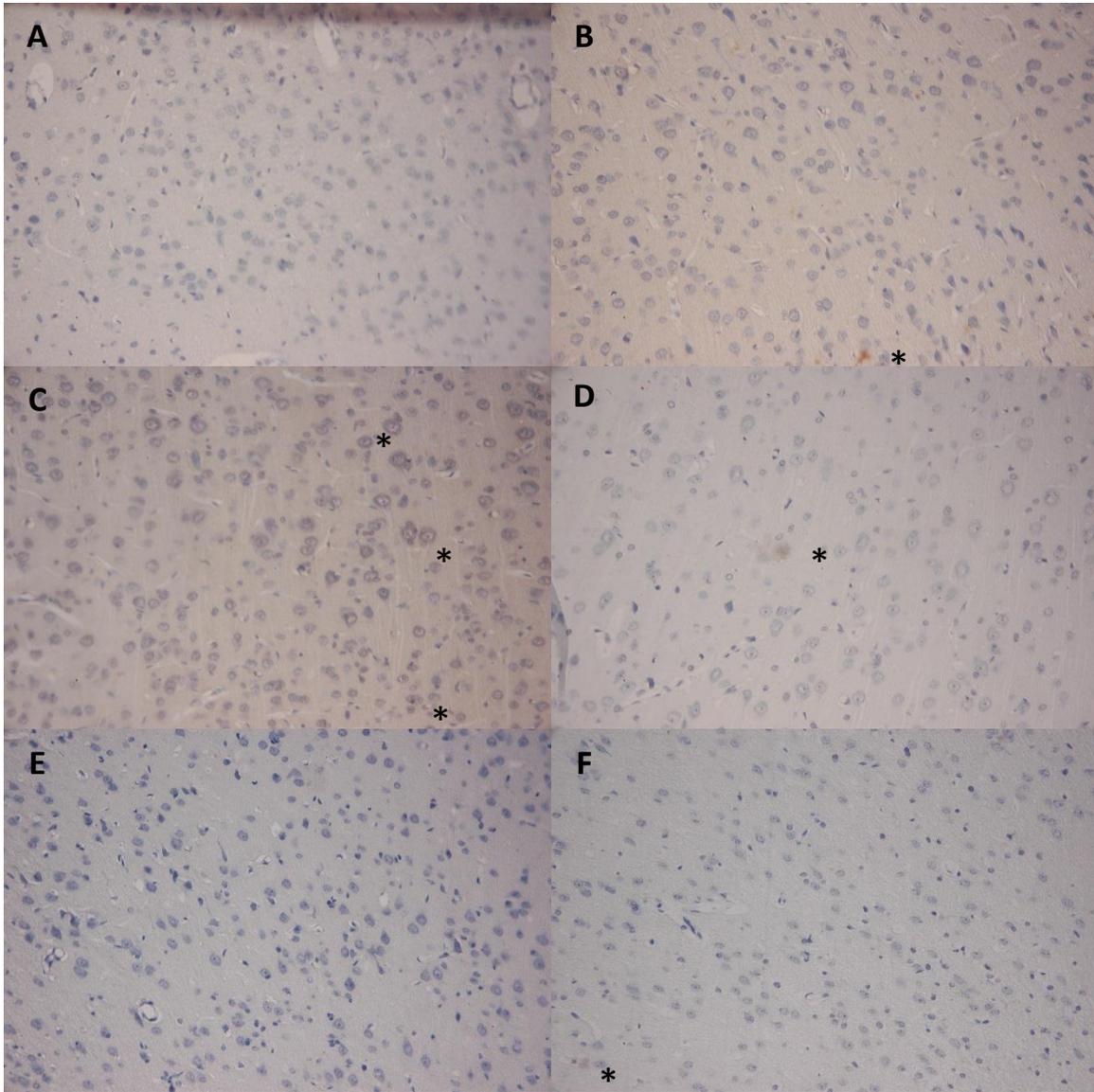


Figura 31. Efecto del DATS sobre los niveles de la GST en la corteza. Se presentan imágenes representativas de cada grupo de la inmunohistoquímica para GST a 40X, los cortes fueron contrastados con hematoxilina. A) Control, B) DATS I, C) DATS IV, D) IR, E) IR+DATS I y F) IR+DATS IV. Se observa una marca café en el citoplasma (asterísco) de las células positivas.

Se cuantificaron los niveles de la enzima GST en el estriado (Figura 32) y en la corteza (Figura 33). La administración de 4 dosis de DATS incrementó los niveles de GST en el estriado (25.96%), mientras que la IR disminuyó los niveles (1.52%) comparado con el control. La administración de una sola dosis de DATS (3.27%) produjo una ligera disminución en los niveles de la enzima que no es significativa respecto al control. En los grupos IR+DATS I (2.0%) e IR+DATS IV (3.28%) existe

una tendencia al incremento en los niveles de la enzima comparado con el grupo IR. Pero de igual que DATS I, no hubo cambios significativos comparado con el control

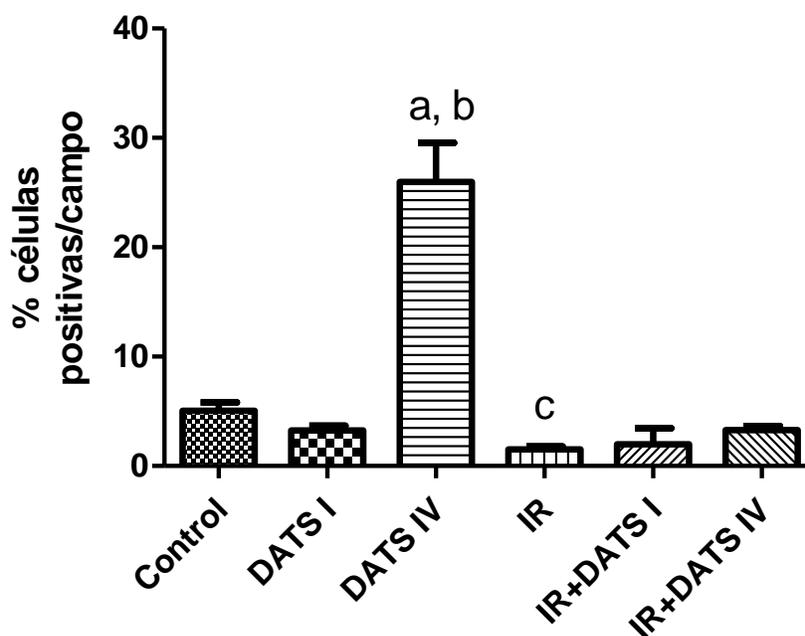


Figura 32. Niveles de GST en el estriado. Se cuantificaron las células positivas en el estriado para GST, expresándolas como porcentaje de células positivas/campo. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control I, ^bP<0.001 vs. DATS I y ^cP<0.001 vs. IR mediante t-student.

Los niveles de GST en la corteza no presentó cambios significativos entre los grupos, pero muestra una tendencia similar a la observada en estriado.

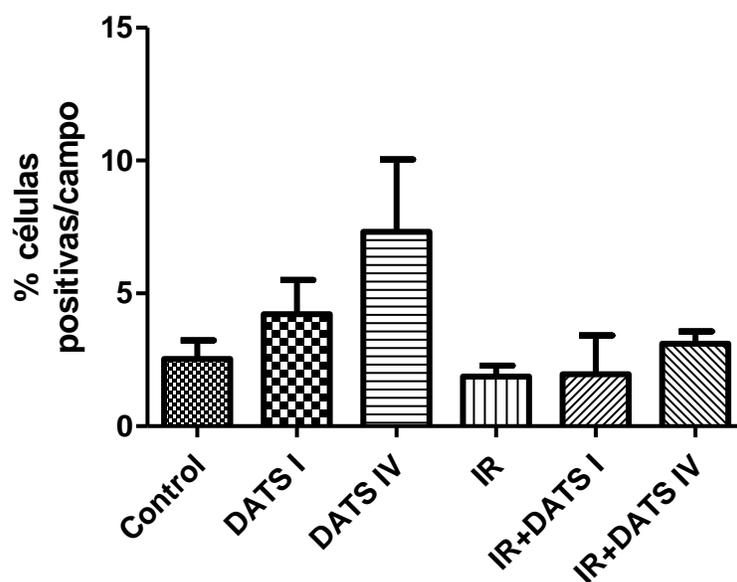


Figura 33. Niveles de GST en la corteza. Se cuantificaron las células positivas en la corteza frontal para GST, expresándolas como porcentaje de células positivas/campo. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM.

6. Actividad enzimática.

La actividad enzimática de CAT se midió en el estriado (Figura 34) y en la corteza (Figura 35), mientras que la actividad de GPx se midió en la corteza (Figura 36).

En estriado, la actividad de CAT incrementó en los grupos IR (0.0052 ± 0.00030 K/mg pt), IR+DATS I (0.0050 ± 0.00028 K/mg pt) e IR+DATS IV (0.0056 ± 0.00036 K/mg pt) con respecto al grupo control (0.0032 K/mg pt), mientras que la actividad en los grupos DATS I y DATS IV no presentan diferencia significativa con respecto al control (Figura 34). Por otro lado, en la corteza, la actividad de CAT presentó una

tendencia similar a la observada en estriado, pero sin alcanzar diferencia significativa entre los grupos (Figura 35).

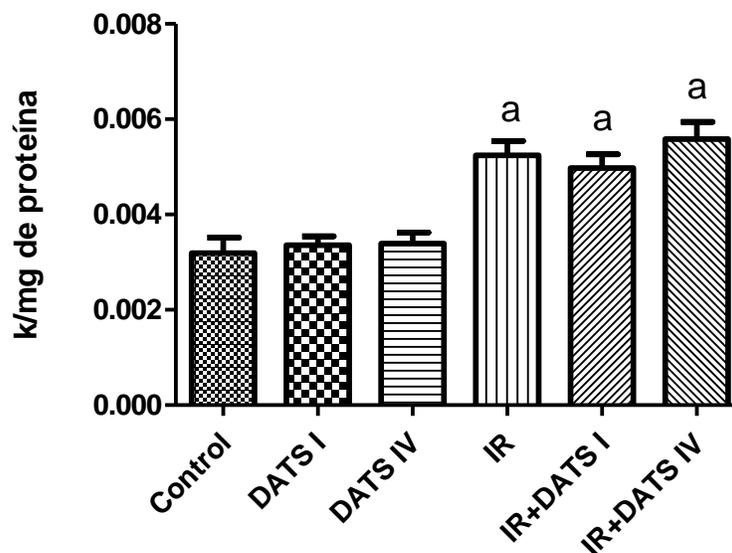


Figura 34. Actividad de catalasa en el estriado. La actividad se determinó espectrofotométricamente expresandola como k/mg de proteína. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.001 vs. Control.

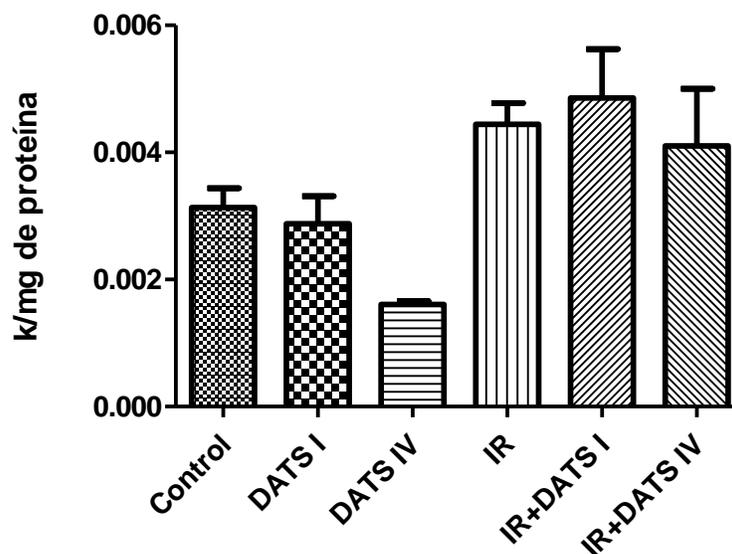


Figura 35. Actividad de CAT en la corteza. La actividad se determinó espectrofotométricamente expresandola como k/mg de proteína. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperfusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperfusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM.

La actividad de GPx en la corteza (Figura 36) presentó un comportamiento parecido al observado en el estriado para CAT. Se encontrp solo diferencia significativa con respecto al control (0.00460 ± 0.0014 U/mg pt) en los grupos IR (0.0092 ± 0.0011 U/mg pt), IR+DATS I (0.0110 ± 0.0010 U/mg pt) e IR+DATS IV (0.0105 ± 0.0016 U/mg pt). En los grupos DATS I (0.0051 ± 0.00074 U/mg pt) y DATS IV (0.0068 ± 0.0011 U/mg pt) no hubo diferencia significativa con respecto al control (Figura 36).

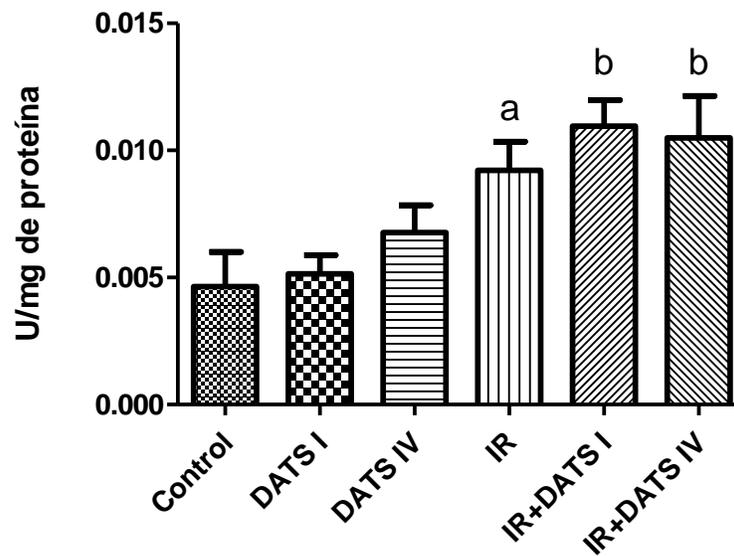


Figura 36. Actividad de GPx en la corteza. La actividad se determinó espectrofotométricamente expresándola como U/mg de proteína. La administración de DATS (15 mg/Kg, *i.p.*) se realizó al inicio de la reperusión. Los grupos son Control, Control de DATS con 1 administración (DATS I), Control de DATS con 4 administraciones cada 24 h (DATS IV), Isquemia/Reperusión (IR), IR + 1 administración de DATS (IR+DATS I) e IR + 4 administraciones de DATS cada 24 h (IR+DATS IV). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. ^aP<0.05 vs. Control y ^bP<0.01 vs. Control.

IX. DISCUSIÓN.

La inducción de la isquemia cerebral focal en modelos animales involucra una cascada de eventos que, probablemente representa el modelo más cercano a lo que ocurre en las personas que presentan dicho padecimiento (Taoufik & Probert, 2008). Por otra parte, la oclusión de la arteria cerebral media, como modelo de isquemia cerebral, es una técnica ampliamente usada debido a su reproducibilidad y porque es un modelo adecuado para evaluar estrategias de neuroprotección (Durukan & Tatlisumak, 2007; Liu & McCullough, 2011).

Determinación del esquema de dosificación.

Hasta ahora, no había reportes del efecto del DATS en modelos de isquemia cerebral; sin embargo, se han realizado estudios que emplean este compuesto en enfermedades neurológicas como la esclerosis lateral amiotrófica (Guo et al., 2011), en la cual se involucran mecanismos como la excitotoxicidad y el estrés oxidante (Sun et al., 2009), dos mecanismos que también son característicos en la isquemia cerebral (Durukan & Tatlisumak, 2007).

Un evento importante de daño en la IR cerebral es la generación de ERO. A pesar de que durante la reperusión, se genera la mayor cantidad de ERO, principalmente 20 min después del inicio de la reperusión y se mantienen incrementadas por lo menos 3 h (Peters et al., 1998); también durante el periodo de isquemia, la generación de ERO se lleva a cabo, debido a que el proceso excitotóxico promueve el aumento de Ca^{2+} intracelular y éste estimula diferentes fosfolipasas como la A_2 promoviendo la cascada del ácido araquidónico y la producción de ERO (Bondy & LeBel, 1993).

El DATS es capaz de inducir las enzimas de fase 2 (Chen et al., 2004; Fisher et al., 2007), pero también es capaz de atrapar ERO (Kim et al., 2006). La evaluación de los diferentes esquemas de dosificación revelan diferencias en la viabilidad celular (Figuras 13, 14 y 15) dependiendo del momento de la administración. La viabilidad celular de los esquemas preventivos fue menor que lo que se observa con los esquemas terapéuticos, debido probablemente a la forma de

administración, ya que generalmente, la biodisponibilidad de un compuesto es menor por vía oral que por vía i.p. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, gran parte del daño al tejido que se provoca en la IR cerebral se debe al estrés oxidante y la máxima producción de éste es minutos después del inicio de la reperfusión, por lo tanto la administración de DATS i.p. antes de la reperfusión permite tener una mayor concentración de DATS en tejidos.

Existen estudios farmacéuticos en los que se han determinado diversos parámetros farmacocinéticos de diferentes formas farmacéuticas que contienen DATS (Li et al., 2011). Sin embargo, para el DATS en sí, no están determinados. El tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima de DATS tras una administración i.v., es de 3 h (Li et al., 2011), por lo tanto el tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima tras una administración oral es mucho mayor. El tiempo de vida media del DATS es de 9.89 h y es posible que la administración previa no permita que se mantenga una concentración de DATS constante, en el momento en que inicia la reperfusión, generando así una baja protección.

Evaluación conductual.

Los síntomas que se presentan en la isquemia cerebral son muy diversos, dependen de la región sea afectada y del tamaño de la lesión. Esta última a su vez, depende del tiempo que dure el bloqueo del flujo sanguíneo (Díez-Tejedor et al., 2001).

La oclusión de la arteria cerebral media produce una serie de síntomas característicos, provocados por la disminución de la perfusión a las zonas irrigadas por esta arteria. La arteria cerebral media irriga al putamen, la parte externa del globo pálido, así como la cabeza del núcleo caudado, la corteza inferior de los lóbulos parietal y temporal, así como la corteza frontal y parietal superior (Kistler et al., 1991). El putamen, el globo pálido y el núcleo caudado forman parte del cuerpo estriado, el cual recibe axones de la corteza cerebral, y una de sus principales funciones es regular el inicio y el fin de los movimientos. Por otro lado, la corteza frontal parietal y temporal están implicadas en el control voluntario del

movimiento (Fox, 2008; Sherwood, 2011; Tortora & Derrickson, 2006). Al disminuir la perfusión al tejido irrigado por la arteria cerebral media los procesos motores se ven comprometidos. Por ello, una evaluación clínica muy importante en los pacientes que han sufrido un infarto cerebral, es la motriz (Kistler et al., 1991). Actualmente, el diagnóstico de infarto cerebral se realiza con base en estudios de imagenología y en las alteraciones clínicas motoras y del habla que sufren estos pacientes (Díez-Tejedor et al., 2001).

La evaluación conductual en los animales utilizados en este trabajo se basó en la evaluación de la función motora, y se puede observar que el tratamiento con DATS disminuyó parcialmente el daño neurológico (Figura 16), comparado con el grupo IR, efecto que podría estar asociado con la disminución del daño morfológico y el aumento de la viabilidad celular de la zona de penumbra en la región cortical y estriatal (Figuras 17, 18, 19 y 20). Al haber menor cantidad de neuronas corticales dañadas se permite un mayor control de la actividad motora; del mismo modo un aumento en el número de células estriatales viables permite que se mantenga un mayor número de conexiones con las células corticales y así el déficit neurológico disminuye. Además, el déficit neurológico en los animales tratados con una dosis de DATS es mayor al que se observa con cuatro dosis, aunque estadísticamente no es significativo. Este efecto podría deberse a que la diferencia que se observa entre la viabilidad celular de células de corteza y de estriado no es muy grande entre ambos grupos.

Análisis histológico.

La serie de eventos bioquímicos que se producen como consecuencia de la disminución de la perfusión al cerebro, producen cambios morfológicos en la zona afectada: se pueden observar células picnóticas, células muertas por necrosis, edema vasogénico y citotóxico en la región afectada (Figuras 17, 18, 19 y 20).

La muerte de células en la lesión isquémica se da principalmente por necrosis, lo que produce células picnóticas; al mismo tiempo que el daño a la microcirculación y el aumento en la permeabilidad y el daño a la barrera hematoencefálica, inducen

una acumulación de líquido extracelular y un aumento en el líquido intracelular, produciendo así edema vasogénico y citotóxico, aumentando la muerte celular (Heo et al., 2005; Lakhan et al., 2009; Mehta et al., 2007).

La muerte por necrosis en la zona afectada ocurre principalmente por el estrés oxidante, la excitotoxicidad, la disminución de las reservas de ATP, entre otras (García et al., 1995; Mehta et al., 2007).

Al estar involucrado el estrés oxidante en el daño al tejido, la administración del DATS (un antioxidante) aumentó la viabilidad celular al actuar como antioxidante directo e indirecto. Al administrar DATS al inicio de la reperfusión, ya sea en el esquema de una sola administración o de 4 administraciones, provoca probablemente que se alcance una concentración de DATS que es adecuada para combatir el aumento en la producción de ERO, que se generan de manera importante 30 min después del inicio de la reperfusión, provocando un estado de protección en el tejido al actuar como antioxidante directo. Por otra parte, administraciones posteriores de DATS en el esquema de 4 dosis, proveen una concentración del compuesto y esto provoca que el DATS tenga un efecto como antioxidante indirecto, generando protección a largo plazo en el tejido, lo cual se refleja en la viabilidad celular en el estriado con los esquemas de una (65.75%) y 4 (70.44%) administraciones; así como en la corteza (1 dosis:72.21% y 4 dosis: 78.29%).

El porcentaje de protección en el estriado y la corteza es diferente en el grupo de animales sometidos a IR + tratamiento, debido a que la región más dañada es el estriado y después la corteza, porque la circulación de las zonas limítrofes de la superficie de la corteza y la anastomosis de las arterias cerebrales anteriores y posteriores favorecen la viabilidad del tejido cortical por un mayor tiempo que la región estriatal.

Activación del factor de transcripción Nrf2.

La vía Keap1/Nrf2/ARE es el principal mecanismo ante el daño oxidante/electrofílico que poseen las células (Nguyen et al., 2009), donde Keap 1

actúa como un sensor de estrés oxidante (Kaspar et al., 2009; Watai et al., 2007). Al ser un importante mecanismo de respuesta al estrés oxidante, la activación de esta vía por compuestos como el DATS es muy importante y podría generar una buena protección.

El represor Keap 1 cuenta con una serie de cisteínas importantes para la disociación del complejo Nrf2/Keap1, así como para la ubiquitinación de Nrf2 en condiciones basales y de Keap 1 en condiciones de estrés y su degradación vía proteosomal. La cisteína más importante en la disociación de Nrf2 es la 151, que es susceptible a ser oxidada por ERO, prooxidantes, electrófilos, así como por inductores de enzimas de fase 2, como el sulforofano, la curcumina, la S-alilcisteína, la terbutilhidroquinona, entre otros (Coople et al., 2008; Kaspar et al., 2009; Lau et al., 2008; Surh et al., 2008; Watai et al., 2007).

Se ha propuesto que el DATS actúa como un antioxidante indirecto a través de la activación de Nrf2 (Silva-Islas et al., 2012), pero hasta el momento el mecanismo de acción por el cual el DATS provoca un aumento en la translocación del Nrf2 al núcleo no se conoce. Es probable que el DATS interaccione con la cisteína 151 promoviendo la liberación de Nrf2 de Keap1, y provocando así su translocación al núcleo. En la figura 21, se observa que la activación de Nrf2, mediada por su unión a la región promotora ARE, se induce solo con la administración de 4 dosis de DATS, así como en el grupo IR + 4 dosis de DATS, siendo mayor en este grupo de animales. Este efecto podría deberse a que es probable que la lesión isquémica contribuya de manera importante al aumento de ERO y ERN induciendo también al factor Nrf2.

Por otro lado, la administración de una sola dosis de DATS no induce la translocación del Nrf2 al núcleo con respecto al control a los 7 días, porque al administrar una sola dosis de DATS, es probable que la concentración del compuesto al día del sacrificio sea nula (la fase de eliminación de DATS es de 36 h) (Li et al., 2011). Es probable que se observe un efecto dentro de las 24 h posteriores a la administración del DATS. Lo mismo ocurre con el grupo de animales que fueron sometidos a IR + 1 dosis de DATS, probablemente el DATS

se consume por las ERO y ERN que se generan minutos después del inicio de la reperusión y al día 7 la concentración de DATS en el cerebro es nula. Esto no ocurre con 4 administraciones del compuesto porque, probablemente la primera administración de DATS se consume por las ERO y ERN, pero las administraciones subsecuentes de DATS mantienen una concentración del compuesto que a los 7 días es capaz de mantener la activación del factor Nrf2. Además, se ha visto que la inducción de Nrf2 por otros compuestos como la curcumina o simplemente una lesión hemorrágica subaracnoidea, aumentan la expresión de Nrf2 después de 72 h (Chen et al., 2011; Yang et al., 2011) de su administración o inducción.

Niveles de enzimas de fase 2 y actividad enzimática.

Las enzimas de fase 2 juegan un papel muy importante en el estado redox de las células, ya que proveen una protección contra daños potenciales, provocados por el ambiente oxidante en los sistemas celulares (Fukao et al., 2004). Estas enzimas ayudan a remover las ERO y ERN para mantener el estado redox en las células; por lo tanto, un aumento en los niveles estaría asociado a la protección de un tejido ante el daño oxidante.

Como se observa en las figuras 24, 25, 28, 29, 32 y 33, el aumento en los niveles en SOD 1, SOD 2 y GST ocurre con la administración de 4 dosis de DATS en el estriado y la corteza, lo cual podría estar asociado con la activación del factor Nrf2 (Figura 21: solo 4 dosis activan este factor), debido a que Nrf2 juega un papel importante en la inducción de enzimas de fase 2 a través de la regulación de ARE (Chen et al., 2004). Se ha observado que el DATS es un excelente inductor de la respuesta de fase 2, mejor que otros compuestos organosulfurados como dialil disulfuro y dialil sulfuro (Chen et al., 2004). Por otro lado, Fisher et al. (2007) encontraron que en ratones Nrf2^{-/-}, la expresión de NQO1 (enzima de fase 2 que es regulada por la vía Keap1/Nrf2/ARE) está disminuida aun cuando se administran compuestos como DATS, sugiriendo que la activación de Nrf2 juega un papel muy importante en la inducción de enzimas de fase 2.

Los niveles de SOD 1 en el estriado y la corteza tiene un comportamiento similar, ya que se produce un aumento de esta enzima con 4 dosis de DATS y con IR más las 4 administraciones de DATS en el estriado y la corteza, generando quizás en las neuronas un aumento en el estado de protección contra la producción de $O_2^{\cdot-}$. Algo similar ocurre con los niveles de SOD 2, ya que los mayores niveles se observan en el grupo IR + 4 dosis de DATS.

Los niveles de GST en estriado aumentaron solo con 4 dosis de DATS y disminuyó de forma significativa por la IR. Se observó una tendencia a aumentar los niveles de esta enzima a niveles normales en el grupo IR + 4 dosis de DATS aunque no fue significativo. En la corteza el comportamiento de los niveles de GST fue similar, aunque no hubo diferencia significativa entre los grupos.

Por otro lado, el aumento en la actividad de las enzimas de fase 2 (CAT y GPx) indica que las enzimas que están aumentando su expresión son activas contra el daño oxidante que se produce en el tejido. Es probable que el aumento en la actividad de CAT en el estriado (Figura 34) se deba al daño provocado por la IR, ya que en los grupos IR+DATS I e IR+DATS IV, el aumento observado es solo por el daño que se produce por la IR, ocurriendo lo mismo en la actividad de CAT en corteza (Figura 35). Esto indica que, probablemente el DATS no tiene ningún efecto sobre la actividad de CAT a los tiempos utilizados en este trabajo. Sin embargo, el DATS presenta una tendencia, aunque no significativa, sobre el aumento de la actividad de la GPx en corteza (Figura 36) aunque el grupo de animales sometidos a IR presenta una mayor actividad con respecto al control. Los animales sometidos a IR + 1 y 4 dosis de DATS, presentan una tendencia a aumentar la actividad de la enzima con respecto al grupo IR, pero de igual forma, no hay diferencia significativa, esto indica que el DATS tiene poco efecto sobre la actividad de esta enzima comparado con el efecto que tendría el sustrato de la enzima (H_2O_2).

Es importante mencionar que deben evaluarse otras enzimas de fase 2 (HO-1, SOD, etc.) que puedan estar participando en el efecto protector del DATS.

X. CONCLUSIÓN.

El DATS protege el tejido cerebral contra el daño morfológico y conductual provocado por la IR, generando una mayor protección el esquema de administración terapéutico, con 4 dosis de DATS (15 mg/Kg *i.p.*). Efecto que podría estar asociado con la capacidad del DATS de activar el factor Nrf2 e inducir la expresión de las enzimas SOD 1, SOD 2 y GST.

XI. PERSPECTIVAS.

Evaluar el efecto del DATS con los esquemas terapéuticos sobre el área de infarto y el daño a la barrera hematoencefálica.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

Aguilera P, Chánez-Cardenas ME, Ortíz-Plata A, León-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, Villeda-Hernández J, Sánchez-García A & Maldonado PD. 2010. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant system. *Phytomedicine*. 17(3-4):241-247.

Ali M, Al-Qattan KK, Al-Enezi F, Khanafer RM & Mustafa T. 2000. Effects of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 62(4):253-259.

Allen CL & Bayraktutan U. 2008. Risk factors for ischemic stroke. *Int J Stroke*. 3(2):105-116.

Amiry-Moghaddam M & Ottersen OP. 2003. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 4(12):991-1001.

Anderson CM & Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32(1):1-14.

Arundine M & Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*. 34(4-5):325-337.

Ashafag M, Khan MM, Shadab Raza S, Ahmad A, Khuwaja G, Javed H, Khan A, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM & Islam F. 2012. S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutr Res*. 32(2):133-143.

Blomgren K & Hagberg H. 2006. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med*. 40(3):388-397.

Bondy SC & LeBel CP. 1993. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med.* 14(6):633-642.

Camacho A & Massieu L. 2006. Role of glutamate transporter in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 37(1):11-18.

Candelario-Jalil E. 2008. Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: New experimental evidences. *Pharmacol Res.* 57(4):266-273.

Cárdenas-Rodríguez N, Medina-Campos ON & Pedraza-Chaverrí J. 2008. Glutathión Peroxidasas: una familia de enzimas, en: *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas, Manual Moderno (ed)*, pp. 201-217.

Chan KC, Yin MC & Chao WJ. 2007. Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats. *Food Chem Toxicol.* 45(3):502-507.

Chan PH. 2004. Mitochondrial and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem Res.* 29(11):1949-1949.

Chen B, Friedman B, Cheng Q, Tsai P, Schim E, Kleinfeld D & Lyden PD. 2009. Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury. *Stroke.* 40(12):e666-e674.

Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair s, Li W & Kong AN. 2004. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2:effect of chemical structure and stress signaling. *Free Radic Biol Med.* 37(10):1578-1590.

Chen G, Fnag Q, Zhang J, Zhou D & Wang Z. 2011. Role of the Nrf2-ARE pathway in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Res.* 89(4):515-523.

Chiechio S & Nicoletti F. 2011. Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. *Curr Opin Pharmacol.* (Epub ahead of print).

Colín-González AL, Ortíz-Plata A, Villeda-Hernández J, Barrera D, Molina-Jijón E, Padraza-Chaverrí J & Maldonado PD. 2011. Aged garlic extract attenuates cerebral damage and cyclooxygenase-2 induction after ischemia and reperfusion in rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 66(4):348-354.

Christensen T, Bruhn T, Balchen T & Diemer NH. 1994. Evidence for formation of hydroxyl radicals during reperfusion after global cerebral ischemia in rats using salicylate trapping and microdialysis. *Neurobiol Dis.* 1(3):131-138.

Coople IM, Goldring CE, Kitteringham NR & Park BK. 2008. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology.* 246(1):24-33.

Coyle JT & Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134):689-695.

Davis SR. 2005. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products—the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses.* 48(2):95-100.

Dawson VL & Dawson TM. 1996. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat.* 10(3-4):179-190.

Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabin J, Muñoz M & Abiusi G. 2001. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Rev Neurol. 33(5):455-464.

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

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD & Kensler TW. 2005. The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem Res Toxicol. 18(12):1779-1791.

Dirnagl U, Iadecola C & Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischemic stroke: an integrative view. Trends Neurosci. 22(9):391-397.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M & Davis SM. 2008. Stroke. Lancet. 371(9624):1612-1623.

Durukan A & Tatlisumak T. 2007. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodents models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav. 87(1):179-197.

Eltzsching HK & Eckle T. 2011. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat Med. 17(11):1391-1401.

Fernández-Checa JC & García-Ruiz C. 2008. Glutación. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Koningsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 253-267.

Fisher CD, Augustine LM, Maher JM, Nelson DM, Slitt AL, Klaassen CD, Lehman-McKeeman LD & Cherrington NJ. 2007. Induction of drug-metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane

receptor and nuclear factor E2-related factor 2. *Drug Metab Dispos.* 35(6):995-1000.

Fox SI. 2008. *Fisiología humana*, 10^a edición. Mc Graw Hill-Interamericana. pp. 201-230.

Fraser PA. 2011. The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Fre Radic Biol Med.* 51(5):967-977.

Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M & Chan PH. 1998. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18(11):1239-1247.

Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T & Ariga T. 2004. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food Chem Toxicol.* 42(5):743-749.

Fukushima S, Takada N, Hori T & Wanibuchi H. 1997. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. *J Cell Biochem Suppl.* 27:100-105.

García JH, Liu KF & Ho KL. 1995. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke.* 26(4):636-642.

Gerber U., Gee CE & Benquet P. 2007. Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol.* 7(1):56-61.

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

Green DR & Reed JC. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science*. 281(5381):1309-1312.

Guo Y, Zhang K, Wang Q, Yin Y, Xu Q, Duan W & Li C. 2011. Neuroprotective effects of diallyl trisulfide in SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 1374:110-115.

Gupta R, Singh M & Sharma A. 2003. Neuroprotective effect of antioxidants on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res*. 48(2):209-215.

Gutteridge JMC & Halliwell B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun*. 393(4):561-564.

Halliwell B. 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci*. 32(3):125-130.

Hansberg-Torres W. 2008. El dioxígeno y sus especies reactivas. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 25-46.

Hawkins BT & Davis TP. 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 57(2):173-185.

Hazel AS. 2007. Excitotoxic mechanisms in stroke: An update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int*. 50(7-8):941-953.

Heo JH, Han SW & Lee SK. 2005. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med*. 39(1):51-70.

Herman-Antosiewicz A & Singh SV. 2004. Signal transduction pathway leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by Allium vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutat Res.* 555(1-2):121-131.

Hernández-Pérez E & Bucio-Ortíz L. 2008. Tiorredoxinas. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 219-232.

Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R & Seeburg PH. 1993. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell.* 75(7):1361-1370.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2010. Consulta de defunciones generales por lista mexicana de enfermedades, según año de registro.

Jones DP. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* 348:93-112.

Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, Nahed BV, Jones PS & Sun D. 2009. Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda).* 24:257-265.

Kaspar JW, Niture SK & Jaiswal AK. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 47(9):1304-1309.

Kato H & Kogure K. 1999. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. *Cell Mol Neurobiol.* 19(1):93-108.

Kim JM, Chang HJ, Kim WK, Chang N & Chun HS. 2006. Structure-activity relationship of neuroprotective and reactive oxygen species scavenging activities for allium organosulfur compounds. *J Agric Food Chem.* 54(18):6547-6553.

Kistler JP, Ropper AA & Martin JB. 1991. Enfermedades cerebro-vasculares. En *Harison Principios de Medicina Interna*. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL & Loscalzo J (eds). Interamericana McGraw Hill. pp.2288-2317.

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

Konigsberg M. 2008a. Cadena respiratoria mitocondrial. En: Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 49-59.

Konigsberg M. 2008b. Sistemas microsomales de monooxigenasas, citocromo P450. En: Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 61-71.

Konigsberg M. 2008c. NADPH Oxidasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 73-83.

Konigsberg M. 2008d. Xantina Oxidoreductasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 85-93.

Lakhan SE, Kirchgessner A & Hofer M. 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 7:97108.

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK & Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 58(5-6):262-270.

Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ & Choi DW. 2000. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* 106(6):723-731.

Leonard MO, Kieran NE, Howell H, Burne MJ, Varadarajan R, Dhakshinamoorthy S, Porter AG, O'Farrelly C, Rabb H & Taylor CT. 2007. Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 20(14):E2166-E2176.

Lewandowski CA, Rao CPV & Silver B. 2008. Transient Ischemic Attack: Definition and Clinical Presentation. *Ann Emerg Med.* 52(2):S17-S16.

Li X, Yue Y, Zhou Y, Fan Y, Fan C, Huang Y, Wu F & Liu Y. 2011. An oil-free microemulsion for intravenous delivery of diallyl trisulfide: formulation and evaluation. *Int J Pharm.* 407(1-2):158-166.

Lin X, Yu S, Chen Y, Wu J, Zhao J & Zhao Y. 2012. Neuroprotective effects of diallyl disulfide against transient focal cerebral ischemia via anti-apoptosis in rats. *Neurol Res.* 34(1):32-37.

Liu F & McCullough LD. 2011. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol.* 2011:464701. Epub 2011.

LKT Laboratories, Inc. 2012. http://www.lktlabs.com/products/Diallyl_trisulfide-68-0.html. Revisada 11 Marzo de 2012. 15:21hrs.

Lo EH, Dalkara T & Moskowitz MA. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 4(5):399-415.

Lochhead J, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N & Davis TP. 2010. Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occluding during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(9):1625-1636.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S & Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20(1):84-91.

Love S. 1999. Oxidative stress in cerebral ischemia. *Brain Pathol.* 9(1):119-131.

Maldonado PD, Limón D, Gálvan-Arzata S, Santamaría A & Pedraza-Chaverrí J. 2009. Medicinal properties of garlic: importance of its antioxidant activity. In: *Garlic Consumption and Health.* Păcurar M & Krejci G, (eds). Nova Science Publisher. pp. 61-116.

Margaill I, Plotkine M & Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med.* 39(4):429-443.

Markus HS. 2004. Cerebral perfusion and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75(3):353-361.

Markus H. 2004. Genes for stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75()1229-1231.

Markus HS. 2011. Stroke genetics. *Hum Mol Genet.* 20(R2):R124-R131.

Mathew BC & Biju RS. 2008. Neuroprotective effects of garlic a review. *Libyan J Med.* 3(1):23-33.

Medeiros MH. 2008. Daño al DNA. En: *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas.* Konigsberg M (ed). Manual Moderno (ed). pp. 119-134.

Mehta SL, Manhas N & Raghubir R. 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 54(1):34-66.

Mergenthaler P, Dirnagl U & Meisel A. 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* 19(3-4):151-167.

Miranda LD. 2008. Química de los radicales libres. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 13-21.

Mitsios N, Gaffney J, Kumar P, Krupinski J, Kumar S & Slevin M. 2006. Pathophysiology of acute ischemic stroke: an analysis of common signalling Mechanisms and Identification of New Molecular Targets. 2006. *Pathobiology.* 73(4):159-175.

Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P & Hodges H. 2000. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods.* 104(1):99-109.

Moro MA, Almeida A, Bolaños JP & Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation instroke. *Free Radic Biol Med.* 39(10):1291-1304.

Muralikrishna Adibhatla R & Hatcher JF. 2006. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 40(3):376-387.

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

Nedergaard M & Dirnagl U. 2005. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia.* 50(4):281-286.

Nguyen T, Nioi P & Pickett CB. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284(20):13291-13295.

Nordberg J & Arnér ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1287-1312.

Orozco-Ibarra M & Pedraza-Chaverrí J. 2008. Hemooxigenasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp.. 233-251.

Peraza-Reyes L. Catalasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual Moderno. pp. 183-200.

Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J & Dirnagl U. 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18(2):196-205.

Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA & Martínez A. 2005. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39(1):26-50.

Saleem A, Ahmad M, SAhmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T & Islam F. 2006. Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia. *J Med Food.* 9(4):537-544.

Schaller B & Graf R. 2004. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24(4):351-371.

Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Ardizzone T & Bernaudin M. 2004. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx* 1(1):26-35.

Sherwood L. 2011. *Fisiología humana: de las células a los sistemas*. Sherwood L (ed). Cengage Learning. pp.133-181.

Silva-Islas C, Santana RA, Colín-González AL & Maldonado PD. 2012. Nrf2 activation, an innovative therapeutic alternative in cerebral ischemia. In: *Advances in the preclinical study of ischemic stroke*. Balestrino M (ed). In Tech. pp. 347-378.

Sommer B, Köhler M, Sprengel R & Seeburg PH. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*. 67(1):11-19.

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM & Chan PH. 2004. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 1(1):17-25.

Sun MM, Bu H, Li B, Yu JX, Guo YS & Li CY. 2009. Neuroprotective potential of phase II enzyme inducer diallyl trisulfide. *Neurol Res*. 31(1):23-27.

Surh YJ, Kundu JK & Na HK. 2008. 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*. 74(13):1526-1539.

Szydłowska K & Tymianski M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 47(2):122-129.

Taoufik E & Probert L. 2008. Ischemic Neuronal Damage. *Curr Pharm Des*. 14(33):3565-3573.

Tapia R, Medina-Ceja L & Peña F. 1999. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int.* 34(1):23-31.

Tegos TJ, Kalodiki E, Daskalopoulou SS & Nicolaidis AN, 2000. Stroke: epidemiology, clinical picture, and risk factors part I of III. *Angiology.* 51(10):793-808.

Tortora GJ & Derrickson B. 2006. *Principios de anatomía y fisiología.* Tortora GJ & Derrickson B (eds). Medica Panamericana. pp. 477-515.

Van der Staay FJ, Augstein KH & Horváth E. 1996. Sensorimotor impairments in Wistar Kyoto rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the middle cerebral artery: recovery of function. *Brain Res.* 715(1-2):180-188.

Warner DS, Sheng H & Batinic-Haberle I. 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 207(Pt 18):3221-3231.

Watai Y, Kobayashi A, Nagase H, Mizukami M, McEvoy J, Singer JD, Itoh K & Yamamoto M. 2007. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells.* 12(10):1163-1178.

Wu CC, Lii CK, Tsai SJ & Sheen LY. 2004. Diallyl trisulfide modulates cell viability and the antioxidants and detoxification systems of rat primary hepatocytes. *J Nutr.* 134(4):724-728.

Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ & Lii CK. 2002. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J Agric Food Chem.* 50(2)378-383.

Yang Y & Rosenberg GA. 2011. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*. 42(11):3323-3328.

Ye R, Zhang X, Kong X, Han J, Yang Q, Zhang Y, Chen Y, Li P, Liu J, Shi M, Xiong L & Zhao G. 2011. Ginsenoside Rd Attenuates mitochondrial dysfunction and sequential apoptosis after transient focal ischemia. *Neuroscience*. 178:169-180.

Zenteno-Savin T & Saldaña-Balmori Y. 2008. Daño a lípidos. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Konigsberg M (ed). Manual moderno. pp. 135-146.