



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL DIALILDISULFURO COMO TERAPIA
ANTIOXIDANTE EN EL PROCESO
NEURODEGENERATIVO INDUCIDO CON ÁCIDO
QUINOLÍNICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

FRIDA ATLÁNTIDA LÓPEZ CASTRO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Mireya Rodríguez Pénagos**
VOCAL: **Profesor: Euclides Ávila Chávez**
SECRETARIO: **Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia**
2° SUPLENTE: **Profesor: Sara Rosario Cruz Morales**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELÁSICO SUÁREZ”, LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL PROYECTO CONACYT 103527.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. PERLA D. MALDONADO JIMÉNEZ _____

SUSTENTANTE:

FRIDA ATLÁNTIDA LÓPEZ CASTRO _____

ÍNDICE	PÁGINA
ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Enfermedades Neurodegenerativas.....	4
1.2 Panorama general sobre las enfermedades neurodegenerativas en México.....	5
1.3 Excitotoxicidad.....	7
1.3.1 Aminoácidos excitadores.....	7
1.3.2 Receptores glutamatérgicos.....	8
1.3.3 Calcio intracelular.....	9
1.4. Estrés oxidante.....	10
1.4.1 ERO, ERN y radicales libres.....	10
1.4.2 Antioxidantes.....	13
1.5 Ácido Quinolínico (QUIN).....	18
1.6 El ajo y sus derivados.....	21
1.6.1 Dialil Disulfuro (DADS).....	22
1.7 Factor de transcripción Nrf2.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
2.1 Hipótesis.....	26
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 objetivos particulares.....	26

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 Reactivos.	27
4.2 Animales.	27
4.3 Metodología.	28
4.3.1 Determinación de la dosis.	28
4.3.2 Administración intraestriatal de QUIN.....	29
4.3.3 Tratamiento del tejido para obtención de cortes histológicos.....	29
4.3.3.1 Efecto del DADS sobre el daño morfológico.....	30
4.4 Efecto del DADS sobre el daño conductual.....	30
4.5 Efecto del DADS sobre el daño oxidante a proteínas.	31
4.6 Efecto del DADS y QUIN sobre la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes.	32
4.6.1 Inmunohistoquímica.	32
4.6.2 actividad enzimática.	32
4.6.2.1 Actividad de la GST.....	32
4.6.2.2 Actividad de la CAT.....	33
4.6.2.3 Actividad de la GR.....	33
4.6.2.4 Actividad de la Gpx.	33
4.6.2.4. Determinación de proteínas totales	34
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	34
6. RESULTADOS.	34
6.1 Determinación de la dosis.	34
6.2 Efecto del DADS sobre el daño conductual medido como asimetría motora inducido por el QUIN.	38

6.3 Efecto del DADS sobre el daño oxidante a proteínas inducido por el QUIN. ...	39
6.4 Efecto del DADS y QUIN sobre la cantidad y actividad de las enzimas antioxidantes.	40
6.5 Efecto del DADS y del QUIN sobre la actividad de la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-Transferasa (GST).....	42
7. DISCUSIÓN.....	43
7.1 Determinación de la dosis.	43
7.2 El tratamiento con DADS previene el daño morfológico y conductual inducido por el QUIN.....	45
7.3 El tratamiento con DADS disminuye el daño oxidante a las proteínas inducido por el QUIN.....	46
7.4 Efecto del DADS y QUIN sobre la expresión de las enzimas antioxidantes.	47
7.5 Efecto del DADS y QUIN sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.	49
8. CONCLUSIÓN.....	50
9. PERSPECTIVAS.	50
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	51

ABREVIATURAS

ARE, Elementos de respuesta antioxidante

CDNB, 1-Cloro-2,4-dinitrobenzoceno

DAB, Diaminobencidina

DADS, Dialildisulfuro

DATS, Dialiltrisulfuro

DNPH, Dinitrofenilhidrazina

ERN, Especies reactivas de nitrógeno

ERO, Especies reactivas de oxígeno

GABA, Ácido γ -aminobutírico

GSH, Glutación reducido

GST, Glutación S-transferasa

H y E, Hematoxilina y eosina

QUIN, Ácido quinolínico

SON, Sintasa de óxido nítrico

TCA, Ácido tricloroacético

TrxR, Tiorredoxina reductasa

RESUMEN.

La administración intraestriatal (*i.e.*) de ácido quinolínico (QUIN) reproduce en roedores alteraciones morfológicas y bioquímicas a nivel celular así como alteraciones conductuales, siendo el estrés oxidante un mecanismo clave en la neurodegeneración inducida con QUIN. Hasta ahora, las terapias para los pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas son paliativas; por ello, la búsqueda de nuevos fármacos está justificada.

Los compuestos organosulfurados del ajo ejercen un efecto protector en modelos cuya fisiopatología involucra al estrés oxidante. En particular el dialildisulfuro (DADS) es un excelente antioxidante lipofílico; y por ello, en este trabajo se evaluó su efecto sobre el daño inducido por el QUIN.

Se utilizaron ratas Wistar macho (280-300 g) en 2 esquemas: **A.** 7 dosis de DADS de 20, 40 y 60 mg/kg cada 24 h iniciando 30 min antes de la administración del QUIN y **B.** 1 sola dosis de DADS de 60 y 100 mg/kg, 30 min antes de la administración del QUIN.

La administración de 1 dosis de DADS (100 mg/kg) mostró la mayor protección morfológica por ello, este esquema se empleó para determinar la asimetría motora, el nivel de proteínas oxidadas, la inmunorreactividad y la actividad en los siguientes grupos: Control (CT), DADS, QUIN y QUIN+DADS. Los grupos CT y DADS recibieron 1 μ L de SSI *i.e.*, mientras que los grupos QUIN y QUIN+DADS recibieron 1 μ L de QUIN (240 nmol) *i.e.* Los grupos CT y QUIN recibieron 500 μ L de aceite vegetal *i.g.*, mientras que los grupos DADS y QUIN+DADS recibieron DADS (100 mg/kg) en 500 μ L de aceite vegetal *i.g.*

La dosis de 20 mg/kg de DADS no modificó el daño morfológico inducido por el QUIN; Sin embargo, las dosis de 40, 60 y 100 mg/kg mostraron un efecto protector, siendo la dosis de 100 mg/kg la más efectiva. El tratamiento con DADS (100 mg/kg) mejoró la asimetría motora y disminuyó el nivel de proteínas oxidadas a los 7 días post lesión comparado con el grupo QUIN. Por otro lado, se observó que 3 h después de la administración del QUIN, el tratamiento con DADS (100

mg/kg) redujo la cantidad de células inmunorreactivas para la TrxR y restableció la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), comparado con el grupo QUIN. El efecto protector podría estar asociado con las propiedades antioxidantes del DADS ya que disminuyó el nivel de proteínas oxidadas, promovió la activación de la GST y reguló la expresión de la TrxR. Sin embargo, el mecanismo de cómo lo hace aún debe ser investigado.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Enfermedades Neurodegenerativas.

La esperanza de vida en las poblaciones humanas se ha incrementado a través de los años y ésta se ha visto acompañada por una marcada prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas; las cuales se caracterizan por una disfunción progresiva y pérdida neuronal. Estas enfermedades son un grupo heterogéneo de padecimientos con distintos fenotipos clínicos y etiología genética. A pesar de que la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son esporádicas, otras pueden ser ocasionadas por mutaciones genéticas que afectan una gran diversidad de proteínas. Sin embargo, existe evidencia sustancial que indica que la excitotoxicidad y el estrés oxidante son mecanismos fundamentales que participan en la degeneración neuronal (Hague et al., 2005).

Los procesos básicos que inducen neurodegeneración se consideran multifactoriales, tales como factores genéticos, ambientales y endógenos, éstos últimos incluyen dinámicas anormales de las proteínas como degradación y agregaciones defectuosas. Además, influyen otros factores como la formación de radicales libres, el estrés oxidante, la alteración de las funciones bioenergéticas y mitocondriales así como los procesos neuroinflamatorios. Estos mecanismos generalmente activan cascadas programadas de muerte celular jugando un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas.

Los estudios de patología molecular han permitido identificar de forma específica algunas de las alteraciones proteicas características de cada uno de los procesos neurodegenerativos y así se asocia a la enfermedad de Alzheimer con la producción anormal del péptido β -amiloide; a la enfermedad de Parkinson con los depósitos de α -sinucleína, componente importante de los cuerpos de Lewy; y a los desórdenes de poliglutaminas con la enfermedad de Huntington (Jellinger, 2003).

1.2 Panorama general sobre las enfermedades neurodegenerativas en México.

La demencia y otros trastornos neurodegenerativos han ido aumentando a través del tiempo. En el periodo de 1985-2010, la enfermedad de Parkinson (Figura 1), alcanzó el punto más alto de mortalidad en el año 2005 con una tasa de 12.2 defunciones por cada 100 mil habitantes, siendo el grupo de mayor impacto el de 60 años y más.

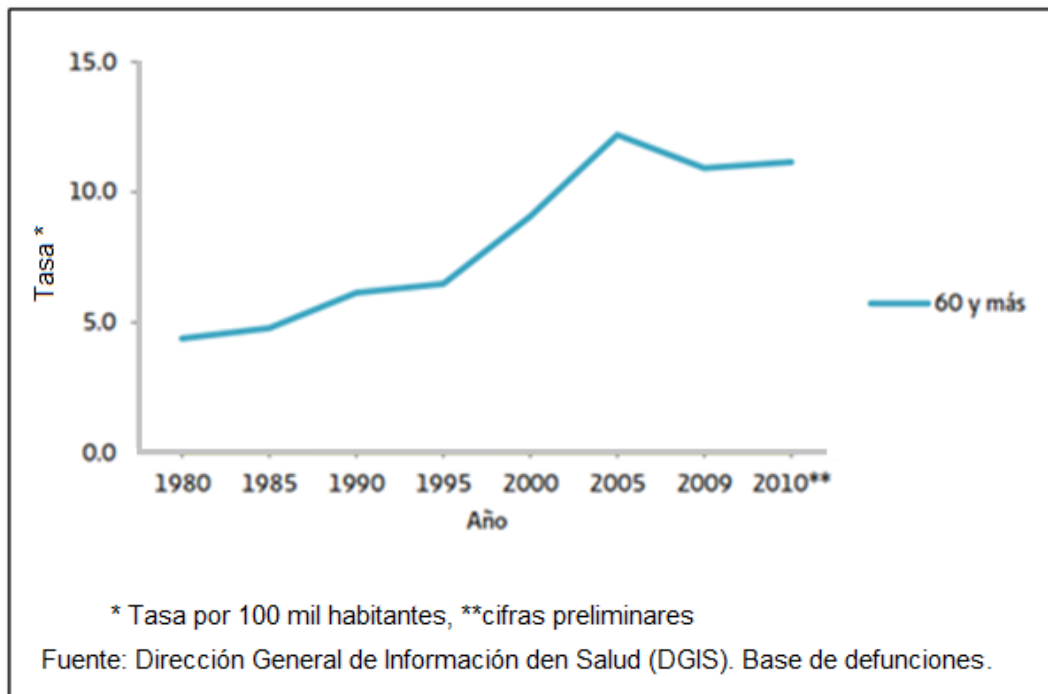


Figura 1. Mortalidad asociada con la enfermedad de Parkinson en la categoría de individuos con 60 años y más en México (1980-2010).

En la mortalidad por esclerosis múltiple (Figura 2) las personas de 60 años y más son aquellas que muestran la tasa de mortalidad más alta con 1.1 defunciones por cada 100 mil habitantes en el año 2009.

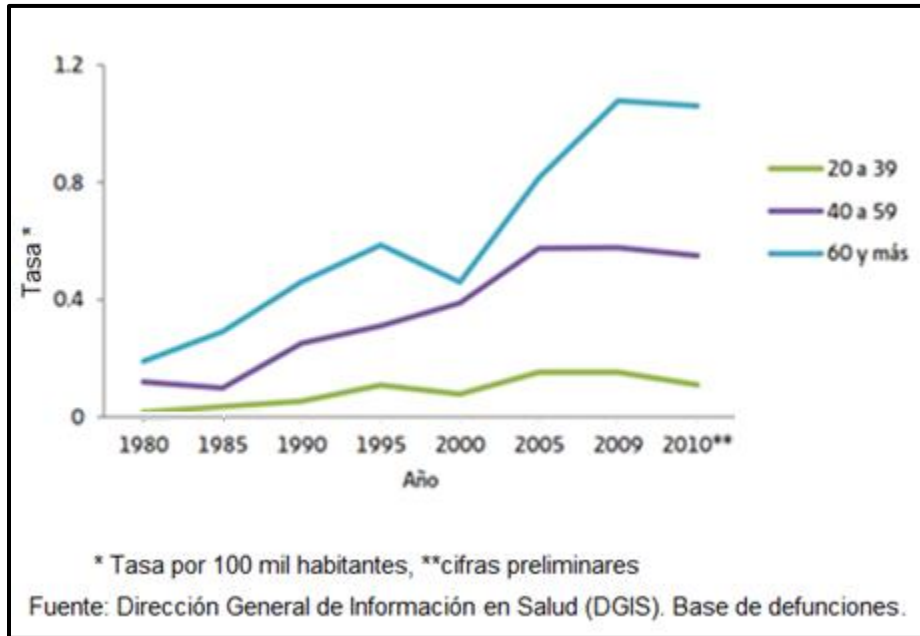


Figura 2. Mortalidad asociada a la esclerosis múltiple según la edad en México (1980-2010).

Las defunciones por Alzheimer han aumentado en un 210% desde el año 2000 al 2009. En la Figura 3 se puede observar que el grupo con mayor riesgo de fallecer a causa de esta enfermedad es el sexo femenino.

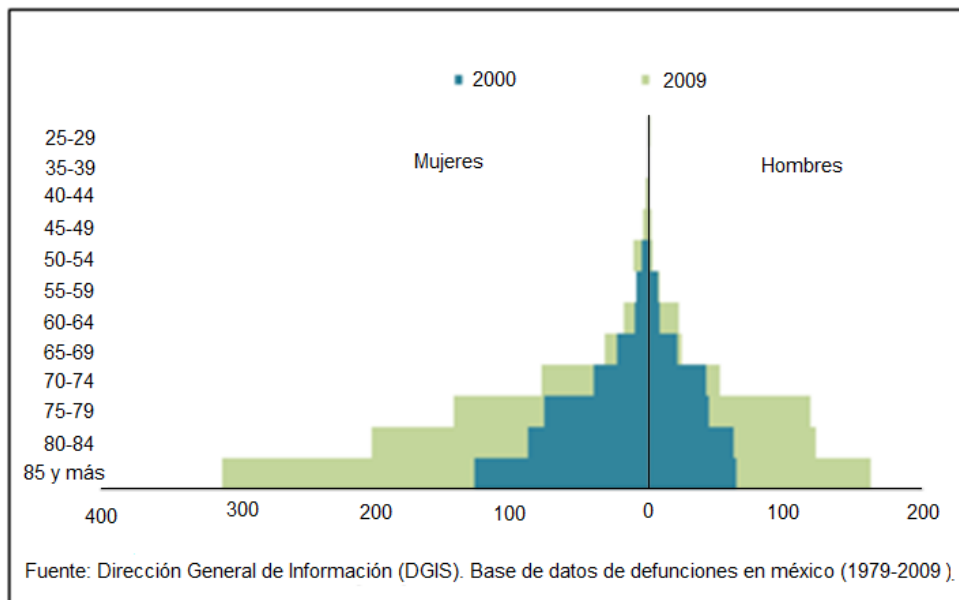


Figura 3. Defunciones asociadas a la enfermedad de Alzheimer por sexo (2000 y 2009).

En el 2005 se reportó que en México existen alrededor de 800 personas con la enfermedad de Huntington. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, se atienden alrededor de 300 personas afectadas por este padecimiento hereditario que presenta muy elevado riesgo de transmisión a la descendencia, ya que cada hijo de padre con la enfermedad de Huntington tiene una posibilidad de 50% de desarrollarla (Disponible en web: DGIS, 2012; DGEP, 2010; INNN, 2013).

1.3 Excitotoxicidad.

El concepto de excitotoxicidad implica que los aminoácidos excitadores ejercen un efecto excitatorio y neurotóxico. Mientras que son esenciales para la actividad neuronal normal, su efecto neurotóxico se alcanza cuando un exceso de neurotransmisores se acumula en el espacio sináptico provocando alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial y en la homeostasis del Ca^{2+} contribuyendo a la muerte celular (Beal, 1994).

1.3.1 Aminoácidos excitadores.

Los aminoácidos glutamato, glicina y el ácido γ -aminobutírico (GABA) derivado del glutamato, son neurotransmisores esenciales para el funcionamiento normal del Sistema Nervioso Central (SNC). El glutamato y el GABA son los neurotransmisores más abundantes en el SNC y la glicina lo es en la médula espinal. El glutamato al actuar sobre receptores ionotrópicos o metabotrópicos, es el principal neurotransmisor excitador del SNC en mamíferos y está involucrado en diversos procesos como el aprendizaje, la memoria y el desarrollo neural. Además, cualquier manipulación directa a sus receptores puede comprometer importantes funciones fisiológicas.

Un incremento en la concentración de glutamato en el espacio sináptico puede producir efectos neurotóxicos asociados a la etiología de enfermedades agudas (hipoxia, isquemia, traumatismo cerebral) o crónicas (enfermedades neurodegenerativas) (Ozawa et al., 1998).

Las neuronas glutamatérgicas juegan un papel importante en las funciones neurofisiológicas. En condiciones normales, el glutamato es el mayor neurotransmisor en la percepción primaria y cognitiva en el cerebro, produciendo una respuesta excitatoria. Ésta respuesta se genera como consecuencia de una interacción entre el glutamato y su receptor ionotrópico. La sobreactivación de los receptores de glutamato pueden resultar en la disfunción neuronal y la muerte mediante un proceso llamado excitotoxicidad (Sims et al., 1995).

1.3.2 Receptores glutamatérgicos.

Los efectos excitatorios del glutamato ocurren por medio de la activación de 3 tipos de receptores ionotrópicos y varias clases de receptores metabotrópicos unidos a proteínas-G. Los receptores ionotrópicos activados por el glutamato son el receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr), el receptor α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPAr) (Figura 4) y el receptor de ácido kaínico (KA). Estos receptores ionotrópicos están ligados a canales iónicos permeables a varios cationes (Danysz y Parsons, 2003).

Los receptores de NMDA son dependientes de Ca^{2+} y se expresan en neuronas centrales, tienen gran permeabilidad al Ca^{2+} lo que les adjudica propiedades de conductancia (Rothstein, 1996). La continua activación de un gran número de receptores NMDA (especialmente los subtipos NR1/NR2B) conlleva al incremento del Ca^{2+} intracelular promoviendo la actividad enzimática que propicia una cascada de eventos que eventualmente culminan en apoptosis o necrosis (Ndountse y Chan, 2009). Estos efectos favorecen la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de caspasas, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN), radicales libres y en conjunto la toxicidad neuronal (Fan y Raymond, 2007).

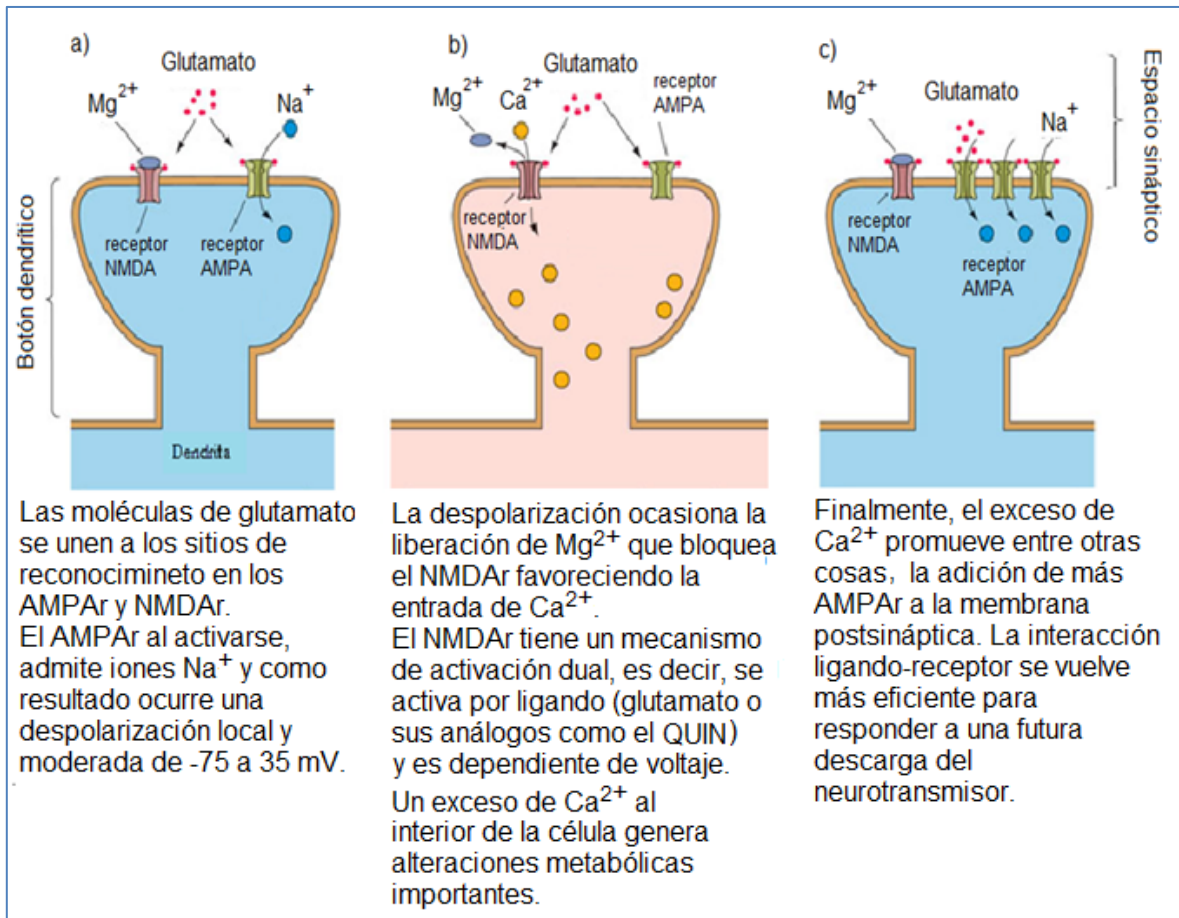


Figura 4. Activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA). Diagrama modificado de Kemp y McKernan, 2002.

1.3.3 Calcio intracelular

Se sabe que el sistema nervioso central es particularmente vulnerable a variaciones energéticas debido a dos principales razones: i) la elevada tasa metabólica de las células neuronales y ii) su baja capacidad para almacenar substratos energéticos. Consecuentemente, cualquier deficiencia de substratos energéticos produce cambios importantes en las concentraciones iónicas intra y extracelulares afectando también al potencial de membrana (Martin et al., 1994).

La excitotoxicidad involucra una elevación de Ca^{2+} intracelular en respuesta a una exposición continua de aminoácidos excitadores, principalmente a glutamato (Massieu et al., 1995). Una perturbación en el flujo de Ca^{2+} intracelular potencia rutas metabólicas letales que comprenden la activación de enzimas degradativas,

la formación de ERO/ERN y la disfunción mitocondrial (Rami et al., 1997) conduciendo a la célula a la muerte por necrosis o apoptosis.

El influjo sostenido de Ca^{2+} a través de los canales iónicos de los receptores de glutamato representa un mecanismo común de muerte celular. El exceso de glutamato en el SNC puede resultar en una elevada concentración de Ca^{2+} en organelos sensibles como la mitocondria y el retículo endoplásmico (Friedman, 2006). Debido al rol esencial del Ca^{2+} en promover la muerte celular, el bloqueo del influjo de Ca^{2+} puede reducir la sensibilidad a los estímulos apoptóticos. Un ejemplo es la calcineurina una serina-treonina fosfatasa dependiente de Ca^{2+} , que estimulada por la calmodulina induce apoptosis en neuronas de hipocampo así como en células HeLa (Wang et al., 1999). Adicionalmente, numerosos estudios han demostrado que la activación de la calpaína, una proteasa apoptótica dependiente de Ca^{2+} también precede a la muerte celular bajo condiciones elevadas de Ca^{2+} (Wang, 2000).

1.4 Estrés oxidante.

El estrés oxidante es consecuencia de un desequilibrio en la homeostasis redox celular y tiene una gran implicación en la patología de los desórdenes neurodegenerativos. La relación entre el estrés oxidante y la muerte neuronal ha sido estudiada ampliamente. El estrés oxidante daña proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y modifica la permeabilidad mitocondrial, lo que a su vez puede estimular la producción de ERO, afectar el metabolismo energético y liberar factores pro-apoptóticos al citoplasma como es el caso del citocromo c (Nicholls, 2004.)

1.4.1 ERO, ERN y radicales libres.

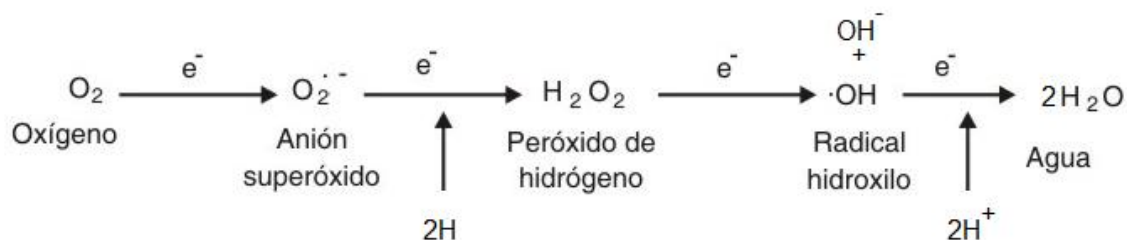
Un radical libre se define como un átomo o grupo de átomos que contienen uno o más electrones desapareados dentro de su estructura, éstas especies son altamente reactivas; por ello, su tiempo de vida media es menor a 1 μs y se combinan para generar moléculas más estables.

Un radical libre se forma cuando un enlace se fragmenta homolíticamente, para lo cual se debe suministrar suficiente energía para dissociar el enlace, dicha energía puede ser suministrada por una reacción de óxido-reducción transfiriendo electrones.

La reacción de Fenton (Reacción 1), implica la oxidación del Fe(II) a Fe(III) mediada por el H₂O₂, el cual se fragmenta en un ión hidróxido (OH⁻) y un radical hidroxilo (OH[·]), éste último es de muy alta energía y puede oxidar y fragmentar cualquier compuesto orgánico (Konigsberg, 2008).



La reducción univalente del O₂ (Reacción 2) genera algunas especies radicales y no radicales (Ghaffari, 2008):



(Reacción 2)

En la tabla 1 se enlistan las principales ERO/ERN de importancia biológica y en la tabla 2, se mencionan las fuentes, la reactividad y la eliminación de las mismas.

Tabla 1. Principales ERO y ERN de importancia biológica.

Especies reactivas de oxígeno		Especies reactivas de nitrógeno	
Radicales	No radicales	Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Óxido nítrico (NO^{\cdot})	Peroxinitrito $ONOO^-$
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Ácido hipocloroso (HOCl)	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})	Anión nitroxilo (NO^-)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Oxígeno singulete ($1\Delta g$)		Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)		Ácido nitroso (HNO_2)
	Ozono (O_3)		

(Halliwell 2006)

Tabla 2. Fuentes, reactividad y eliminación de las principales ERO y ERN

Especie	Fuente	Reactividad	Eliminación
O_2	Externa, Catalasa	Hemo, Fe (II), flavinas, alcoxilos, NO^{\cdot}	Respiración, oxidasas
O_3	Externa	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos, y demás compuestos celulares	Ascorbato
1O_2	Fotosensibilización, descomposición del H_2O_2 , dismutación del $O_2^{\cdot-}$	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos, y demás compuestos celulares	Carotenos, tocoferoles, glutatión, ascorbato
$O_2^{\cdot-}$	Interna: cadena respiratoria, NADPH oxidasas, xantinaoxidasas, lipoxigenasa, P_{450} , hemoglobina, peroxidasas	$O_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} , Fe (III), [4Fe-4S], quinonas, difenoles	Superóxido dismutasa (SOD) y dismutación espontánea
H_2O_2	Dismutación del $O_2^{\cdot-}$	Ascorbato, hemo, Fe-S	Catalasa, peroxidasas, peroxirredoxinas
$^{\cdot}OH$	Reacción de Fenton	Cualquier compuesto vecino	Glutatión, ascorbato, solutos compatibles
NO^{\cdot}	sintasa de óxido nítrico (SON)	$O_2^{\cdot-}$, hemo, Fe-S, tioles	Hemoglobina, flavohemoglobina
$ONOO^-$	$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot-}$	CO_2 , $O_2^{\cdot-}$, hemo, Fe-S, tioles, lípidos	Espontánea
NO_2^{\cdot}	$ONOO^- + CO_2$	Tir, Trp, Cis, hemo, lípidos	Glutatión, ascorbato

(Konigsberg, 2008)

1.4.2 Antioxidantes.

Los organismos vivos han desarrollado múltiples líneas de defensa contra el estrés oxidante. En éste proceso de defensa participan dos tipos de moléculas (Dinkova-Kostova et al., 2007):

- 1 Antioxidantes directos, compuestos de bajo peso molecular (ascorbato, glutatión, tocoferoles, ácido lipoico, ubiquinonas, carotenos) que pueden atrapar productos de la oxidación de especies reactivas como los peróxidos, ERO, ERN y que se consumen o modifican durante su proceso de acción antioxidante siendo necesario su reemplazo o regeneración.
- 2 Antioxidantes indirectos, éstos agentes pueden o no tener actividad redox y ejercen muchos de sus efectos a través de la regulación positiva de las enzimas de fase II. Estas enzimas actúan catalíticamente, exhiben tiempos de vida media prolongados y presentan gran variedad de actividad detoxificante y antioxidante.

Las proteínas y enzimas relacionadas con un efecto antioxidante se pueden clasificar en 3 grupos principales (Lee et al., 2003):

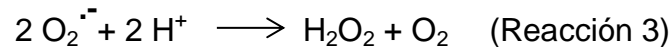
Grupo 1. Proteínas involucradas en la homeostasis del glutatión (GSH) como la glutatión-S-transferasa (GST), la γ -glutamin cisteín ligasa (GCLC), la glutatión peroxidasa (GPx), la peroxirredoxinas (PRx) y la glutatión reductasa (GR).

Grupo 2. Proteínas involucradas en la detoxificación del H_2O_2 y la homeostasis del Fe como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), las peroxirredoxinas (PRx), la tiorredoxina (Trx), la hemooxigenasa-1 (HO-1) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

Grupo 3. Proteínas involucradas en la homeostasis del NADPH como el citocromo P4501B1 (CYP1B1), la GST, la TrxR, la NADPH:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), la GR y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

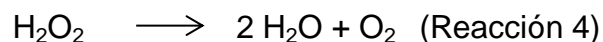
A continuación se enlistan algunas de las proteínas pertenecientes a los 3 grupos descritos anteriormente.

- Las SOD son una familia de enzimas que catalizan eficazmente la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ (Reacción 3):



Existen 3 tipos de SOD (Flynn y Melov, 2013; Konigsberg, 2008):

- i) SOD1 conocida como CuZnSOD por tener Cu y Zn en su centro catalítico, se localiza en citoplasma, núcleo, peroxisomas y en la membrana externa de la mitocondria.
 - ii) SOD 2 conocida como MnSOD por tener Mn en su centro catalítico, se localiza en la membrana interna de la mitocondria.
 - iii) SOD 3 conocida como ECSOD, tiene Cu y Zn en su centro catalítico y es extracelular asociada a la heparina.
- La catalasa es una enzima que descompone al H_2O_2 directamente en O_2 y agua (Reacción 4).



Existen variedades de catalasas, las hemocatalasas con Fe como grupo prostético en mamíferos y las catalasas que contienen manganeso en bacterias (Konigsberg, 2008).

- La NQO1 es una flavoproteína ampliamente distribuida que promueve la reducción de dos electrones de quinonas, compuestos nitroaromáticos y

colorantes tipo azo (Figura 5). Estas reducciones abaten los niveles de quinonas y minimizan la oportunidad de generar intermediarios reactivos. NQO1 es una enzima altamente inducible regulada por la vía Keap1/Nrf2/ARE (Siegel et al., 2012)

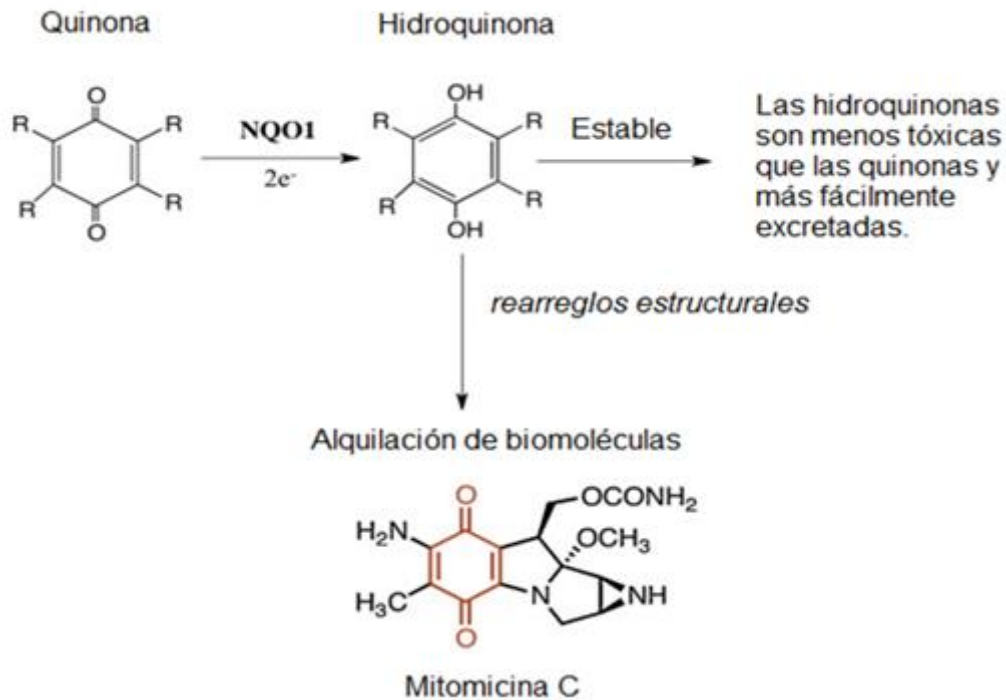
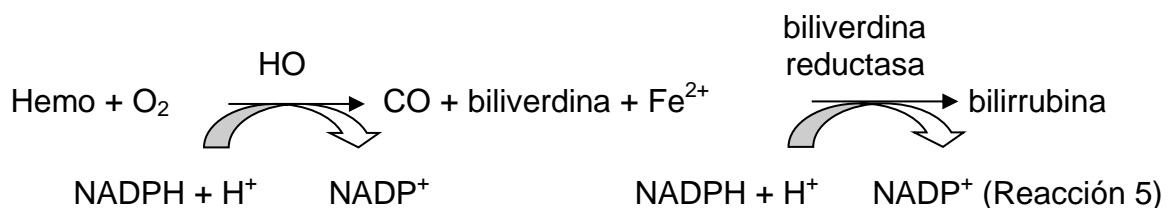


Figura 5. Reducción de la quinona por la NADPH:quinona óxidorreductasa (NQO1) (modificado de Siegel, 2012).

- La HO es la enzima que cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo, produciendo monóxido de carbono, hierro y biliverdina (Reacción 5). En un siguiente paso, la biliverdina reductasa convierte la biliverdina en bilirrubina. En los mamíferos se ha descrito la expresión de al menos dos isoformas de la HO codificadas por dos diferentes genes, denominadas HO-1 y HO-2 (Königsberg, 2008).



- La Trx junto con la TrxR y el NADPH comprenden el sistema de la Trx. La TrxR es una selenoenzima con 3 isoformas, TrxR1 en el citosol, TrxR2 en la mitocondria y TrxR3 o TGR (tiorredoxina glutati3n reductasa). La descripci3n m1s general del sistema de la Trx es su rol como reductor de disulfuros proteicos que se presenta en la (Figura 6).

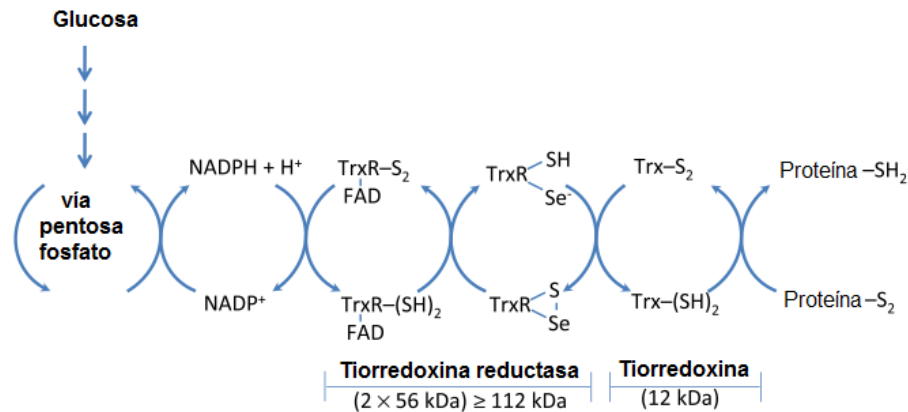


Figura 6. Sistema de la Tiorredoxina (Trx) – Tiorredoxina Reductasa (TrxR). El NADPH es la fuente de electrones del sistema, proveniente en gran cantidad de la vía de las pentosas fosfato. La Trx oxidada (Trx-S) se reduce mediante la acción del NADPH y la selenoenzima TrxR. Los electrones son transferidos del NADPH al FAD y después hacia el disulfuro activo redox N-terminal de la TrxR, finalmente se transfieren al siti o activo C- terminal Gly-Cys-*Sec-Gly de la otra subunidad. La tiorredoxina reducida (Trx-SH) cataliza la reducción del enlace disulfuro en las proteínas (Modificada de Day, 2009). *Sec (Selenocisteína).

- El GSH es uno de los tioles no proteínicos más estudiados a nivel intracelular debido al papel crítico que juega en la fisiología y bioquímica celular. Es un tripéptido que se encuentra en altas concentraciones en todas las células en el cerebro, su síntesis se lleva a cabo en astricitos y neuronas a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (Figura 7), el grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína, es requerido para la reducción de puentes o enlaces disulfuro de las proteínas y para deshacerse de moléculas oxidantes y electrófilos. El GSH participa en diversos procesos celulares como la síntesis de DNA y la modulación de la función protéica, además de ejercer un rol importante en el sistema antioxidante celular

(Sims et al., 2004; Njalsson, 2005). El GSH puede reaccionar de manera no enzimática con compuestos oxidantes o apoyar la actividad de la GPx en el aclaramiento de peróxidos orgánicos, también se encuentra involucrado en reacciones detoxificantes de compuestos electrofílicos vía la GST (Figura 8) (Maher, 2005).

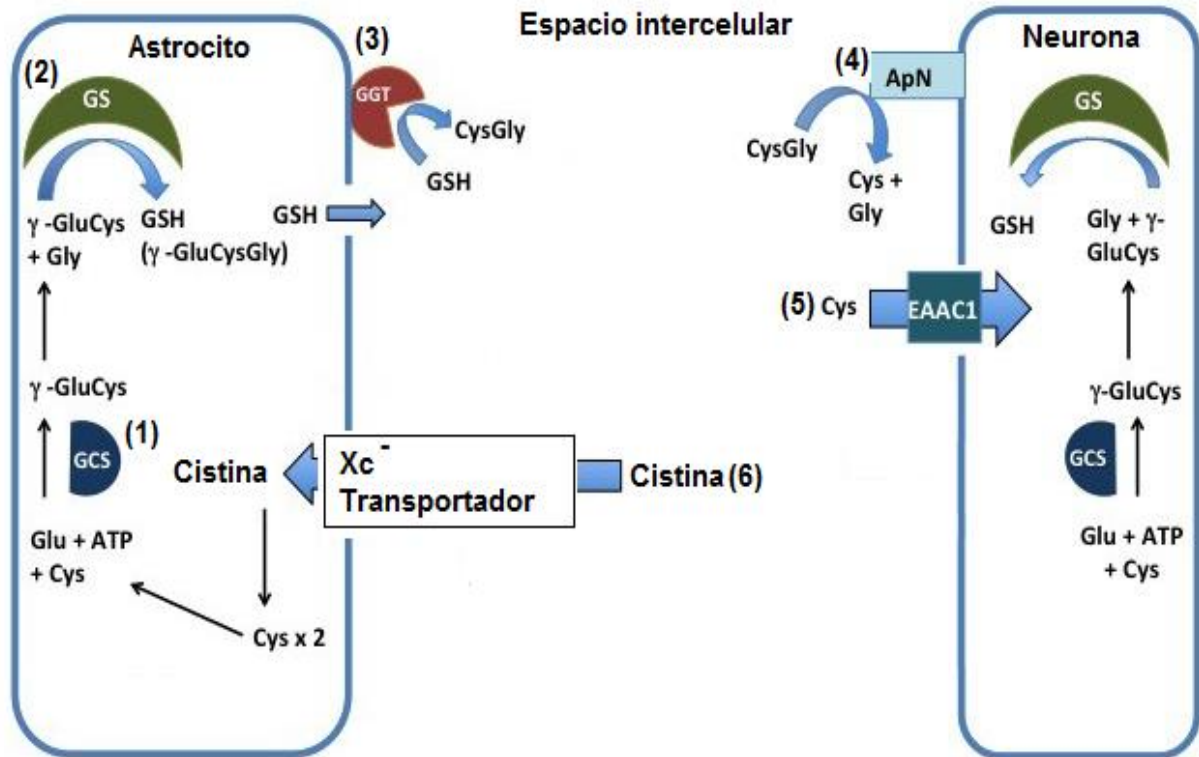


Figura 7. Síntesis del Glutatión. (1) El glutamato (Glu) y la cisteína (Cys) se unen para formar el dipéptido γ -glutamilcisteína (γ -GluCys) a través de la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS). (2) Posteriormente se adiciona glicina (Gly) para formar glutatión (GSH) en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa (GS). Estas reacciones ocurren tanto en astrocitos como en neuronas. Ante una demanda neuronal de GSH, los astrocitos pueden secretar GSH al espacio intercelular (3) donde se separa en Glu y Cys-Gly por la γ -glutamiltranseptidasa (GGT). (4) El dipéptido Cys-Gly se separa en Glu y Cys-Gly por la aminopeptidasa (ApN) ubicada en la membrana neuronal. (5) La cisteína libre se transporta al interior de la neurona mediante un transportador de aminoácidos excitadores conocido como EAAC1, dentro de la neurona la cisteína participa en la síntesis de GSH. (6) Por otro lado, la cys se dimeriza para formar cistina que ingresa al interior del astrocito mediante el transportador Xc^- donde genera cys nuevamente el cual se usará para la síntesis de GSH. Figura modificada de (Johnson, 2012).

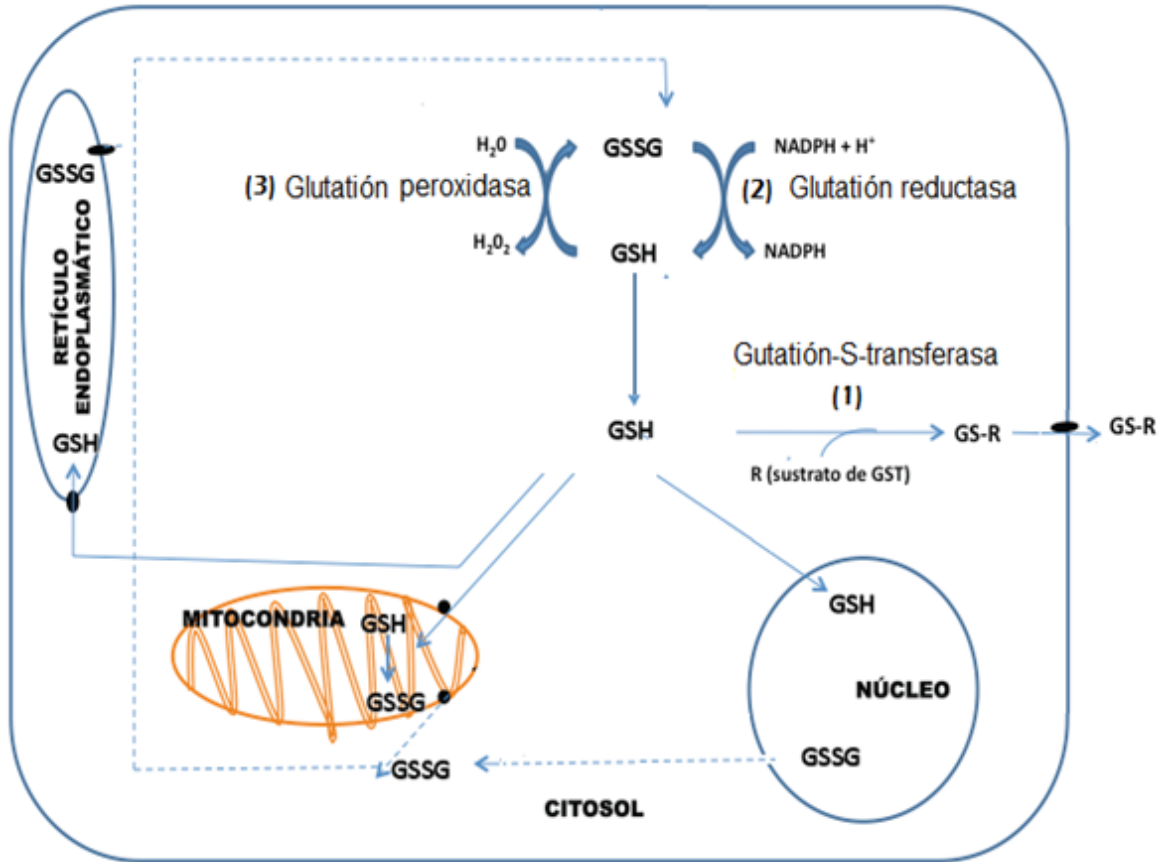


Figura 8 Metabolismo del Glutatión. (1) El glutatión (GSH) se conjuga con el sustrato (reacciones de fase II) mediante la Glutatión-S- transferasa (GST) y se transporta hacia el exterior de la célula. (2) El glutatión oxidado (GSSH) proveniente del núcleo, el retículo endoplásmico y la mitocondria, es transportado hacia el citosol donde puede iniciar de nuevo el ciclo de reducción mediante la glutatión reductasa (GR). (3) la oxidación del GSH está mediada por la enzima Glutatión peroxidasa que a su vez reduce el peróxido de hidrógeno en agua. La relación normal entre la concentración de GSSG y GSH es de 1/10, variando la concentración de GSH entre 1 y 10 mM. Imagen modificada de (Martínez-Sámano et al., 2011).

1.5 Ácido Quinolínico (QUIN).

El ácido 2,3-piridindicarboxílico (QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptófano sintetizado como un subproducto del metabolismo de la kinurenina (Vender, 1975). La vía de la kinurenina (KP) es la mayor ruta catabólica del triptófano en mamíferos y uno de sus metabolitos es el QUIN, sintetizado a partir de una sucesión de reacciones enzimáticas (Figura 9).

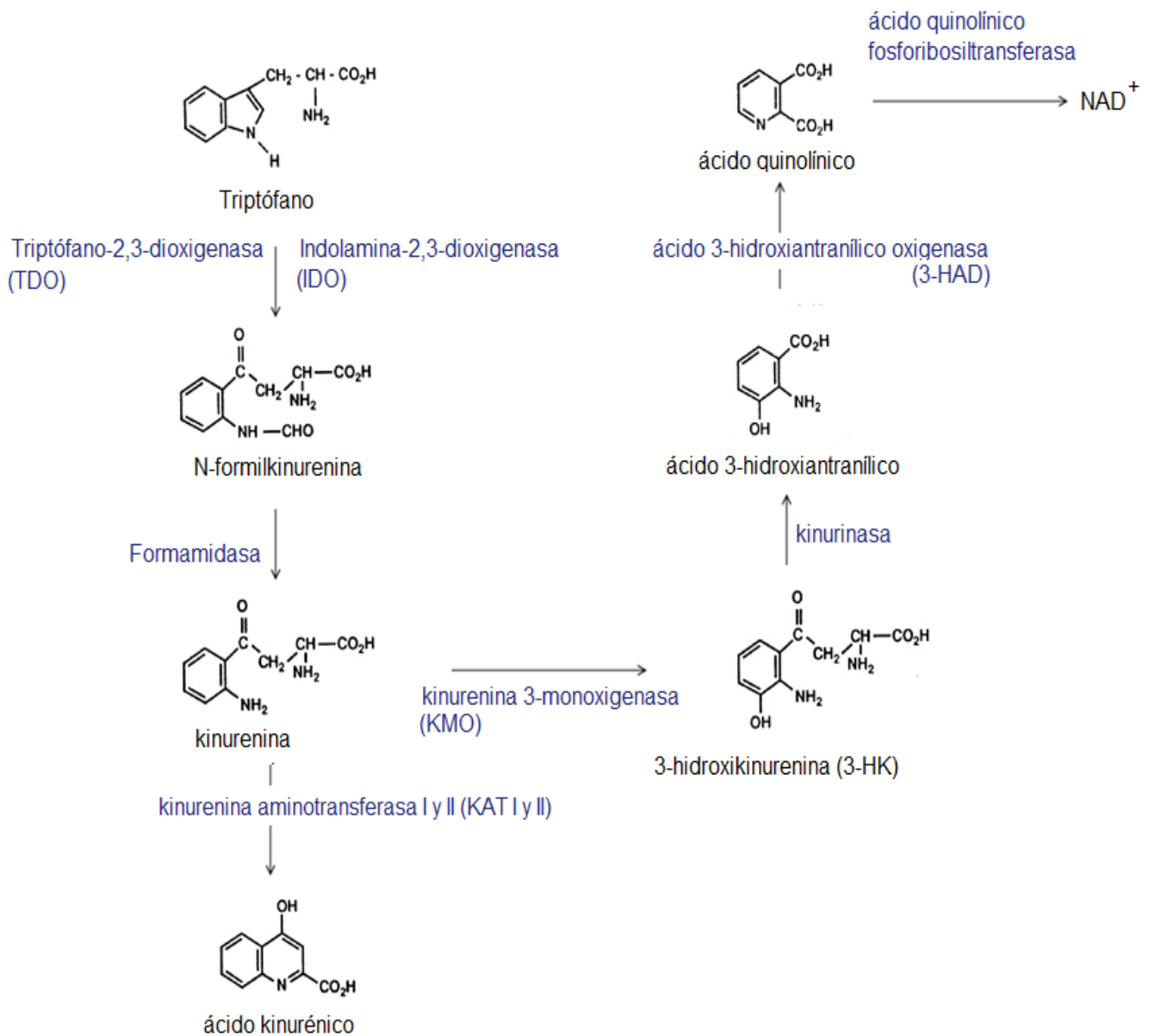


Figura 9. Vía de la kinurenina.

La KP contiene al menos dos metabolitos neuroactivos además del QUIN, el precursor de éste, la 3-hidroxikinurenina (3-HK) y el ácido kinurénico (KYNA). Las propiedades neurobiológicas de éstos compuestos incluyen la generación de radicales libres por la 3-HK (Vázquez et al., 2000) y la inhibición de los NMDAr por el KYNA.

El triptófano, la kinurenina y la 3-HK penetran rápidamente la barrera hematoencefálica, pero no existe un mecanismo de transporte para el QUIN y el KYNA (Fukui et al., 1991; Gal y Sherman, 1980), es por eso que la administración de QUIN se efectúa vía intraestriatal.

La formación de complejos QUIN-Fe puede generar OH[·] mediante la reacción de Fenton siendo las lesiones estriatales inducidas con el QUIN significativamente atenuadas mediante el tratamiento con agentes que se unan al Fe II o que atrapen ERO (Müller et al., 2007; Santiago-López et al., 2004).

El QUIN al ser administrado intraestriatalmente en roedores y primates produce degeneración de neuronas espinosas medianas (Ferrante et al., 1993).

Estudios previos indican que el QUIN es capaz de inducir una reducción en el consumo de O₂ alrededor de 6 h después de su administración, sugiriendo que la disfunción mitocondrial y la disminución en los niveles de ATP y NAD están involucrados en la cascada tóxica mediada por el QUIN a través del flujo excesivo de Ca²⁺ que induce excitotoxicidad y muerte celular (Vezzani et al., 1987; Bordelon et al., 1997).

Las lesiones con QUIN, un agonista glutamatérgico endógeno tipo NMDA, proveen un modelo que mimetiza algunas de las alteraciones conductuales, morfológicas y bioquímicas observadas en la enfermedad de Huntington. Estos cambios incluyen: hiperactividad (Sandberg et al., 1989), discapacidad cognitiva (Furtado y Mazurek, 1996), disminución de los marcadores para neuronas espinosas medianas y reducción de los índices de neurotransmisión GABAérgica y colinérgica (Norman et al., 1989; Reynolds et al., 1997).

El SNC es particularmente vulnerable al estrés oxidante debido a su alta tasa en el consumo de O₂ y a las altas concentraciones que posee de Fe y moléculas oxidables como catecolaminas y ácidos grasos poliinsaturados (Benzi y Moretti, 1995). El daño oxidativo a las biomoléculas se acumula a lo largo de la vida de la neurona lo cual se ha asociado al envejecimiento celular y a la neurodegeneración (Harman, 1956; Mattson et al., 1993).

1.6 El ajo y sus derivados.

El ajo (*Allium sativum*) es empleado con frecuencia como condimento y suplemento alimenticio, le son atribuidas propiedades antioxidantes, cardioprotectoras, anticoagulantes y anticancerígenas (Siddique y Afzal, 2004; Ohaeri y Adoga, 2006; Steinmetz et al., 1994). Sus compuestos organosulfurados derivados como la S-alilcisteína, la alicina, el dialildisulfuro (DADS), entre otros, han demostrado disminuir el daño causado por las ERO, además de inhibir la actividad de la sintasa de óxido nítrico (SON) lo cual contribuye a disminuir el estrés nitrosante (Chang y Chen .2005)

El ajo contiene predominantemente sulfóxido de S-alilcisteína (alina). Cuando el ajo se corta y entra en contacto con el O₂ del ambiente, los sulfóxidos se degradan enzimáticamente a ácidos sulfénicos como la alicina los cuales se descomponen de manera espontánea. Los ácidos alil, metil y propil sulfénicos dan lugar a los tiosulfonatos que son inestables particularmente al calor y se descomponen en una mezcla de compuestos donde predominan los mono, di, tri y tetra sulfuros (Figura 10) (Malgorzata et al., 2012).

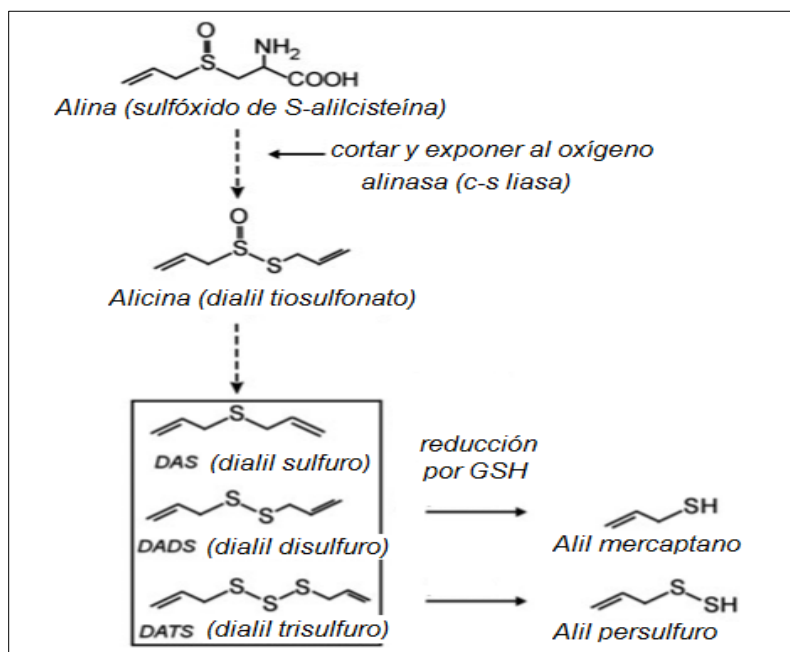


Figura 10. Degradación enzimática de la alina (Lanzotti, 2006).

1.6.1 Dialildisulfuro (DADS)

El aceite de ajo contiene diversos compuestos sulfurados, incluyendo el dialilsulfuro, el DADS y el dialiltrisulfuro. Estudios previos reportan la inducción de la síntesis de enzimas metabolizadoras como el CYP2B y la NQO1 mediadas especialmente por el DADS (Fisher et al., 2007).

El dialilsulfuro, el DADS y el dialiltrisulfuro han sido identificados como los tres principales componentes del aceite de ajo (Wu et al., 2004). Debido a que se ha documentado que estos compuestos afectan la regulación transcripcional de enzimas hepáticas de fase I y fase II, es razonable esperar que se observe un efecto similar en otros tejidos como lo es el cerebro, siendo el factor Nrf2 quien juegue un papel preventivo contra la toxicidad mediada por xenobióticos, induciendo la expresión de enzimas antioxidantes (Jaiswal, 2004).

El DADS se ha reconocido como un compuesto quimiopreventivo. Estudios indican que este compuesto inhibe la proliferación de células cancerígenas en diferentes tipos de cáncer humano como cáncer de mama (Nakgawa et al., 2001), de colon (Sundaram y Milner, 1996), de pulmón (Sakamoto et al., 1997) y en la leucemia (Kwon et al., 2002). También se ha reportado que el tratamiento con DADS incrementa la actividad de la GST y la NQO1 en el hígado de ratón, ambos antioxidantes enzimáticos regulados por el factor de transcripción Nrf2 (Srivatsava et al., 1997)

Los derivados polisulfurados del ajo pueden ser biodegradados a hidroperitioles, radicales tiol, radicales peritiole, azufre elemental (S_8), disulfuros mezclados con proteínas, H_2S y sulfatos inorgánicos (Chatterji et al., 2005).

Es posible que el DADS se metabolice en una secuencia de reacciones como sigue; DADS (S-S), aliltiol (-SH), anión tilolato ($-S^-$), radical tiol ($-S\cdot$), disulfuros de proteínas, sulfuro de hidrógeno y sulfatos (SO_3^{2-} y SO_4^{2-}). Estas reacciones en las células de hígado promueven la síntesis de GSH, la

estimulación del metabolismo de la cisteína y finalmente una acción antioxidante (Malgorzata et al., 2012).

1.7 Factor de transcripción Nrf2

Ante un reto oxidante, la célula debe aumentar rápidamente su capacidad antioxidante para contrarrestar el incremento de ERO y mantener la homeostasis. El factor de transcripción Nrf2 ayuda a controlar la homeostasis redox, ya que en condiciones oxidantes, la vía de señalización se activa con el fin de generar la expresión de una multitud de antioxidantes y enzimas de fase II que reestablecen la homeostasis redox. La proteína Keap1, rica en cisteínas, que se encuentra anclada a la actina en el citosol, interactúa con el Nrf2 como proteína adaptadora para Culina 3 (Cul3) que es un complejo de ubiquitin ligasa. Bajo condiciones normales, Keap 1 promueve la ubiquitinación y la eventual degradación de Nrf2, éste es un evento rápido (la vida media de Nrf2 es de 13 a 21 min) lo que permite mantener un nivel basal bajo de Nrf2 (Kobayashi M y Yamamoto M. 2006).

Los residuos de cisteína que posee la proteína Keap 1 le permiten actuar como sensor, detectando cambios en el estado redox de la célula, un incremento del mismo conlleva a la oxidación de los residuos de cisteína específicos (C¹⁵¹, C²⁷³, C²⁸⁸, C⁶¹³) lo que deteriora su actividad como proteína adaptadora. Así, en presencia de estrés oxidante, Keap 1 se vuelve menos eficiente para promover la degradación de Nrf2 (Kobayashi y Yamamoto, 2006). Nrf2, cuyo tiempo de vida media se extiende de 100 a 200 min en condiciones de estrés oxidante (Hong et al., 2005), es traslocado al núcleo donde activa la transcripción de una gama de genes citoprotectores incluyendo los componentes del sistema antioxidante capaz de balancear los altos niveles de ERO (Figura 10).

La señal de exportación nuclear localizada en el dominio de transactivación de Nrf2, es también sensible al estado redox. Contiene un residuo de cisteína en la posición 183 que se modifica bajo condiciones de estrés oxidante ocasionando que su actividad exportadora disminuya y aumentando la retención de Nrf2 en el núcleo (Li et al., 2006) donde se acumula y se asocia a la proteína Maf, formando

un heterodímero que se une al ADN, específicamente al elemento de respuesta antioxidante (ARE) característico de los genes citoprotectores (Baird y Dinkova, 2011).

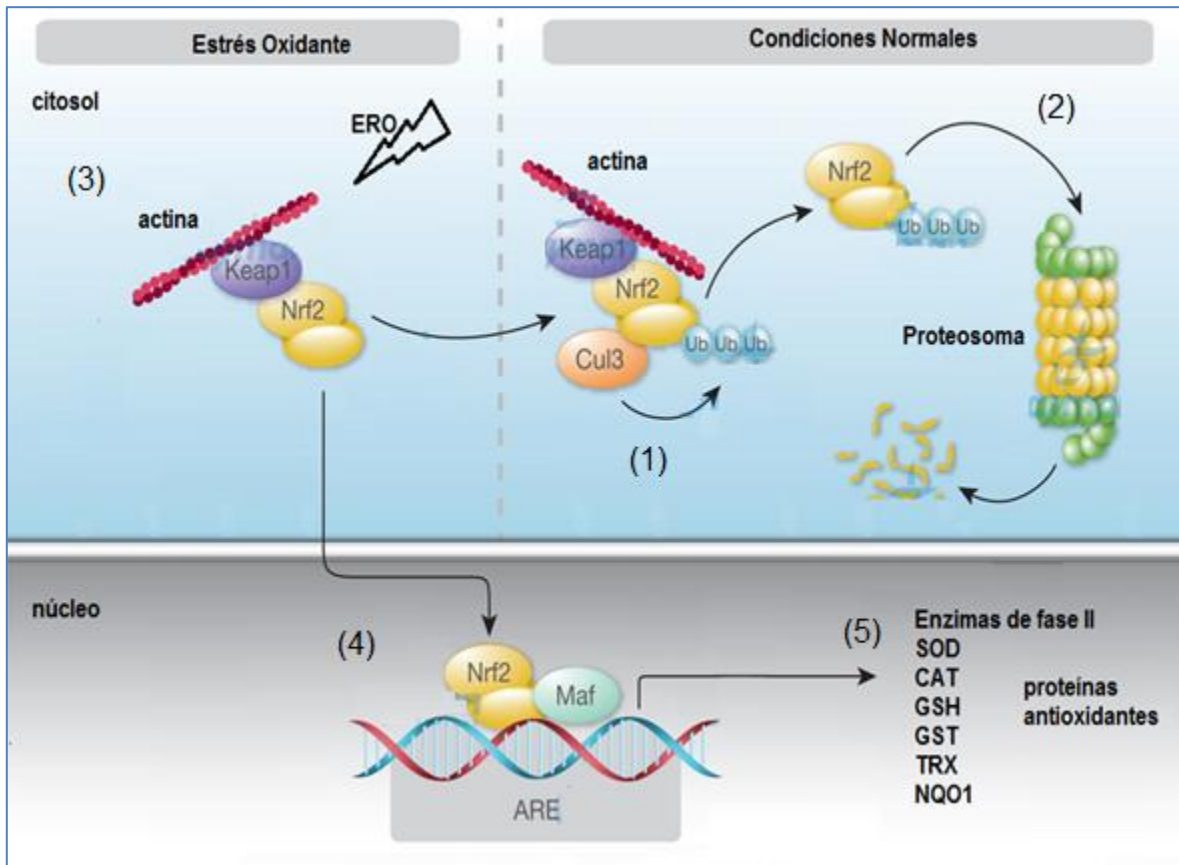


Figura 11. Vía de activación Keap1/Nrf2/ARE. Bajo condiciones normales (1), el complejo Keap1-Nrf2 se encuentra unido a Cul 3 lo cual propicia su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma (2). Bajo condiciones de estrés oxidante (3), Nrf2 no se ubiquitina y se trasloca al núcleo, (4) reconoce a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) activando la transcripción de enzimas antioxidantes (5) (Modificada de May, 2013).

La vía de señalización Keap1-Nrf2-ARE (Figura 11) regula alrededor de 600 genes citoprotectores que confieren diferentes barreras de protección, entre ellas se encuentran enzimas antioxidantes, proteínas que exportan xenobióticos y sus metabolitos, enzimas que participan en la síntesis y regeneración del GSH, enzimas que promueven la síntesis de equivalentes reductores, enzimas que inhiben la inflamación, proteínas que protegen contra la toxicidad por metales pesados, proteínas de reparación y remoción de proteínas

dañadas, proteínas que regulan la expresión de otros factores de transcripción y factores de crecimiento, entre otros (Baird y Dinkova, 2011).

Recientemente se ha reportado que algunos compuestos derivados del ajo como el DADS, el DATS y el DAS son capaces de activar el factor Nrf2 en hígado, riñón, intestino y pulmón (Chen et al., 2004; Fisher et al., 2007; Fukao et al., 2004; Gong et al., 2004; Guyonnet et al., 1999; Kalayarasan et al., 2009; Wu et al., 2002); sin embargo, no existe información de dicha inducción en el cerebro.

Debido a lo anterior, es posible que por las propiedades antes mencionadas, los compuestos derivados del ajo y en particular el DADS, puedan considerarse como una alternativa para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, ya que al ser lipofílicos pueden atravesar la barrera hematoencefálica después de su administración oral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México y el mundo, el aumento en la esperanza de vida ha traído como consecuencia una serie de padecimientos que afectan principalmente a la población que cuenta con 60 años y más. Enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson y el Huntington son un ejemplo de afecciones neurodegenerativas progresivas que han incrementado su prevalencia a lo largo de los años.

Por lo anterior, la ciencia se ha visto obligada a buscar alternativas para el tratamiento de los pacientes afectados. Es importante recalcar que no existe hasta ahora una cura para abordar dichas enfermedades, siendo el tratamiento de las mismas únicamente paliativo.

Dado que dichas enfermedades desafían la homeostasis de las células neuronales a través de las acciones nocivas de las ERO/ERN, la investigación actualmente está considerando a los antioxidantes, como una alternativa eficaz

para combatir el progreso de las enfermedades neurodegenerativas. Es por ello, que la experimentación con nuevos fármacos está justificada.

En este contexto, antioxidantes de origen natural como los derivados del ajo (y en particular el DADS) podrían contribuir principalmente a retrasar el progreso de la enfermedad y a disminuir el daño motor que se genera influyendo de manera positiva en la calidad de vida de los pacientes.

2.1 HIPÓTESIS.

Si el DADS (antioxidante organosulfurado del aceite de ajo) como agente preventivo logra inducir la sobreexpresión de enzimas antioxidantes que protejan contra la lesión ocasionada por el QUIN; entonces el deterioro celular y el déficit motor inducido por ésta toxina disminuirá.

3. OBJETIVO.

Evaluar el efecto del DADS sobre las alteraciones morfológicas, conductuales y bioquímicas que se inducen tras la administración intraestriatal de QUIN en la rata.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el esquema de administración y la dosis de DADS que ejerza el mayor efecto protector a nivel morfológico.
- Evaluar el efecto del DADS sobre el daño estriatal ocasionado por el QUIN.
- Evaluar el efecto del DADS sobre las alteraciones conductuales inducidas por el QUIN.
- Evaluar el efecto del DADS sobre el daño oxidante en el estriado, medido como el nivel de proteínas oxidadas.
- Evaluar el efecto del DADS sobre la expresión de las enzimas HO-1, GST, Mn SOD, Cu/Zn SOD, NQO1, TrxR en el estriado.
- Evaluar el efecto del DADS sobre la actividad de la GR, GST, GPX y CAT en el estriado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Reactivos.

El QUIN, se obtuvo de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). El DADS se obtuvo de LKT Laboratories, Inc (St. Paul, USA).

Los demás reactivos empleados en los diferentes ensayos fueron grado reactivo analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

4.2 Animales.

Se utilizaron Ratas macho Wistar con un peso de 280 a 300 g, criadas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo condiciones controladas de iluminación (ciclos de 12 h luz y oscuridad), temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 10\%$). Se les suministró alimento comercial para rata (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (4 ratas por caja). Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo bajo la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio. Durante todos los experimentos se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

4.3 Metodología.

4.3.1 Determinación de la dosis.

- A. En un primer esquema de administración, se evaluó el efecto del DADS (20, 40 y 60 mg/kg) durante 7 días iniciando 30 min antes del QUIN y sacrificando a los animales a los 7 días post lesión (Figura 12).

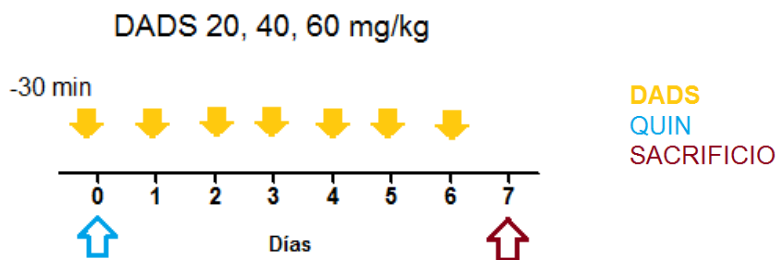


Figura 12. Esquema de administración A (Dosis múltiples).

- B. En un segundo esquema se evaluó el efecto de la administración de una sola dosis de DADS de 60 y 100 mg/kg, 30 min antes del QUIN sacrificando a los animales a los 7 días post lesión (Figura 13).

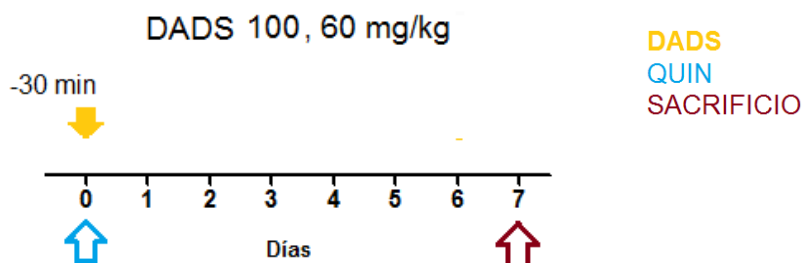


Figura 13. Esquema de administración B (Una sola dosis).

Debido a que el esquema que mostró mayor protección fue el B con la dosis de 100 mg/kg de DADS, ésta dosis fue la que se empleó en los ensayos siguientes.

Los animales se dividieron en 4 grupos (n=6/grupo) como se menciona a continuación:

- (1) Control (CT), administrados con 1 μ L de solución salina vía *i.e.* y 500 μ L de aceite vegetal via intragástrica (*i.g.*)
- (2) QUIN, administrados con 1 μ L de QUIN (240 nmol) vía *i.e.* y 500 μ L de aceite vegetal vía *i.g.*
- (3) DADS, administrados con 1 μ L de solución salina vía *i.e.* y DADS 100 mg/kg en 500 μ L de aceite vegetal via *i.g.*
- (4) QUIN+DADS, administrados con 1 μ L de QUIN (240 nmol) vía *i.e.* y DADS 100 mg/kg en 500 μ L de aceite vegetal via *i.g.*

Para la administración *i.e.* del QUIN y de la solución salina, se empleó un equipo estereotáxico (Stoelting) y una microjeringa Hamilton.

4.3.2 Administración intraestriatal del QUIN.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL/250 g, *i.p.*), se aplicó xilocaína en los oídos y se realizó la inyección intraestriatal en las siguientes coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y +4.5 mm ventral a la dura (Paxinos & Watson, 1984). Los animales se suturaron después de la operación y permanecieron en reposo a temperatura cálida hasta que pasó el efecto de la anestesia, posteriormente fueron colocados en cajas de acrílico. Se aplicó gentamicina vía subcutánea para evitar infección posterior a la cirugía.

4.3.3 Tratamiento del tejido para la obtención de los cortes histológicos

La ratas se sacrificaron a los 7 días después de que se realizó la inyección *i.e.* de QUIN, anestesiándolas con pentobarbital sódico y someténdolas a perfusión transcardiaca empleando solución salina con Heparina 1/500 (v/v), seguido de una solución de p-formaldehído 4% (v/v) (Rodríguez et al., 2000). Se extrajo el cerebro y se colocó durante 3 días en una solución de p-formaldehído 4% (v/v) con sacarosa 3% (v/v); posteriormente, los cerebros se protegieron en

cassettes de plástico y se deshidrataron gradualmente con soluciones de alcohol 70% al 100%, alcohol-xilol 1:1 y xilol 100%. Ya deshidratados los tejidos, éstos se colocaron en baños de parafina caliente a 60°C durante 2 h y se incluyeron en moldes de inclusión.

Empleando un microtomo, se obtuvieron cortes de 5 a 7 micras de espesor alrededor del área de la lesión. Los cortes se extendieron sobre un baño de agua tibia con grenetina, se montaron en portaobjetos y se dejaron secar 24 h a temperatura ambiente para su posterior tratamiento.

4.3.3.1 Efecto del DADS sobre el daño morfológico.

Los cortes histológicos obtenidos de las muestras del esquema A y B, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E), para la visualizar los cuerpos celulares (Silva-Adaya et al., 2008). Se obtuvieron imágenes con el objetivo de 40x del área de interés en la base del ventrículo derecho y a lo ancho del cuerpo estriado empleando el programa LEICA Qwin Color (Cambridge, UK). Se realizó un conteo celular considerando únicamente los núcleos picnóticos como signo de daño celular, comparando contra la cantidad de células estructuralmente íntegras por campo y eligiendo 5 campos al azar por rata.

4.4 Efecto del DADS sobre el daño conductual.

La asimetría motora se evaluó con el modelo del cilindro a los 0, 3 y 7 días post lesión como se describió previamente (Woodlee et al., 2005). La prueba se realizó por las noches a las 20:00 h en los días 0, 3 y 7 post lesión colocando a la rata dentro de un cilindro de acrílico de 20 cm de diámetro por 30 cm de alto durante un periodo de 5 min. Se registró el número de veces que la rata apoyó sus extremidades delanteras sobre la superficie del cilindro y se cuantificó el número de veces que usó la pata izquierda, la pata derecha y ambas patas.

Mediante una ecuación matemática se le asignó a la rata una puntuación en base a la conducta motriz dentro de una escala de 0 a 1, en la cual un valor de 0.5 indica la simetría motora característica de las ratas sanas, mientras que valores

superiores o inferiores a 0.5 reflejan asimetría motora consecuencia de la lesión producida por el QUIN a nivel del estriado. Con esta prueba se cuantificó indirectamente el grado de lesión ocasionado por la neurotoxina.

4.5 Efecto del DADS sobre el daño oxidante a proteínas.

Se cuantificó el nivel de proteínas oxidadas a las 3 h y a los 7 días post lesión mediante un ensayo espectrofotométrico que cuantifica el nivel de grupos carbonilo formados como producto del daño oxidante (Reznick y Packer, 1994). Se realizó un homogenado del estriado derecho, del que se tomaron alícuotas de 600 μ L y se les adicionó 200 μ L de estreptomycin 10%, para incubarlas 24 h a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 10 min, el sobrenadante se separó y se les adicionó 600 μ L de DNPH 10 mM, para incubarlas 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, agitando en vórtex cada 15 min. Se añadió a cada muestra 650 μ L de TCA 20% y se incubaron a 4°C durante 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras a 500 rpm a 4°C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 600 μ L de TCA 10%. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C durante 10 min, descartando el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con etanol/acetato de etilo (1:1 v/v) para remover la DNPH libre y los lípidos contaminantes, agitando en vórtex. Después de cada lavado se centrifugaron los tubos a 5000 rpm a 4°C durante 10 min. Después del último lavado se dejó evaporar el etanol/acetato de etilo y el botón se resuspendió en 1 mL de guanidina 6 M. Los tubos se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente. El contenido de grupos carbonilo se midió en un espectrofotómetro a 370 nm (a esta λ se detectan las hidrazonas que se forman tras la reacción de los grupos carbonilos con el DNPH). En el mismo tubo se registró la lectura a 280 nm para calcular la cantidad de proteína de cada muestra. Los datos se presentan como nmol de DNPH/mg de proteína.

4.6 Efecto del DADS y el QUIN sobre la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes.

4.6.1 Inmunohistoquímica.

En los cortes histológicos de 5 micras que fueron desparafinados e hidratados, se realizó la recuperación antigénica con una solución de citrato de sodio 3% y tritón 0.2% y se inhibió la actividad de las peroxidasas endógenas con H₂O₂ 1%. Se bloquearon los tejidos con una solución de albúmina 2% y se incubó con el anticuerpo primario anti HO-1 (1:150), anti GST (1:500), anti MnSOD (1:500), anti Cu/ZnSOD (1:500), anti NQO1 (1:200) y anti TrxR (1:50) durante toda la noche. Posteriormente, se utilizó un kit universal (anticuerpo secundario, peroxidasa), para finalmente revelar con diaminobencidina (DAB) y hematoxilina de Gill como solución de contraste.

Los resultados se expresan como la cantidad de células inmunorreactivas por campo. Sólo se presentan los resultados de la TrxR ya que no se observaron cambios con los demás anticuerpos.

4.6.2 Actividad enzimática.

A las 3 h y a los 7 días post lesión, se extrajo el estriado derecho para preparar un homogenado en 500 µL de amortiguador de lisis (Tris 10 mM, NaCl 15 mM, sacarosa 0.25 mM y tritón 1%) y 6 µL de una mezcla de inhibidor de proteasas. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 20 min.

Se evaluó para cada grupo, la actividad de la GST a las 3 h y a los 7 días post lesión con QUIN y la actividad de la CAT, la GR y la GPx a las 3 h post lesión.

4.6.2.1 Actividad de la GST.

Se realizó por el método de Habig et al. (1974) adicionando 80 µL de homogenado de estriado a 850 µL de una mezcla de reacción que contenía amortiguador de fosfatos 0.05 M pH=6.5, 20 µL de GSH 1 mM y 50 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1 mM. La mezcla se colocó en una celda de cuarzo y

se registró la densidad óptica a 340 nm durante 3 min a intervalos de 30 s. La actividad enzimática se calculó como el conjugado de nmol de CDNB formado/min/mg de proteína usando el coeficiente de extinción molar de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad de GST conjuga 1 μmol de CDNB con GSH por min a $\text{pH}=6.5$ y 25°C . Los resultados se presentan como U de GST/mg de proteína expresado en porcentaje con respecto al grupo control.

4.6.2.2 Actividad de la CAT.

Se empleó el método descrito por Aebi (1984), que se basa en la determinación de la constante de velocidad, k , para la descomposición de H_2O_2 . Se adicionaron 25 μL de homogenado de estriado a 725 μL de H_2O_2 30 mM y se colocaron en una celda de cuarzo para medir inmediatamente el cambio de densidad óptica a 240 nm durante 3 min a intervalos de 15 seg.

4.6.2.3 Actividad de la GR.

La tasa de oxidación del NADPH por el GSSG se emplea como medida estándar de la actividad enzimática de la GR (García et al., 1993). Se adicionaron 120 μL de homogenado de estriado a 880 μL de la mezcla de reacción que contenía EDTA 0.5 mM, GSSG 1.1 mM, NADPH 1 mM y amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.6. Se registró la densidad óptica a 340 nm durante 2 min a intervalos de 15 seg. La oxidación de 1 μmol de NADPH/min/mg de proteína se usa como unidad de actividad específica de la GR. Los resultados se expresan como U/mg de proteína.

4.6.2.4 Actividad de la GPx.

Se empleó el método descrito por Wendel (1980), que se basa en la oxidación del GSH a glutatión oxidado (GSSH) en una reacción que es mediada por el H_2O_2 . Se adicionaron 100 μL de homogenado de estriado a 800 μL de la mezcla de reacción que contenía EDTA 1 mM, GSH 1 mM, NADPH 0.2 mM, azida de sodio 1 mM, GSH reductasa 1U/mL y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. La reacción inició con la adición de 100 μL de H_2O_2 y se registró la densidad óptica a

340 nm durante 3 min a intervalos de 30 s. Los resultados se presentan como U/mg de proteína donde una unidad cataliza la oxidación de 1 μ mol de GSH a GSSH por min.

4.6.2.5 Determinación de proteínas totales.

Se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra a partir de una curva estándar con albúmina bovina, mediante el método de cuantificación de proteínas totales de Lowry (Lowry et al., 1951).

5. Análisis estadístico.

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos de histología, de proteínas oxidadas, de inmunohistoquímica y de actividad enzimática se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de una prueba múltiple de Tukey. Los datos de conducta se analizaron mediante ANOVA de dos vías. Todos los análisis se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de la dosis.

En la figura 13 se muestran las imágenes representativas para cada una de las diferentes dosis evaluadas y a los 7 días post lesión.

Los grupos CT y DADS no mostraron daño al neurópilo y el tejido es compacto y uniforme. Por otro lado, en el grupo tratado con QUIN, el neurópilo está dañado, se aprecia cariorrexis, edema y picnosis nuclear. El tratamiento con DADS protegió de forma dosis dependiente, siendo la dosis de 100 mg/kg la que mostró mayor protección ya que se redujo considerablemente el número de núcleos picnóticos y el daño al neurópilo (Figura 13).

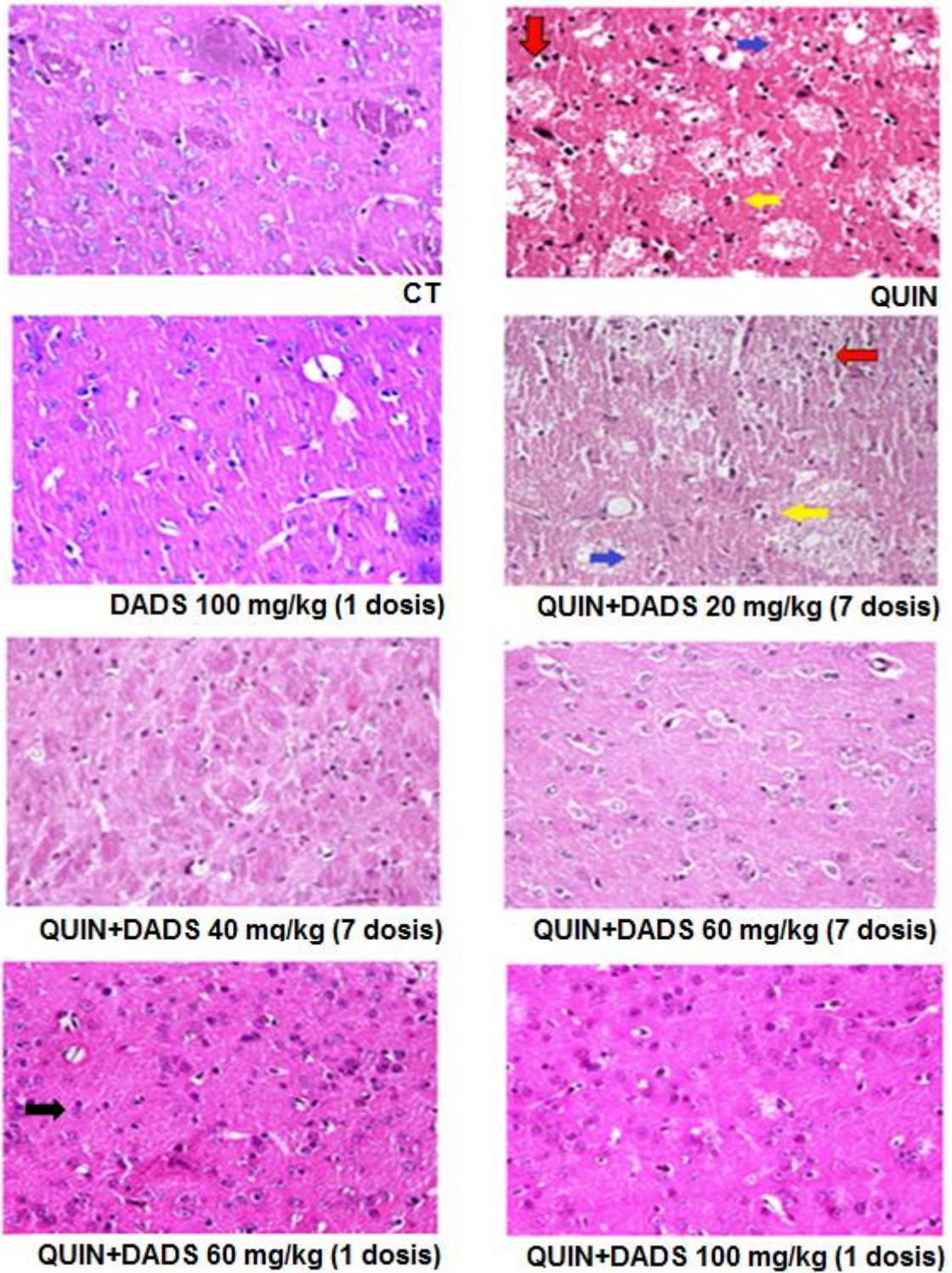


Figura 14. El dialildisulfuro (DADS) 20, 40, 60 y 100 mg/kg, *i.g.* (1 o 7 dosis) disminuye el daño histológico inducido por el ácido quinolínico (QUIN). Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Cortes de 5 μ m se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E). Se muestran imágenes representativas de cada grupo a los 7 días post-lesión. Se muestra daño al neurópilo (→), cariorrexis (→), edema (→) y picnosis nuclear (→). 40x.

A. Efecto de 7 dosis de DADS sobre del daño morfológico inducido por el QUIN.

A partir de los cortes histológicos se realizó el siguiente conteo celular. El grupo QUIN y DADS 20 mg/kg (7 dosis) + QUIN mostraron un daño celular elevado de alrededor del 95%, con respecto al grupo CT, mientras que las dosis de DADS de 40 y 60 mg/kg previnieron significativamente el daño ocasionado por el QUIN un 30.1% y 49.5%, respectivamente. La dosis de 60 mg/kg fue la que presentó la mayor protección (Figura 15).

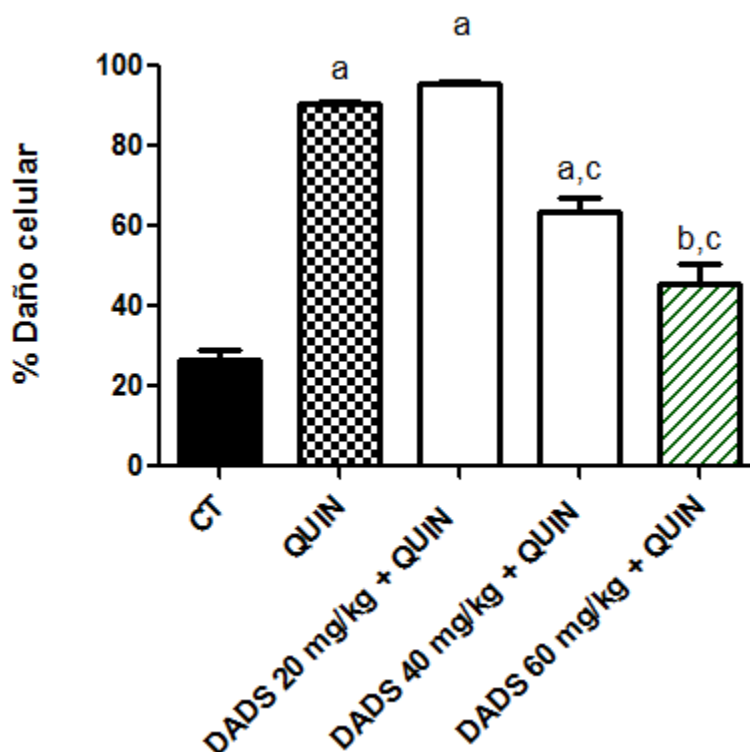


Figura 15. Siete dosis de dialildisulfuro (DADS) 20, 40 y 60 mg/kg, *i.g.* disminuyeron el daño celular inducido por el ácido quinolínico (QUIN) a los 7 días post lesión. Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Los valores se muestran como la media \pm EEM (n=6). ^aP<0.001 vs. CT; ^bP<0.05 vs. CT y ^cP<0.01 vs. QUIN.

B. Efecto de 1 dosis de DADS sobre del daño morfológico inducido por el QUIN.

El grupo QUIN presentó un daño celular de 91% en comparación con el grupo CT. Las dosis de 60 y 100 mg/kg mostraron una protección significativa ya

que el daño ocasionado por la toxina disminuyó un 50.8% y 73.2%, respectivamente (Figura 16).

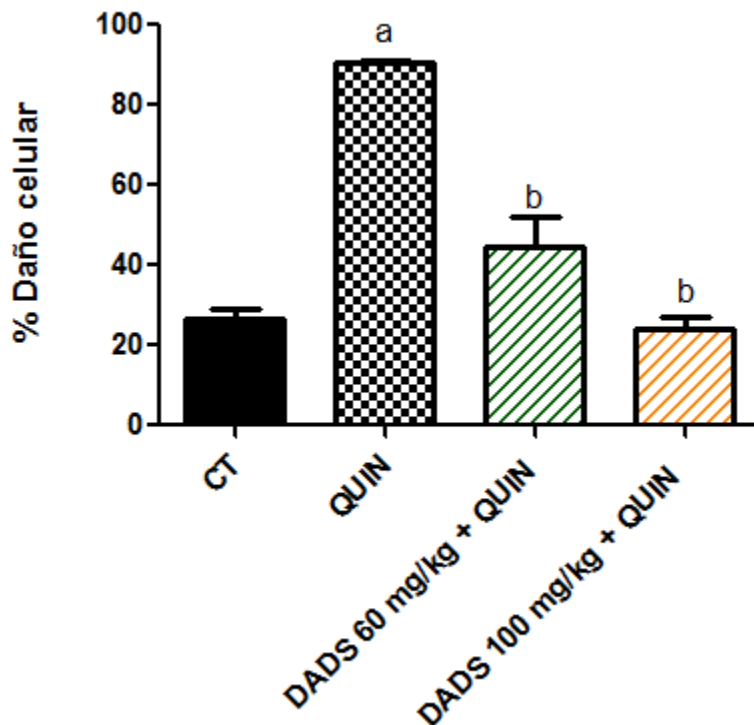


Figura 16. Una dosis de dialildisulfuro (DADS) 60 y 100 mg/kg, *i.g.* disminuyó la mortalidad celular inducida por el ácido quinolínico (QUIN) a los 7 días post lesión. Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Los valores se muestran como la media \pm EEM (n=6). ^aP<0.001 vs. CT y ^bP<0.001 vs. QUIN.

La administración de 7 dosis de DADS 60 mg/kg no mostró un efecto protector significativamente mayor al observado con 1 sola dosis de DADS a la misma dosis, sobre el daño morfológico inducido con el QUIN a los 7 días post lesión. El porcentaje de daño observado con dosis múltiples fue del 45.7% (Figura 14, Grupo DADS 60 mg/kg + QUIN), mientras que con una sola dosis se observó un daño del 44.6% (Figura 15, Grupo DADS 60 mg/kg + QUIN).

Debido a que la dosis única de DADS de 100 mg/kg fue la que mostró el mayor efecto protector (Figura 15), ésta dosis fue la que se eligió para realizar los

ensayos posteriores de conducta, proteínas oxidadas, inmunohistoquímica y actividad enzimática.

6.2 Efecto del DADS sobre el daño conductual medido como asimetría motora inducido por el QUIN.

La asimetría motora se evaluó mediante la asignación de un puntaje dentro de un intervalo de 0 a 1, asignando un valor de 0.5 a las ratas sanas, por lo que en el día 0 todos los grupos coinciden en dicho valor (Figura 16). El daño ocasionado por el QUIN aumentó desde los 2 días, observándose el mayor daño a los 6 días post lesión. El tratamiento con DADS previno significativamente (-13%) la asimetría motora inducida por el QUIN (Figura 17).

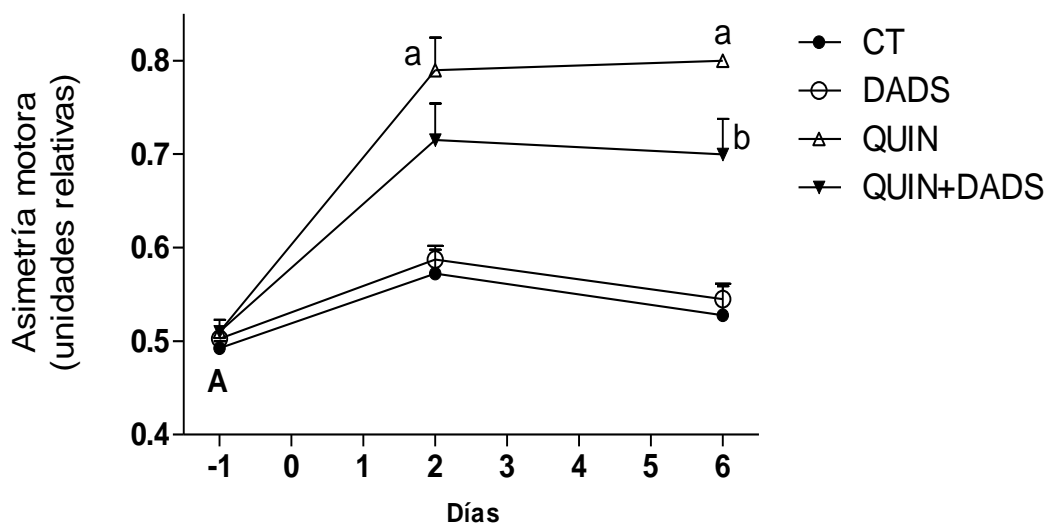


Figura 17. El dialildisulfuro (DADS) 100mg/kg disminuyó la asimetría motora inducida por el ácido quinilínico (QUIN) a los 6 días post lesión. Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Los valores se muestran como la media \pm EEM (n=4). ^aP<0.001 vs. CT en el día 2 y 6; ^bP< 0.05 vs. QUIN en el día 7.

6.3 Efecto del DADS sobre el daño oxidante a las proteínas inducido por el QUIN.

Se cuantificó el daño oxidante a las proteínas, mediante la determinación del contenido de grupos carbonilo en las proteínas a las 3 h (Figura 18 A) y a los 7 días (Figura 18 B) post lesión con el QUIN.

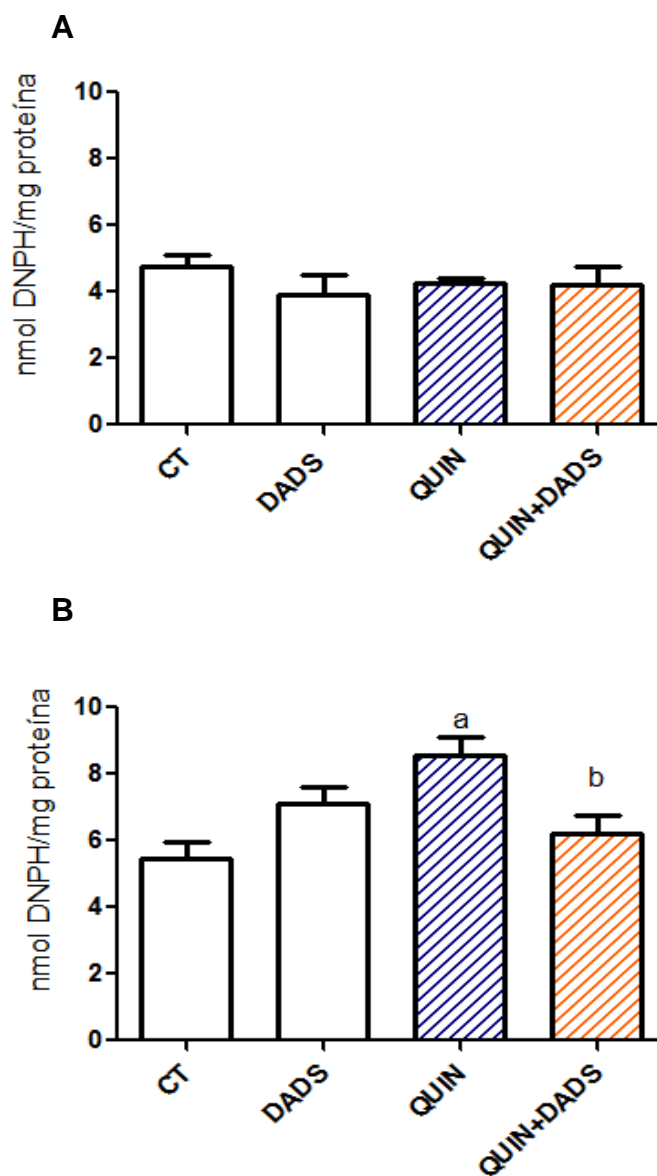


Figura 18. El dialildisulfuro (DADS) 100 mg/kg, *i.g.* disminuyó el daño oxidativo a las proteínas inducido por el ácido quinolínico (QUIN). Efecto a las 3 h (**A**) y a los 7 días (**B**) post-lesión. Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Se cuantificó el contenido de nmol de DNPH que reacciona con los grupos carbonilo formados en las proteínas. Los valores se muestran como la media \pm EEM (n=4). ^aP<0.01 vs. CT y ^bP< 0.05 vs. QUIN.

Tres horas después de la administración del QUIN no se observaron cambios en el nivel de grupos carbonilo en ninguno de los grupos evaluados (Figura 18 A), mientras que a los 7 días, en el grupo DADS se incrementó ligeramente el daño oxidante a las proteínas sin llegar a ser significativo. Por otro lado, el contenido de grupos carbonilo disminuyó significativamente en el grupo QUIN+DADS comparado con el grupo QUIN (Figura 18 B).

6.4 Efecto del DADS y del QUIN sobre la expresión de las enzimas antioxidantes.

Se realizó para cada grupo la detección inmunológica de las siguientes proteínas; HO-1, GST, MnSOD, Cu/ZnSOD, NQO1 y TrxR en el estriado de los animales. Solo se observaron células positivas contra la TrxR, que son los resultados que se muestran a continuación. En los grupos CT y DADS no se observaron células inmunorreactivas para la TrxR a las 3 h, mientras que en el grupo con QUIN se observaron varias células de color café (células positivas) por campo. Finalmente, en el grupo QUIN+DADS se observó un menor número de células positivas (2 células en promedio), comparado con el grupo QUIN.

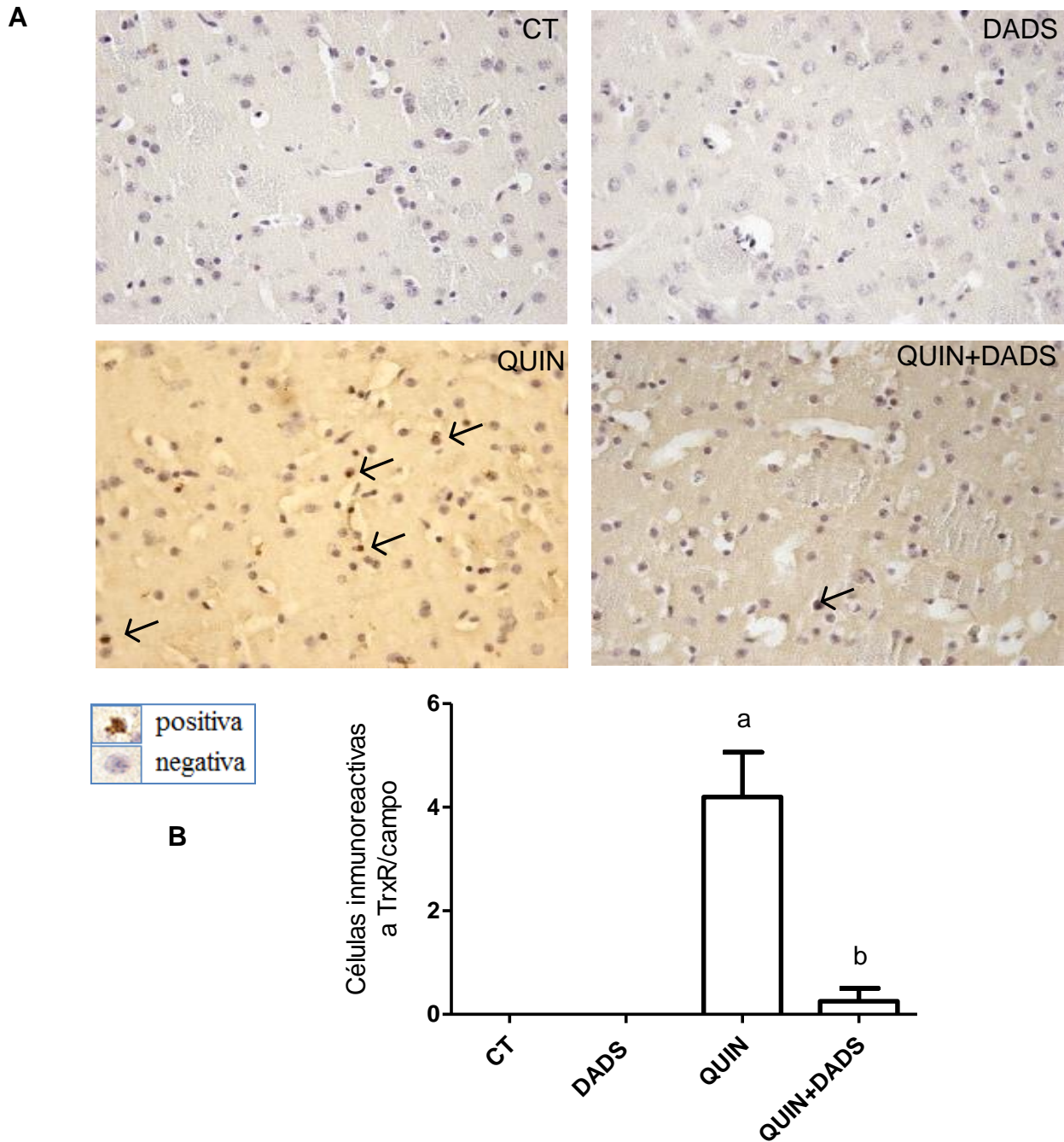


Figura 19. El ácido quinolínico (QUIN) induce la expresión de la tiorredoxina reductasa (TrxR). En (A) se muestran las imágenes representativas de cada grupo a las 3 h post-lesión. Se observan células inmunorreactivas (\rightarrow) en cortes de 5 micras contrastados con hematoxilina en el objetivo de 40x. En (B) se muestra el efecto del QUIN y el dialildisulfuro (DADS) 100 mg/kg, *i.g.* sobre el número de células inmunorreactivas a la TrxR por campo, cuantificadas en el estriado a las 3 h post lesión. Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Los valores se muestran como la media \pm EEM (n=4). ^aP<0.001 vs. CT y ^bP< 0.001 vs. QUIN.

En el análisis semicuantitativo se consideró el número de células inmunorreactivas por campo (Figura 19 B). El tratamiento con QUIN, incrementó significativamente la cantidad de células positivas por campo y la administración de DADS disminuyó este valor a niveles similares a los del CT.

6.5 Efecto del DADS y del QUIN sobre la actividad de la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST).

Se evaluó el efecto del QUIN y del DADS sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y GR en el estriado a las 3 h post-lesión. No se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos estudiados (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del ácido quinolínico (QUIN) y el dialildisulfuro (DADS) 100 mg/kg, *i.g.* sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en estriado a las 3 h post-lesión.

GRUPO	CAT (k/mg proteína)	GPx (mU/mg proteína)	GR (mU/mg proteína)
CT	0.0031 ± 0.0006	3.2 ± 0.6	3.9 ± 0.4
DADS	0.0039 ± 0.0002	2.8 ± 0.2	3.6 ± 0.6
QUIN	0.0033 ± 0.0011	4.4 ± 0.8	4.3 ± 0.7
QUIN+DADS	0.0044 ± 0.0009	4.0 ± 0.9	4.2 ± 0.3

Se administró 1 µL de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Los valores se muestran como la media ± EEM (n=4).

A las 3 h post lesión, solo se observaron cambios significativos en la actividad de la glutatión-S-transferasa (Figura 20). El tratamiento con QUIN disminuyó la actividad de la GST (22.5%) comparado con el grupo CT, mientras que en el grupo QUIN+DADS, la administración del DADS restableció completamente la disminución observada en el grupo QUIN. Finalmente, el tratamiento con DADS solo, incrementó la actividad de la GST un 10.5% comparada con el grupo CT.

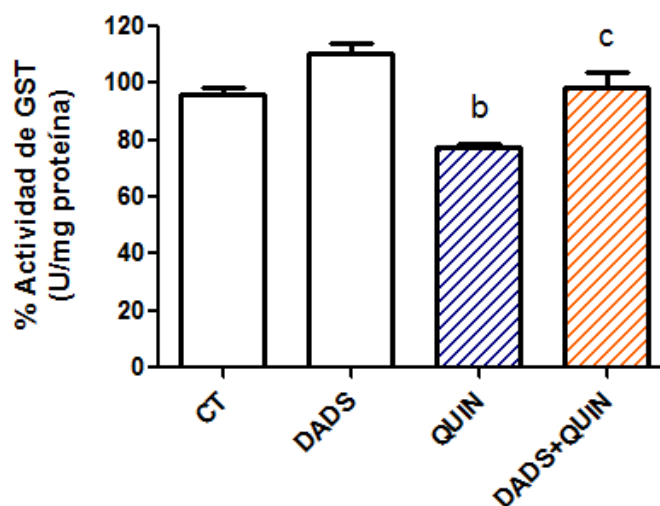


Figura 20. El dialildisulfuro (DADS) 100 mg/kg, i.g evitó la disminución de la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST) inducida por el ácido quinolínico (QUIN) a las 3 h post lesión. Se normalizaron los datos en función de la actividad de la GST en el grupo control (CT) considerada como el 100 %. Se administró 1 μ L de QUIN equivalente a 240 nmol *i.e.* Los valores se muestran como la media \pm EEM (n=6). ^aP>0.05 vs. CT, ^bP< 0.05 vs. CT y ^cP< 0.01 vs. QUIN.

7. DISCUSIÓN.

7.1 Determinación de la Dosis.

El DADS disminuyó el daño morfológico inducido por el QUIN de forma dosis dependiente, tanto cuando se administró de forma repetida o en dosis única (Figura 15 y 16). Sin embargo, la administración repetida de 60 mg/kg de DADS no mostró un efecto protector superior al observado con la administración única de la misma dosis. En este contexto podemos inferir que el mecanismo por el cual se lleva a cabo el efecto protector observado ocurre de manera preventiva y/o durante las primeras horas después de la lesión, ya que, las dosis consecutivas de DADS no ejercen un efecto terapéutico en días posteriores a la lesión. Un resultado similar fue observado con otro antioxidante; el gingenósido Rd (50 mg/kg), ya que su administración única disminuyó el área de infarto y las alteraciones conductuales motoras inducidas por la isquemia cerebral, mientras que la administración repetida de este compuesto (7 dosis de 50 mg/kg) no mejoró el efecto protector observado (Ye et al., 2011). Es pertinente considerar que la

depuración del DADS es rápida y podría no existir ventaja alguna al administrar consecutivamente el compuesto en dosis inferiores a 100mg/kg sin embargo, con base en lo reportado en la literatura, el esquema de administración consecutivo en dosis superiores a 200 mg/kg podría resultar tóxico (Fisher et al., 2007) y a pesar de que su depuración es rápida, no podríamos descartar por completo una eventual acumulación del compuesto. En estudios previos realizados en hepatocitos, se ha propuesto que la toxicidad asociada a los compuestos organosulfurados se debe a la formación de H_2S , cuando el GSH reacciona con el DADS afectando a la actividad de la citocromo c oxidasa e inhibiendo la respiración mitocondrial (Truong et al., 2009).

Nuestros resultados indicaron que la administración única de 100 mg/kg de DADS fue la dosis que mostró el mayor efecto protector sobre las alteraciones morfológicas inducidas por el QUIN en comparación con las dosis de 20, 40 y 60 mg/kg, y por esta razón dicha dosis se eligió para realizar los experimentos posteriores. Se ha reportado que el uso de una dosis de DADS de hasta 200 mg/kg por vía oral muestra un efecto tóxico al cuarto día consecutivo de administración (Fisher et al., 2007). Se sabe que una vez absorbida la dosis de 200 mg/kg, el DADS se metaboliza rápidamente, transformándose en alil mercaptano, alil metil sulfuro, alil metil sulfóxido (AMSO) y alil metil sulfona (AMSO₂), siendo éste último el más abundante de los metabolitos volátiles. Se ha propuesto que debido al metabolismo tan rápido del DADS es probable que sus metabolitos oxidados AMSO y AMSO₂ estén directamente involucrados en el efecto protector adjudicado a éste antioxidante (Germain et al., 2002). Debido a esto, los niveles de compuestos sulfurados disminuyen rápidamente durante la primera semana después de su administración y desaparecen durante la segunda semana, detectándose significativamente AMSO y AMSO₂ en la orina (Fisher et al., 2007). En este contexto, teóricamente la dosis única de 100 mg/kg de DADS garantiza la nula toxicidad del compuesto y como observamos, es suficiente para fungir como un agente preventivo del daño morfológico ocasionado por el QUIN.

7.2 El tratamiento con DADS previene el daño morfológico y conductual inducido por el QUIN.

La administración del QUIN propicia una cascada de eventos que culminan en la muerte celular, la inflamación mitocondrial, la dilatación del retículo endoplásmico, la vacuolización del citoplasma, la hinchazón celular y la lisis, (Syntichaki y Tavernarakis, 2003). En la figura 14 se puede apreciar un severo daño al neurópilo, y picnosis nuclear (caracterizada por la constricción nuclear y pérdida de la basofilia) causadas por el QUIN. Debido a que la picnosis nuclear es la alteración celular mejor definida en la tinción con H&E, únicamente se cuantificó el número de núcleos picnóticos por campo, como marcador de daño. La administración previa de DADS (100 mg/kg) previno el efecto tóxico inducido por la toxina, ya que en este grupo se observó una gran cantidad de células vivas, integridad del neurópilo y pocos núcleos picnóticos (Figura 14).

La inyección de QUIN en el estriado resulta principalmente en la pérdida de neuronas estriatales GABAérgicas, específicamente la excitotoxicidad induce la degeneración de neuronas espinosas medianas en el estriado a las 24 h post lesión (Beal et al., 1986; Jousselin-Hosaja et al., 2003). Estas neuronas expresan los receptores de dopamina D1 y D2 y ya se ha reportado que la lesión con QUIN disminuye progresivamente los niveles de los receptores D1 y D2 en el estriado (Araujo et al., 2000). Ya que las neuronas GABAérgicas estriatales, juegan un papel primordial en la modulación de la vía dopaminérgica nigroestriatal controlando la actividad motora (Ferre et al., 1997), la pérdida de este tipo de neuronas de manera unilateral, produce un desbalance entre los diferentes receptores dopaminérgicos resultando en la alteración motora del roedor (Schwarcz et al., 1979; Herrera-Marschitz et al., 2010).

Para evaluar la conducta motora, en este trabajo se empleó el modelo del cilindro ya que debido a su sencillez, es una alternativa eficaz que permite asignar una puntuación en el rango de 0 a 1 para detectar asimetría en la actividad motora. Los resultados muestran que en el grupo QUIN+DADS, el DADS disminuyó el desbalance motriz ocasionado por el QUIN (Figura 17). Es evidente

que una sola prueba conductual no es contundente; sin embargo, el ensayo es de suma importancia ya que alteraciones en la motricidad afectan sobremanera la vida cotidiana de los pacientes durante el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas y los tratamientos existentes demuestran su eficacia principalmente a nivel conductual, aminorando los movimientos involuntarios y mejorando el autoestima y la calidad de vida del paciente.

7.3 El tratamiento con DADS disminuye el daño oxidante a las proteínas inducido por el QUIN.

La importancia de la oxidación de las proteínas en la homeostasis celular deriva del hecho de que éstas moléculas regulan mecanismos vitales a niveles estructurales, de señalización y en procesos enzimáticos celulares. Existen diferentes maneras de inducir la oxidación de proteínas, como la oxidación catalizada por metales, la oxidación de los aminoácidos y la conjugación con productos de lipoperoxidación entre otras (Stadtman y Levine, 2010).

El producto mayoritario derivado de la oxidación de las proteínas es la producción de proteínas carboniladas, ya que el contenido de grupos carbonilos puede incrementar por reacciones secundarias con un subproducto de la peroxidación lipídica: el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Una de las consecuencias más relevantes de la presencia de grupos carbonilos es que pueden reaccionar posteriormente con los grupos alfa amino de residuos de lisina. Esta reacción conduce a la formación de entrecruzamientos intermoleculares promoviendo la formación de agregados protéicos (Stadtman y Berlett, 1997). En muchas enfermedades éstos agregados no pueden ser degradados por un mecanismo normal, lo que lleva a la inhibición de los procesos proteolíticos. Ésta falta de degradación induce a la acumulación de proteínas oxidadas agravando la disfunción celular (Stadtman y Levine, 2003).

Se sabe que la inyección intraestriatal de QUIN induce la oxidación de proteínas y se manifiesta en mayor grado a tiempos largos. El nivel máximo de proteínas oxidadas se ha observado a los 5 días post lesión con el QUIN, sin

embargo, a los 7 días aún se alcanza a ver un incremento significativo (Colin-Gonzalez et al., 2013). Resultados similares encontramos en este trabajo, ya que el QUIN indujo un incremento en el nivel de proteínas oxidadas a los 7 días, el cual se evitó con la administración del DADS (Figura 18 B). Otros estudios también han reportado una disminución del nivel de proteínas oxidadas en neuronas del hipocampo dañadas con el QUIN, usando agentes anti-inflamatorios como la tolmetina y el sulidac (Dairam et al., 2007). Estos resultados sugieren que el efecto protector inducido por el DADS sobre el daño morfológico y conductual podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes, como se ha reportado en otros modelos donde el estrés oxidante es un factor importante que participa en la muerte celular (García et al., 2008; Yi y Su, 2013; Huang et al., 2013; Chan et al., 2002).

7.4 Efecto del DADS y QUIN sobre la expresión de las enzimas antioxidantes.

La transcripción de algunos genes está mediada por el factor de transcripción Nrf2, un regulador maestro del estado redox celular, ya que regula la expresión de proteínas que juegan un papel central en la respuesta adaptativa al estrés oxidante. Estas proteínas incluyen a la (HO-1) (Alam et al., 1999), la NQO1 (Nioi et al., 2003), la GST (Itoh et al., 1997), la TrxR (Kim et al., 2001), entre otros. Se ha reportado que los compuestos organosulfurados tienen un papel como antioxidantes indirectos, activando al factor Nrf2 en células de hepatoma humano (Chen et al., 2004) y en hígado de rata (Fisher et al., 2007). Sin embargo, hasta el día de hoy no existen reportes del efecto del DADS sobre la activación del factor Nrf2 y la expresión de las enzimas de fase II en cerebro. A pesar de que en este trabajo no se encontraron cambios inducidos por el DADS sobre el nivel de las enzimas HO-1, GST, MnSOD, Cu/ZnSOD, NQO1 y Trx a las 3 h, no podemos asegurar que éstas no están participando en el efecto protector inducido por el DADS, ya que se ha observado que la expresión de las enzimas de fase II es regulada a diferentes tiempos. Chen et al. (2004) reportaron que el DADS induce la expresión de HO-1 y NQO-1 en células HepG2 de hepatoma humano 6 horas después de un tratamiento con DADS 100µM. Por otro lado, se ha reportado que

el DADS induce la expresión de GST predominantemente en el intestino y el estómago de ratones, particularmente mGSTM1 y mGSTM4 a las 48 horas después del tratamiento con dos dosis de 20 μ M de DADS (Andofer et al., 2004). Debido a lo anterior, es necesario realizar ensayos enfocados a detectar la activación de estas enzimas a tiempos cortos y largos, para evaluar su posible participación en este modelo.

En este trabajo se observó que la lesión con QUIN induce la sobreexpresión de la TrxR (Figura 19 A), posiblemente como una respuesta protectora ante la cascada de eventos tóxicos que se activan y que inician con la excitotoxicidad, ya que se sabe que la TrxR es la única enzima capaz de reducir a la Trx oxidada, la cual juega un papel importante en la reducción de disulfuros protéicos (Mustacich y Powis, 2000). Conjuntamente, la Trx reducida provee el poder reductor para 3 rutas principales: i) la conversión de H_2O_2 en H_2O por la Trx peroxidasa (Prx), ii) la reducción de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa para la síntesis de DNA y iii) la unión de factores de transcripción al DNA. Adicionalmente, la Trx incrementa el crecimiento celular e inhibe la apoptosis (Mustacich y Powis, 2000). Finalmente, se sabe que el sistema Trx/Prx es el sistema que más contribuye a la remoción de H_2O_2 en la mitocondria cerebral (Drechsel y Patel, 2010). Resultados similares ya habían sido observados por nuestro grupo cuando la administración de QUIN reveló una respuesta transitoria de expresión de la TrxR observándose el máximo a los 30 min y a la 2 h post-lesión y decaendo a las 24 h. Posiblemente ésta respuesta actúe como un mecanismo compensatorio ante el estrés oxidante que se genera con el QUIN (Maldonado et al., 2012). Otros grupos también han reportado el incremento en la expresión de la TrxR en cultivos celulares tratados con H_2O_2 (Nordberg y Arnér, 2001).

Por otro lado, el tratamiento con DADS disminuyó significativamente el número de células inmunoreactivas a la TrxR (grupo QUIN+DADS), posiblemente porque al administrarlo de forma previa, éste actúa como un agente antioxidante previniendo la formación de ERO y el estrés oxidante, protegiendo de esta forma a

la célula del reto tóxico que implica la administración del QUIN y evitando así la sobreexpresión innecesaria de la TrxR (Figura 19 B).

7.5 Efecto del DADS y QUIN sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.

Los sulfuros provenientes del aceite de ajo en especial el DADS han demostrado incrementar la actividad de las enzimas de fase II como: la GST, la quinona reductasa (QR) y la epóxido hidrolasa en animales tratados con sustancias cancerígenas (Guyonnet et al., 2001). Si el DADS o sus metabolitos pueden aminorar el efecto provocado por algunas sustancias cancerígenas es posible que también pueda disminuir el daño causado por el QUIN, ya sea como antioxidante directo, atrapando ERO o como antioxidante indirecto, activando al factor de transcripción Nrf2 e induciendo una respuesta antioxidante endógena.

De las enzimas evaluadas la GPx, la GR, la CAT, la SOD y la GST, únicamente se encontraron cambios significativos en la actividad de la GST (Figura 20). El tratamiento con DADS incrementó la actividad de la GST a las 3 h comparado con el grupo CT. Por otro lado, la administración de DADS evitó la disminución de la actividad de la GST inducida por el QUIN, restableciendo la actividad de la misma a niveles basales, contrarrestando de ésta manera el efecto tóxico observado en el grupo QUIN. Resultados similares fueron reportados por Cruz-Aguado et al. (1999), quienes encontraron un aumento en la actividad de GST, 6 semanas después de administrar 225 nmol de QUIN. Estos resultados en conjunto, sugieren que el efecto protector inducido por el DADS podría estar asociado, además de sus propiedades de antioxidante directo (ya que disminuyó el nivel de proteínas oxidadas), con sus propiedades como antioxidante indirecto en un mecanismo mediado por la sobreactivación de la GST.

Considerando nuestros resultados y los reportados por Cruz-Aguado et al. (1999), proponemos que sería adecuado realizar un seguimiento de la actividad de la GST y otras enzimas de fase II en un curso temporal (evaluando tiempos cortos y largos), ya que mientras el daño celular inducido por el QUIN comienza en las primeras horas, la respuesta requerida para contrarrestar dicho daño podría ser tanto inmediata como tardía.

Finalmente, múltiples ensayos han reportado que el tratamiento con diferentes agentes de tipo antioxidante; como el selenio (Maldonado et al., 2012), la curcumina (Carmona-Ramirez et al., 2013), la S- alilcisteína (Pérez-Severiano et al., 2004), agentes antiinflamatorios; como el ácido caféico, el rofecoxib (Kalaria et al., 2009) y la nimesulida (Kalaria et al., 2010)^a, bloqueadores de canales de calcio; como el verapamil y el diltiazem (Kalaria et al., 2010)^b, entre otros, contrarrestan los efectos tóxicos ocasionados por el QUIN en roedores, algunos de los cuales hacen énfasis en la posible participación del factor de transcripción Nrf2 como inductor de una respuesta antioxidante endógena que genere dicho estado de protección. En este contexto, es probable que el DADS también se encuentre implicado en dicho mecanismo de protección, sin embargo se requieren de estudios posteriores para determinarlo.

8. CONCLUSIÓN.

El DADS (100 mg/kg) disminuyó las alteraciones morfológicas y conductuales inducidas por el QUIN. Dicho efecto protector podría estar asociado con sus propiedades de antioxidante directo (ya que disminuyó el nivel de proteínas oxidadas) e indirecto (ya que aumentó la actividad de la GST).

9. PERSPECTIVAS.

- Evaluar el papel del DADS sobre la activación del factor Nrf2 en estriado.
- Establecer un curso temporal que permita detectar cambios en la expresión y en la actividad de las enzimas de fase II SOD, CAT, γ -GCL, HO-1, NQO1.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6.
- Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AMK, Cook JL. 1999. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase 1 gene. *J Biol Chem*. 274:26071-78.
- Andorfer JH, Tchaikovskaya T, Listowsky I. 2004. Selective expression of glutathione S-transferase genes in the murine gastrointestinal tract in response to dietary organosulfur compounds. *Carcinogenesis* 25:359-67.
- Araujo DM, Cherry SR, Tatsukawa HJ, Toyokuni T, Kornblum HI. 2000. Deficits in striatal dopamine D (2) receptors and energy metabolism detected by in vivo micro PET imaging in a rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 166:287-97.
- Baird L, Dinkova-Kostova AT. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85:241-72.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-71.
- Beal MF. 1994. Huntington's disease, energy, and excitotoxicity. *Neurobiol Aging* 15:275-6.
- Benzi G, Moretti A. 1995. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16:661-74.
- Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecińska M. 1997. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69:1629-39.

- Carmona-Ramírez I, Santamaría A, Tobón-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, González-Herrera IG, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD. 2013. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem* 24:14-24.
- Chang HP, Chen YH. 2005. Differential effects of organosulfur compounds from garlic oil on nitric oxide and prostaglandin E2 in stimulated macrophages. *Nutrition* 21:530-6.
- Chan KC, Hsu CC, Yin MC. 2002. Protective effect of three diallyl sulphides against glucose-induced erythrocyte and platelet oxidation, and ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 108:317-22.
- Chatterji T, Keerthi K, Gates KS. 2005. Generation of reactive oxygen species by a persulfide (BnSSH). *Bioorg Med Chem Lett* 15:3921-24.
- 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 signals. *Free Radic Biol Med* 37:1578-90.
- Colín-González AL, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas ME, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Barrera-Oviedo D, Maldonado PD. 2013. Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative damage induced in an excitotoxic/pro-oxidant model in the rat striatum. *Neuroscience* 231:91-101.
- Cruz-Aguado R, Francis-Turner L, Dóñez-Suarez CM, Bergado J. 1999. NGF prevents changes in rat brain glutathione-related enzymes following transection of the septohippocampal pathway. *Neurochem Int* 34:125-30.
- Dairam A, Müller AC, Daya S. 2007. Non-steroidal anti-inflammatory agents, tolmetin and sulindac attenuate quinolinic acid (QA)-induced oxidative stress

in primary hippocampal neurons and reduce QA-induced spatial reference memory deficits in male Wistar rats. *Life Sci.* 80:1431-8.

Danysz W, Parsons CG. 2003. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 18(Suppl 1):S23-32.

Day Brian J. 2009. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol.* 77: 285–96.

Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Wade KL, Jenkins SN, Shapiro TA, Fuchs EJ, Kerns ML, Talalay P. 2007. Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:847-51.

Drechsel DA, Patel M. 2010. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *J Biol Chem* 285:27850-8.

Fan MM, Raymond LA. 2007. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81:272-93.

Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF. 1993. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 119:46-71.

Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. 1997. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-7.

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* 35:995-1000.

- Flynn JM, Melov S. 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* pii: S0891-5849(13)00237-2. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027.
- Friedman LK. 2006. Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Mol Interv* 6: 315–29.
- 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* 42:743-9.
- Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. 1991. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56:2007-17.
- Furtado JC, Mazurek MF. 1996. Behavioral characterization of quinolinate induced lesions of medial striatum: relevance for Huntingtons disease. *Exp Neurol* 138:158-68.
- Gál EM, Sherman AD. 1980. L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Nurochem Res* 5:223-39.
- Ghaffari S. 2008. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis . *Antioxid Redox Signal* 10: 1923–1940.
- García A, Haza AI, Arranz N, Delgado ME, Rafter J, Morales P. 2008. Organosulfur compounds alone or in combination with vitamin C protect towards N-nitrosopiperidine- and N-nitrosodibutylamine-induced oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 173:9-18.

- García-Alfonso C, Martínez-Galisteo E, Llobell A, Bárcena JA, López-Barea J. 1993. Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization. *Int J Biochem* 25:61-8.
- Germain E, Auger C, Ginies C, Siess M-H, Teyssier C. 2002. In vivo metabolism of diallyl disulphide in the rat: identification of two new metabolites. *Xenobiotica*. 32:1127-38
- Gong P, Hu B, Cederbaum AI. 2004. Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys* 432:252-60.
- Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH, Le Bon AM. 2001. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from Allium is associated with phase II enzyme induction. *Mutat Res* 495:135-45.
- Guyonnet D, Siess MH, Le Bon AM, Suschetet M. 1999. Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 154:50-8.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-9.
- Hague SM, Klaffke S, Bandmann O. 2005. Neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1058-63.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.
- Herrera-Marschitz M, Arbuthnott G, Ungerstedt U. 2010. The rotational model and microdialysis: Significance for dopamine signalling, clinical studies, and beyond. *Prog Neurobiol* 90:176-89.

- Hong F, Sekhar KR, Freeman ML, Liebler DC. 2005. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem* 280:31768-75.
- Huang YT, Yao CH, Way CL, Lee KW, Tsai CY, Ou HC, Kuo WW. 2013. Diallyl trisulfide and diallyl disulfide ameliorate cardiac dysfunction by suppressing apoptotic and enhancing survival pathways in experimental diabetic rats. *J Appl Physiol* 114:402-10.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236:313–22.
- Jaiswal AK. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36: 1119-1207.
- Jellinger KA. 2003. General aspects of neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* 65:101-44.
- Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mielal JJ. 2012. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 4:1399-440
- Jousselin-Hosaja M, Tobin C, Venault P, Joubert C, Chapouthier G. 2003. Effects of adrenal medulla graft on recovery of GABAergic and dopaminergic neuron deficits in mice: behavioural, pharmacological and immunohistochemical study. *Behav Brain Res* 140:185-93.

Kalayarasan S, Prabhu PN, Sriram N, Manikandan R, Arumugam M, Sudhandiran G. 2009. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in wistar rats. *Eur J Pharmacol* 606:162-71.

Kalonia H, Kumar P, Kumar A, Nehru B. 2009. Effect of caffeic acid and rofecoxib and their combination against intrastriatal quinolinic acid induced oxidative damage, mitochondrial and histological alterations in rats. *Inflammopharmacology* 17:211-9.

^aKalonia H, Kumar P, Kumar A, Nehru B. 2010. Protective effect of rofecoxib and nimesulide against intra-striatal quinolinic acid-induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rats. *Neurotoxicology* 31:195-203.

^bKalonia H, Kumar P, Kumar A. 2010. Attenuation of proinflammatory cytokines and apoptotic process by verapamil and diltiazem against quinolinic acid induced Huntington like alterations in rats. *Brain Res* 1372:115-26.

Kemp JA, McKernan RM. 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-42.

Kim YC, Masutani H, Yamaguchi Y, Itoh K, Yamamoto M, Yodoi J. 2001. Hemin induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J Biol Chem* 276:18399-406.

Konigsberg M. 2008. Química de los radicales libres. En *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. El manual moderno*. pp 3-21.

Kobayashi M, Yamamoto M. 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46:113-40.

- Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH. 2002. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 63:41-7.
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A* 1112:3–22.
- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 278:12029-38.
- Li W, Yu SW, Kong AN. 2006. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem* 281:27251-63.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
- Maher P. 2005. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* 4:288–314.
- Maldonado PD, Pérez-De La Cruz V, Torres-Ramos M, Silva-Islas C, Lecona-Vargas R, Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Vázquez-Cervantes GI, Fortoul TI, Ali SF, Santamaría A. 2012. Selenium-induced antioxidant protection recruits modulation of thioredoxin reductase during excitotoxic/pro-oxidant events in the rat striatum. *Neurochem Int* 61:195-206.
- Iciek MB, Kowalczyk-Pachel D, Kwiecien I, Dudek MB. 2012. Effects of different garlic-derived allyl sulfides on peroxidative processes and anaerobic sulfur metabolism in mouse liver. *Phytoter Res* 26:425-31.
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17:251-7.

- Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA, Elías-Viñas D, Verdugo-Díaz L. 2010. Effects of acute electromagnetic field exposure and movement restraint on antioxidant system in liver, heart, kidney and plasma of Wistar rats: a preliminary report. *Int J Radiat Biol* 86:1088-94.
- Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. 2011. El glutati6n y su asociaci6n con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *REB* 30: 56-67.
- Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 64:2262-72.
- Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintowsky VL. 1993. Neurotrophic factor mediated protection from excitotoxicity and disturbances in calcium and free radical metabolism. *Seminars in Neuroscience; Neurotrophic Factors and the Mature Brain* 5:295-307.
- May O. 2013. Nrf2 Antioxidant Stress Response: Managing its 'Dark Side'.
Imagen disponible en web:
<https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2168/figure/1>
- Mustacich D, Powis G. 2000. Review article thioredoxin reductase. *Biochem J* 346:1-8.
- Müller AC, Dairam A, Limson JL, Daya S. 2007. Mechanisms by which acyclovir reduces the oxidative neurotoxicity and biosynthesis of quinolinic acid. *Life Sci* 80:918-25.
- Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. 2001. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 22:891-7.

- Ndountse LT, Chan HM. 2009. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol Lett* 184:50–5.
- Nicholls DG. 2004. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med* 4:149–77.
- Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene: Reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 374:337–48.
- Njalsson, R., 2005. Glutathione synthetase deficiency. *Cell Mol Life Sci* 62:1938–45.
- Nordberg J, Arnér ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med* 31:1287-312.
- Norman AB, Giordano M, Sandberg PR. 1989. Fetal striatal tissue graft into excitotoxin-lesioned striatum: pharmacological and behavioral aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 34:139-47.
- Ohaeri OC, Adoga GI. 2006. Anticoagulant modulation of blood cells and platelet reactivity by garlic oil in experimental diabetes mellitus. *Biosci Rep* 26:1–6.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998 Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates* 4th edition. London, UK, Academic Press.

- Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortíz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A. 2004. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45:1175-83.
- Rami A, Ferger D, Krieglstein J. 1997. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res* 27:93-7.
- Reynolds NC, Lin W, Meyer Cameron C, Roerig DL. 1997. Differential responses of extracellular GABA to intrastriatal perfusions of 3-nitropropionic acid and quinolinic acid in the rat. *Brain Res* 778:140-9.
- Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-63.
- Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436-9.
- Rothstein JD. 1996. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47 (4 Suppl 2):S19–25.
- Sakamoto K, Lawson LD, Milner JA. 1997. Allyl sulfides from garlic suppress the in vitro proliferation of human A549 lung tumor cells. *Nutr Cancer* 29:152-6.
- Sanberg PR, Calderon SF, Giordano M, Tew JM, Norman AB. 1989. The quinolinic acid model of Huntington's disease: locomotor abnormalities. *Exp Neurol* 105:45-53.
- Santiago-López D, Vázquez-Román B, Pérez-de La Cruz V, Barrera D, Rembao D, Salinas-Lara C, Pedraza-Chaverrí J, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54:233-8.

- Schwarcz R, Fuxe K, Agnati LF, Hökfelt T, Coyle JT. 1979. Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* 170:485-95.
- Siddique YH, Afzal M. 2004. Antigenotoxic effect of allicin against SCEs induced by methylmethanesulphonate in cultured mammalian cells. *Indian J Exp Biol* 42:437-38.
- Siegel D, Yan C, Ross D. 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol* 83:1033-40.
- Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem* 105:677-89.
- Sims NR, Zaidan E. 1995. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int J Biochem Cell Biol* 27:531-50.
- Sims NR, Nilsson M, Muyderman H. 2004. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr* 36:329-33.
- Srivatsava SK, Hu X, Xia H, Zaren HA, Chatterjee ML, Agarwal R, Singh SV. 1997. Mechanisms of differential efficacy of garlic organosulfides in preventing benzo(a)pyrene-induced cancer in mice. *Cancer Lett* 118:61-7.
- Stadtman ER, Levine RL. 2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899:191-208.
- Stadtman ER, Berlett BS. 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10:485-94.

- Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–18.
- Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. 1994. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 139:1–15.
- Sundaram SG, Milner JA. 1996. Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *J Nutr* 126:1355-61.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. 2003. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4:672-84.
- Truong D, Hindmarsh W, O'Brien PJ. 2009. The molecular mechanisms of diallyl disulfide and diallyl sulfide induced hepatocyte cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 180:79-88.
- Vazquez S, Garner B, Sheil MM, Truscott RJ. 2000. Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. *Free Radic Res* 32:11-23.
- Vender AD. 1975. En: *Aminoacid metabolism*. John Wiley and Sons. Wiley, USA, pp 172–177.
- Vezzani A, Sangalli L, Wu HQ, Schwarcz R. 1987. ATP as a marker of excitotoxin-induced nerve cell death in vivo. *J Neural Transm* 70:349-56.
- Wang HG, Pathan N, Ethel I IM, Kjrjewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. 1999. Ca^{2+} induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:339–43.
- Wang KK. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23: 20–6.

Wendel A. 1980. Glutathione peroxide. En: Enzymatic Basis of Detoxification. Jakoby, WB., ed. Academic Press, NY Volume 1, pp. 333-54,

Woodlee MT, Asseo-García AM, Zhao X, Liu SJ, Jones TA, Schallert T. 2005. Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion - dependent patterns of recovery in rats. *Exp Neurol* 191:310-7.

Wu CC, Chung JG, Tsai SJ, Yang JH, Sheen LY. 2004. Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food Chem Toxicol* 42:1937-47.

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* 50:378-83.

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* 178:169-80.

Yi L, Su Q. 2013. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food Chem Toxicol* 57:362-70.

Disponible en WEB

<SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de la Salud Mental en México 2012>

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2012/Epibreve7_Alzheimer.pdf>

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2012/Monografias8_Salud_Mental_Mex_ago12.pdf>

<<http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/huntington.html>>