



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SUBCRÓNICA DE LA
S-ALILCISTEÍNA EN *Rattus norvegicus* WISTAR MACHO:
REPORTE DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y
MORFOLÓGICOS.**

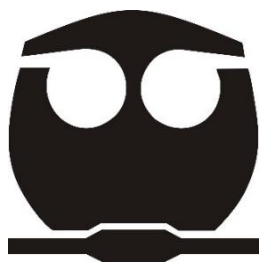
T E S I S M A N C O M U N A D A

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

PRESENTAN:

SANDRA MONSERRAT BAUTISTA PÉREZ

LAURA PATRICIA GARZA MONTOYA



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

- PRESIDENTE:** Profesor: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
- VOCAL:** Profesor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
- SECRETARIO:** Profesor: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
- 1ER. SUPLENTE:** Profesor: DR. EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ
- 2DO. SUPLENTE:** Profesor: DRA. LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ESTE PROYECTO FUE APOYADO POR EL PROYECTO ICYTDF/299/2012

SE AGRADECE A LA COMISIÓN COORDINADORA DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD Y HOSPITALES DE ALTA ESPECIALIDAD POR LA BECA PROBEI (PROGRAMA DE BECAS DE INICIO A LA INVESTIGACIÓN) OTORGADA A LA ALUMNA LAURA PATRICIA GARZA MONTOYA DURANTE EL PERIODO DE OCTUBRE DE 2013 A ABRIL DEL 2015.

SE AGRADECE AL **ICYTDF/229/2012** POR LA BECA OTORGADA A LA ALUMNA SANDRA MONSERRAT BAUTISTA PÉREZ DURANTE EL PERIODO DE SEPTIEMBRE DE 2013 A AGOSTO DEL 2014.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SUSTENTANTES:

Sandra Monserrat Bautista Pérez

Laura Patricia Garza Montoy

A NUESTRAS FAMILIAS

ÍNDICE GENERAL

I.	ABREVIATURAS.....	1
II.	RESUMEN.....	2
III.	ANTECEDENTES.....	4
	1. O ₂ y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	4
	2. Fuentes biológicas.....	6
	3. Funciones fisiológicas.....	8
	4. Estrés oxidante.....	10
	5. Antioxidantes.....	10
	5.1 El ajo como fuente de antioxidantes.....	12
	5.1.1 S-alilcisteína.....	12
	5.1.1.1 Importancia biológica.....	13
	5.1.1.2 Farmacocinética.....	19
	5.1.1.3 Distribución en tejidos.....	20
	5.1.1.4 Toxicidad.....	23
	6. Desarrollo de nuevos fármacos.....	24
	7. Estudios de toxicidad.....	25
IV.	INTRODUCCIÓN.....	29
V.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	30
VI.	HIPÓTESIS.....	31
VII.	OBJETIVOS.....	32
	1. Objetivo general.....	32
	2. Objetivos particulares.....	32
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
	1. Reactivos.....	33
	2. Síntesis de la SAC.....	33
	3. Animales.....	34
	4. Esquema de administración de la SAC.....	34
	5. Muestras.....	35
	5.1 Orina.....	35
	5.2 Plasma.....	35
	5.3 Órganos.....	35
	5.4 Citometría hemática.....	36
	6. Marcadores bioquímicos de daño renal.....	39
	6.1 Nitrógeno de urea (BUN).....	39
	6.2 Creatinina en plasma.....	40
	6.3 Proteínas urinarias.....	41
	7. Marcadores bioquímicos de daño hepático.....	41
	7.1 Triglicéridos en plasma.....	41
	7.2 Colesterol en plasma.....	42
	7.3 Transaminasas.....	43
	7.3.1 Aspartato aminotransferasa (AST).....	43
	7.3.2 Alanina aminotransferasa (ALT).....	44
	7.3.3 Fosfatasa alcalina (ALP).....	45
	8. Marcadores bioquímicos de daño pancreático.....	46

8.1 Glucosa.....	46
9. Análisis histológico.....	46
10. Análisis estadístico.....	48
IX. RESULTADOS.....	49
1. Peso corporal.....	49
2. Citometría hemática.....	50
3. Marcadores bioquímicos de daño renal.....	51
3.1 Nitrógeno de urea (BUN).....	51
3.2 Creatinina en plasma.....	52
3.3 Proteínas urinarias.....	53
4. Marcadores bioquímicos de daño hepático.....	54
4.1 Triglicéridos y colesterol en plasma.....	54
4.2 Transaminasas y fosfatasa alcalina.....	55
5. Marcadores bioquímicos de daño pancreático.....	56
5.1 Glucosa en plasma.....	56
6. Análisis histológico.....	57
6.1 Riñón.....	57
6.2 Hígado.....	58
6.3 Páncreas.....	60
6.4 Bazo.....	61
6.5 Pulmón.....	62
6.6 Corazón.....	64
6.7 Cerebro.....	65
X. DISCUSIÓN.....	66
XI. CONCLUSIÓN.....	69
XII. REFERENCIAS.....	70



I. ABREVIATURAS

CAT	Catalasa
DL₅₀	Dosis letal 50
EAE	Extracto de ajo envejecido
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
HE	Hematoxilina y eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
<i>i.g.</i>	Intragástrica
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<i>i.v.</i>	Intravenosa
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
ON	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
O₂^{·-}	Anión superóxido
OH[·]	Radical hidroxilo
ONOO[·]	Peroxinitrito
PAF	Paraformaldehdo
ROO[·]	Radical peroxilo
SAC	S-alilcisteína
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
TCA	Tricloroacético
XO	Xantina oxidasa



II. RESUMEN

La S-alilcisteína (SAC) es un compuesto sulfurado, hidrosoluble y estable que está presente en pequeñas proporciones en el ajo (30 µg/g de peso fresco), y es el componente principal del extracto de ajo envejecido (0.62 mg/g de extracto). Se forma del catabolismo de la γ -glutamil-S-alilcisteína mediante la enzima γ -glutamyltransferasa. Su obtención también se lleva a cabo mediante síntesis orgánica, a partir de clorhidrato de L-alilcisteína y bromuro de alilo, evitando el tiempo de extracción y obteniendo cantidades mayores a las obtenidas de sus fuentes naturales, donde su distribución es baja.

Al administrarse de manera oral se absorbe en el tracto intestinal y se distribuye principalmente en el plasma, el hígado y el riñón. La dosis letal de la SAC por vía oral en ratas macho es de 10.9 g/Kg y en ratas hembra es de 9.5 g/Kg. Al administrarse por vía oral en ratas, la SAC es excretada en orina y bilis. En orina es excretada como su forma no transformada (1.6%) y casi en su totalidad como metabolitos N-acetilados como NAc-SAC (N-acetil-S-alil-L-cisteína) en un 83% y NAc-SACS (N-acetil-S-alil-L-cisteína sulfóxido) en un 11% y como SACS (S-allil-L-cisteína sulfóxido) en un 0.01%, mientras que en bilis apenas se excreta como su forma no transformada (0.45%), NAc-SAC en un 0.77% y NAc-SACS en un 0.05%.

Se considera un compuesto biológicamente activo pues se ha demostrado que tiene propiedades antioxidantes en diferentes modelos de enfermedad en los que el estrés oxidativo juega un papel importante en el mecanismo de inducción de daño ya que ejerce un efecto protector cuando se administra como pretratamiento.

Su baja toxicidad, alta distribución en tejidos y su gran capacidad como antioxidante lo hacen un buen candidato para su uso terapéutico; sin embargo, solo se cuenta con un estudio de toxicidad subaguda (1 mes), a diferentes dosis de SAC (250 a 2000 mg/Kg de peso, administradas por vía oral). En dicho trabajo, los efectos tóxicos que se observaron con dosis \geq 500 mg/kg fueron: 1) disminución del peso corporal en hembras y machos; 2) incremento del pH urinario en machos; 3) disminución del nivel de proteínas en orina (en hembras) y urobilinógeno (en



machos); 4) incremento del nivel de glucosa en suero en hembras, sugiriendo que la SAC podría inducir atrofia del páncreas (la atrofia del tejido pancreático sólo se ha observado en hembras administradas con altas dosis de SAC); 5) alteración de la función renal (disminución de los niveles de nitrógeno de urea y creatinina en suero) y hepática (incremento del nivel de colesterol total, proteínas, lípidos y fosfatasa alcalina) en hembras; 6) disminución del hematocrito, la hemoglobina, el volumen corpuscular medio, la hemoglobina corpuscular media y la concentración media de hemoglobina corpuscular en hembras y machos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar cambios en marcadores bioquímicos de daño y daño morfológico en diferentes tejidos (hígado, riñón, páncreas, pulmón, cerebro, corazón y bazo), después de la administración subcrónica (3 meses) de la SAC (25, 50, 100 y 200 mg/Kg) por vía oral en ratas macho de la cepa Wistar.

No se observaron cambios en la serie roja (glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración media de hemoglobina corpuscular), plaquetas y la serie blanca (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos). Los marcadores de daño renal (nitrógeno de urea en la sangre y creatinina) no presentaron cambios con respecto al grupo control, el grupo administrado con 200 mg/Kg de SAC mostraron una disminución en el nivel de proteínas excretadas en orina durante 24 h. Los marcadores de daño hepático, los niveles de triglicéridos, el colesterol en plasma y la fosfatasa alcalina no presentaron cambios. La evaluación de daño pancreático se llevó a cabo por la medición de glucosa en plasma en donde no se encontraron cambios con respecto al grupo control. Finalmente no se observó daño histológico en riñón, páncreas, bazo, corazón y cerebro, se observaron lesiones en pulmón e hígado no directamente asociadas a la administración de la SAC.

En conclusión, estos resultados revelan que la administración crónica de la SAC no causó un efecto tóxico, ya que no se observaron cambios en los parámetros bioquímicos y morfológicos evaluados. Además, apoyan el potencial uso y administración de la SAC en enfermedades crónicas.



III. ANTECEDENTES

1. Oxígeno y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

El dioxígeno y sus especies reactivas

El 21% de la atmósfera es dioxígeno (O_2), prácticamente todo el O_2 atmosférico es producto de la oxidación del agua, que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, las algas y las cianobacterias utilizando la energía luminosa del sol. Por otro lado, la mayoría de los organismos utilizan el O_2 para respirar, reduciéndolo a agua (Hansberg, 2008).

El O_2 es un diradical debido a que tiene un electrón en cada uno de sus orbitales de antiunión. Los electrones desapareados tienen el mismo giro (spin), estos electrones solo pueden interaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. En la mayoría de los compuestos los electrones se encuentran apareados, hay pocos electrones libres y solo algunos de estos tienen un giro opuesto a los del oxígeno (Hansberg, 2008).

Estando en reposo los humanos consumimos 30 g de O_2 cada hora, más de 260 Kg al año. Haciendo ejercicio utilizamos hasta 10 veces más. Entre el 85 y el 90% de ese O_2 se emplea en las mitocondrias para formar ATP. Como el ATP se usa segundos después de haber sido sintetizado se necesita una fuente continua de O_2 y una fuente de electrones para producir el ATP (Hansberg, 2008).

Se consideran especies reactivas de oxígeno (ERO) al oxígeno atómico (O) y al ozono (O_3), que se genera de la unión de O con O_2 ; oxígeno singulete (1O_2) que se produce por la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 ; al superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) que son especies parcialmente reducidas. También se pueden formar compuestos reactivos con el nitrógeno, como el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO^{\bullet}), el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) y se conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Hansberg, 2008).



Algunas de las ERO son radicales, esto es que tienen electrones desapareados y por lo tanto son muy reactivos mientras que otras que no son radicales son muy oxidantes (Hansberg, 2008).

En la Tabla 1 se enumeran las principales ERO y ERN, su fuente, concentración intracelular, reactividad y vías de eliminación (Hansberg, 2008).

Tabla 1. Fuente concentración intracelular, reactividad y eliminación de las Principales ERO y ERN.

Especie	Fuente	Concentración intracelular	Reactividad	Eliminación
O_2	Externa, catalasa	10 a 20 μM	Hemo, Fe(II), flavinas, pterinas alcoxilos, NO^\bullet	Respiración, oxidasas.
O_3	Externa	≈ 0	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos y demás compuestos celulares	Ascorbato
1O_2	Fotosensibilización, descomposición del H_2O_2 (HOBr), dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$, peroxilípidos, $NO_2 + ONOO^-$	pM vida $1/2 < 1 \mu seg$	Ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, sacáridos y demás compuestos celulares	Carotenos, tocoferoles, glutatión, ascorbato
$O_2^{\bullet-}$	Externa e interna: cadena respiratoria, NADPH oxidasas, y xantina oxidasas, lipoxigenasa, citocromo P_{450} , hemoglobina, peroxidases	pM - μM	$O_2^{\bullet-}$, NO^\bullet , Fe(III), [4Fe-4S] quinonas, difenoles	SOD, dismutación espontánea



H_2O_2	Externa e interna: dismutación del $O_2^{\bullet-}$, oxidasas	nM a μ M	Ascorbato, hemo, Fe-S	Catalasas, peroxidasas, peroxirredoxinas
$\bullet OH$	Reacción Fenton	≈ 0	Cualquier compuesto vecino	Glutación, ascorbato, solutos compatibles
NO^{\bullet}	NOS	nM	$O_2^{\bullet-}$, hemo, Fe(III), Fe-S, tioles	Hemoglobina, flavohemoglobina
$ONOO^-$	$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-}$	pM	CO_2 , NO^{\bullet} , Fe-S, tioles, lípidos	Espontánea
NO_2^{\bullet}	$ONOO^- + CO_2$	pM	Tir, Trp, Cis, hemo, lípidos	Glutación, ascorbato

2. Fuentes biológicas

Las ERO se producen en varios procesos fisiológicos (Witerbourn, 2008), bajo condiciones normales cerca del 2% del O_2 consumido por el cuerpo se convierte en $O_2^{\bullet-}$ (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

La mitocondria es uno de los sitios propuestos como principales generadores de ERO, ya que la función del O_2 es recibir electrones provenientes de la cadena respiratoria; sin embargo el hecho de que la cadena respiratoria este constantemente transfiriendo electrones de uno en uno, sugiere que de existir una fuga en el sistema, los electrones desapareados podrían generar radicales libres. La contribución de cada sitio a la producción general de $O_2^{\bullet-}$ varía dependiendo del órgano y el tejido, así como si las mitocondrias están respirando de manera muy activa o de si están en un estado altamente reducido. El complejo III es el responsable de la mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ en las mitocondrias del corazón y pulmón, mientras que el complejo I es en apariencia la fuente principal en el cerebro y en una gran cantidad de patologías (Konisberg, 2008a).



Las monooxigenasas insertan un átomo de oxígeno en el sustrato a oxidar, mientras el segundo átomo de oxígeno es reducido con electrones que vienen de algún donador específico y generalmente como producto dan una molécula de agua. Una de las monooxigenasas que juega un papel crítico en varios mecanismos críticos del metabolismo son aquellas que contienen un grupo hemo como grupo prostético llamada P₄₅₀. Los P₄₅₀ se encuentran dentro del sistema de monooxigenasas microsomales (MOM), unidos a las membranas, se localiza principalmente en el retículo endoplasmático de la mayor parte de los tejidos animales, principalmente en el hígado. Los P₄₅₀ catalizan compuestos xenobióticos y degrada varios compuestos endógenos. El sistema MOM es un complejo enzimático en donde el citocromo P₄₅₀ es el aceptor final de electrones. Este sistema es muy ineficiente en los eucariotas, aun en ausencia de los sustratos necesarios, la cadena sigue oxidando NADPH, de manera que una porción significativa del O₂ activado se libera de la enzima sin que lleve a cabo ninguna modificación del sustrato, lo cual conlleva a una alta tasa de generación de ERO (Konisberg, 2008b).

La familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX), se encuentran en varios tejidos, las más estudiada son las que se encuentran dentro de las células fagocíticas. Cuando estas células llegan al sitio de infección, el patógeno es envuelto en una membrana llamada fagosoma, la NOX recibe un electrón de la NADPH y lo dona al O₂ generando O₂^{•-}, que aunque puede convertirse en otras ERO la mayor parte dismuta a H₂O₂, por acción de la enzima mieloperoxidasa. Un mecanismo propuesto para la desactivación de esta enzima es la desfosforilación de una o más serinas de la NOX, se han propuesto otros mecanismos dependiendo del estímulo y el agonista que activó la enzima. Recientemente, se han descrito varios homólogos de la subunidad catalítica de la NOX, gp91phox, que se han agrupado como una familia bajo el nombre de NOX para las NADPH oxidasas y DUOX para las oxidasas duales (Konisberg, 2008c).

Las enzimas NOX tienen un papel modulador en el estado redox, así como en mecanismos de señalización celular y activación de vías metabólicas; por ejemplo, las NOX/DUOX están involucradas en la síntesis de hormonas tiroideas, la NOX 3



en la formación del oído interno y la NOX 1 en la regulación del flujo sanguíneo. Se ha sugerido que las ERO y las ERN derivadas del metabolismo de la xantina oxidorreductasa (XOR) participa en la inmunidad innata, de manera específica en la respuesta inflamatoria y la defensa antimicrobiana en el aparato digestivo. También se ha propuesto que pudieran estar involucradas en la señalización y metabolismo de los xenobióticos (Konisberg, 2008c).

La enzima XOR es un miembro evolutivamente muy conservado de la familia de las enzimas que poseen molibdeno como grupo prostético. En mamíferos los mayores niveles se encuentran en el hígado y en el intestino delgado. Esta enzima puede encontrarse en una de dos formas interconvertibles, que son la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO). Ambas formas participan en el catabolismo de los compuestos nitrogenados, particularmente la degradación de las purinas (adenina y guanina). El mecanismo de acción se divide en dos semireacciones: reductora y oxidante. Durante la oxidación de la XOR totalmente reducida, se transfieren un par de electrones al O_2 , generando H_2O_2 . Después, la XOR transfiere los electrones remanentes en pasos separados, de manera tal que cada electrón reduce de forma independiente a una molécula de O_2 , generando $O_2^{\bullet-}$. La reoxidación de la XOR totalmente reducida produce dos H_2O_2 y dos $O_2^{\bullet-}$. El $O_2^{\bullet-}$ puede combinarse con NO para formar $ONOO^-$ (Konisberg, 2008d).

3. Funciones fisiológicas de las ERO

Las ERO se estudian principalmente como subproductos dañinos del metabolismo (Konisberg, 2008c); sin embargo moderadas cantidades de ERO y ERN son vitales para la salud humana (Pham-Huy *et al.*, 2008). Esto se comprobó al demostrarse que existen enzimas cuya función es la de producir radicales libres y otras ERO (Konisberg, 2008c).

En la última década se ha demostrado que las ERO y ERN participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos, desde el crecimiento y la proliferación hasta la diferenciación y la muerte celular, pasando por transducción de señales (Hansberg, 2008).



Pueden ejercer sus efectos mediante la oxidación reversible de sitios activos en factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) o la proteína activadora-1 (AP-1), permitiendo la expresión génica y el crecimiento celular. Por otro lado, pueden inducir indirectamente factores de transcripción a través de la activación de vías de transducción de señales. Como la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKs) (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

Las ERO fueron propuestas como moléculas de señalización en 1990 cuando se demostró que el H₂O₂ se requiere en la señalización de citocinas, insulina, factores de crecimiento, AP-1 y NF- κ B, entre otros. El papel del H₂O₂ en la inactivación de fosfatasas por la oxidación de citocinas puede ser un mecanismo por el que las ERO afectan las vías de señalización. El papel de las ERO en la apoptosis mediada por el citocromo c está bien establecido. Las ERO pueden causar cambios reversibles postraduccionales en las proteínas para regular las rutas de señalización (Rahal *et al.*, 2014). También podrían funcionar como segundos mensajeros, en varias etapas del desarrollo. Ya que se elevan durante la fertilización y se ha sugerido que el desarrollo prenatal y embrionario se regula por ERO (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

Las ERO se usan en el sistema inmune; por ejemplo, desencadenan la proliferación de las células T a través de la activación del factor NF- κ B. Macrófagos y neutrófilos generan ERO para eliminar las bacterias que fagocitan. Además el factor de necrosis tumoral (TNF- α), media la citotoxicidad en células tumorales o infectadas por virus a través de la generación de ERO y la inducción de apoptosis (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

Además participan en varios sistemas de señalización celular en diferentes tipos de células no fagocíticas que incluyen los fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso vascular, miocitos cardiacos y del tejido tiroideo, entre otras (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Participan en la biosíntesis de moléculas como la tiroxina, que acelera el desarrollo, se sabe que la concentración de H₂O₂ es crítica para la síntesis de la tiroxina ya que



se necesita para la unión de los átomos de yodo a la tiroglobulina (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

El NO es un mensajero intracelular en la modulación del flujo sanguíneo, trombosis y actividad neuronal. También es importante en la defensa no específica del huésped y para eliminar patógenos intracelulares y tumores (Pham-Huy *et al.*, 2008).

4. Estrés oxidante

Al desbalance entre la formación de especies oxidantes y el nivel de antioxidantes, en favor de las primeras y que potencialmente causa algún tipo de daño celular, se le denomina estrés oxidativo (Sies, 1997). El estrés oxidativo puede dañar a diferentes macromoléculas, entre ellas proteínas, lípidos y al DNA. Debido a que los lípidos y el DNA poseen un número limitado de sitios reactivos frente a las ERO, la cuantificación de sus productos es más accesible y han sido un tema de mayor atención que el estudio de las proteínas que es más complejo debido a que poseen mecanismos de reacción complicados y numerosos productos de reacción (Zentella de Piña y Piña, 2008).

5. Antioxidantes

Los antioxidantes se definieron anteriormente como sustancias que cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones comparados con los compuestos oxidables (por ejemplo ADN, proteínas, lípidos o carbohidratos) disminuyen o previenen el daño oxidativo causado por la presencia de ERO. Esta definición se ha ampliado, debido a que hay sustancias que son consideradas actualmente como antioxidantes aunque no se encuentran en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, por lo que la definición actual es cualquier sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidante de una molécula diana (Halliwell y Gutteridge, 2007; Veskovski *et al.*, 2012).



Los antioxidantes pueden actuar como prooxidantes, esto dependerá de su concentración y de la presencia de iones metálicos (Azam *et al.*, 2004; Decker, 1997; Lippmann, 2010; Raza y John, 2005; Watjen *et al.*, 2005).

Las células están equipadas con sistemas antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) y no enzimáticos que eliminan el exceso de ERO con el fin de mantener la homeostasis redox (Figura 1, principales sistemas antioxidantes enzimáticos). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen antioxidantes exógenos, tomados de la dieta, como el ácido ascórbico (vitamina C), el α tocoferol (Vitamina E), los carotenoides, los flavonoides, entre otros; mientras que los antioxidantes endógenos son aquellos que son sintetizados en el organismo como la bilirrubina o el glutatión reducido.

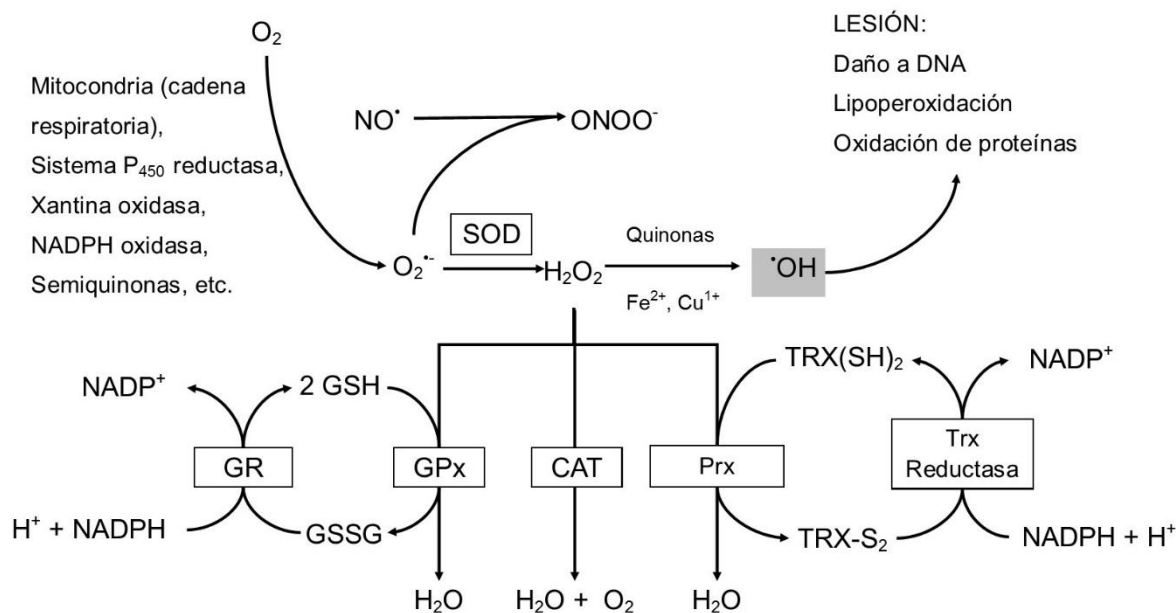


Figura 1. Principales sistemas antioxidantes enzimáticos. Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutatión peroxidasa (GPx), Glutatión Reductasa (GR), Peroxirredoxina (Prx) y Tiorredoxina Reductasa (Trx reductasa).



5.1 El ajo como fuente de antioxidantes

El ajo es una especia que ha sido usada ampliamente a lo largo de la historia en todo el mundo con propósitos culinarios y médicos (Block, 1985; Hahn, 1996). Se emplea en forma de aceites, líquidos, tabletas, capsulas o consumiendo la planta fresca. Cada una de estas presentaciones tiene una composición química diferente de compuestos organosulfurados (Lawson y Gardner, 2005).

El extracto de ajo envejecido (EAE) es un producto que se obtiene al poner a envejecer, por más de 20 meses, ajo fresco en etanol (15 al 20%) dentro de tanques de acero a temperatura ambiente. Tiene una alta biodisponibilidad, además sus efectos biológicos han sido demostrados tanto en animales como en humanos (Amagase *et al.*, 2001; Lawson, 1998).

5.1.1 S-alilcisteína (SAC)

La SAC es un aminoácido organosulfurado y es uno de los principales componentes que se encuentra en mayor cantidad en el EAE. Los efectos biológicos del EAE han sido atribuidos a la SAC, por ello se utiliza para estandarizar este tipo de presentación (Aged Garlic Extract, 2006).

La SAC es un polvo blanco cristalino, de olor característico, no higroscópico, cuyo punto de fusión es 223.3-223.7°C. Puede formarse por una reacción enzimática (Figura 2A), como sucede durante el proceso de envejecimiento, donde la γ -glutamil-alilcisteína, presente en el ajo crudo, es convertida a SAC por la γ -glutamil transferasa (Kodera *et al.*, 2002). También puede ser sintetizada químicamente (Figura 2B) a partir de la L-cisteína y el bromuro de alilo (Maldonado *et al.*, 2003; Nagae *et al.*, 1994).

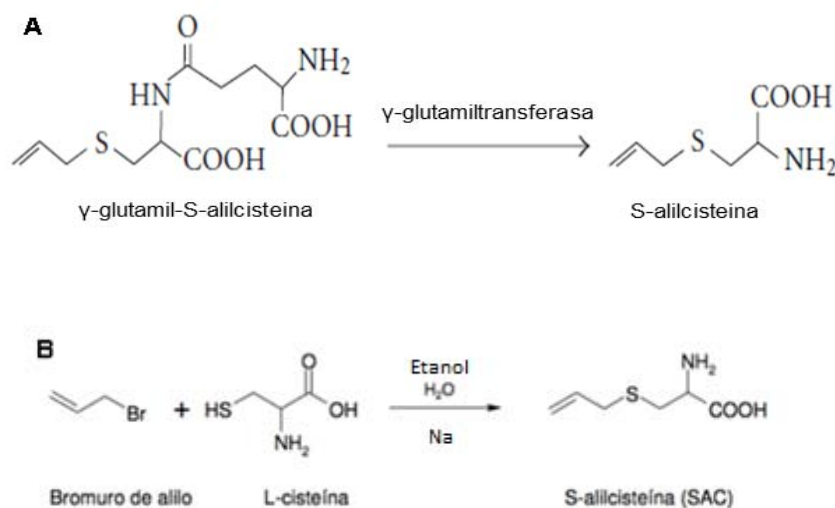


Figura 2. Síntesis enzimática y química de la SAC. (A) La síntesis enzimática ocurre a través del catabolismo de la γ -glutamyl-S-allylcisteína por la γ -glutamyl transferasa. (B) La síntesis química ocurre de la reacción entre la L- cisteína y el bromuro de alilo.

5.1.1.1 Importancia biológica

Un agente que modula múltiples y diversos mecanismos y sitios de acción puede ser un candidato efectivo como un potente fármaco (Ray *et al.*, 2011) para enfermedades que afectan a varios sistemas. La SAC ha demostrado ser un potente antioxidante, además de tener efecto en diferentes sistemas como hepatoprotector, cardioprotector, neuroprotector y renoprotector por lo que puede ser tratamiento de enfermedades que afectan múltiples sistemas, como la preclamsia (revisado en Yu *et al.*, 2012), entre otros.

Como agente antioxidante la SAC es capaz de atrapar O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, ONOO^- , ácido hipocloroso y el oxígeno singulete, previene la lipoperoxidación y la oxidación o nitración de proteínas (revisado en Maldonado *et al.*, 2011). Además de ser un potente antioxidante se ha probado su actividad en modelos donde el estrés oxidante juega un papel importante (revisado en Segoviano-Murillo *et al.*, 2008).



Hasta ahora se ha informado que la SAC ejerce su efecto antioxidante a través diferentes mecanismos como: 1) atrapar ERO y ERN (antioxidante directo); 2) incrementar los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (antioxidante indirecto), a través de la activación del factor Nrf2; 3) inhibir algunas enzimas prooxidantes (xantina oxidasa, ciclooxigenasa, y NADPH oxidasa; y 4) quelar metales como el Fe^{2+} y Cu^{2+} , evitando así la reacción de Fenton (Colín-González *et al.*, 2012).

En la Figura 3 se presentan los mecanismos antioxidantes asociados a la SAC.

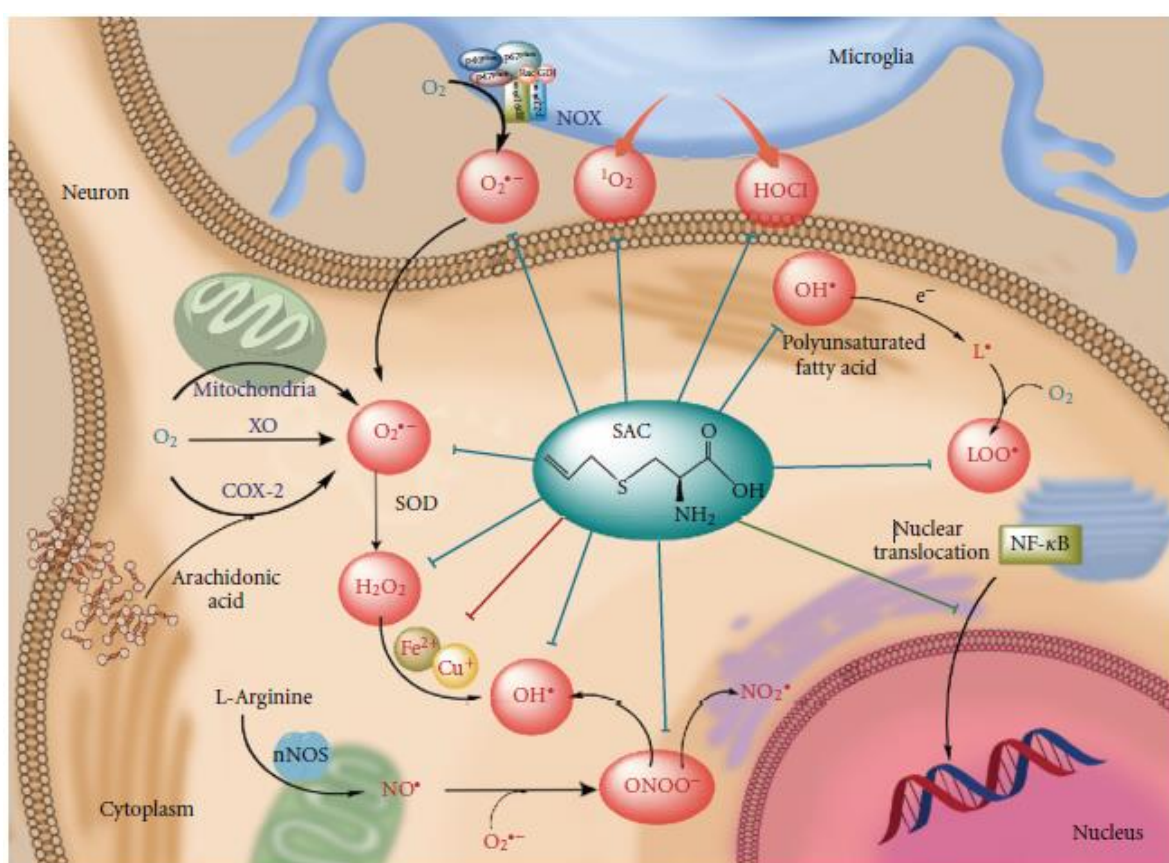


Figura 3. Mecanismos antioxidantes asociados a la S-alicisteína (SAC). COX-2: ciclooxigenasa 2, NOX: NADPH oxidasa, nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal, SOD: superóxido dismutasa, XO: xantina oxidasa (tomada de Colín-González *et al.*, 2012).

El factor de transcripción Nrf2 (factor nuclear-E2-factor relacionado 2) es el guardián de la homeostasis redox y regula la expresión basal e inducible de genes



antioxidantes y citoprotectores, dando el nivel de protección requerido para el funcionamiento normal y contra el estrés oxidativo relacionado con algunas patologías. También regula los genes que codifican enzimas antioxidantes, proteínas antioxidantes, producción de proteínas-NADPH, factores de crecimiento, proteínas relacionadas con inflamación y respuesta inmune, proteínas de señalización. En modelos de estrés oxidativo, Nrf2 podría estimular un efecto protector (revisado en Colín-González *et al.* 2012) mientras que la disminución del mismo es prevenida por la SAC, ya que ésta es capaz de activarlo en diferentes órganos tales como el cerebro, el hígado y el riñón (Gómez- Sierra *et al.* 2014).

Se sabe que en cultivos celulares de hígado con esteatosis, la SAC disminuye la acumulación de ERO y previene la muerte celular, el cual es un efecto relacionado con la inhibición de la lipogénesis; además, se observó que al contrarrestar los cambios en la expresión de genes inducida por ácidos grasos también se restauró la regulación de proteínas (Hwang *et al.*, 2013). Adicionalmente se reportó que la SAC induce al gen ABCA1 y su proteína, ABCA1 es reconocido como un regulador del flujo del colesterol mediado por apolipoproteínas y la formación de células espumosas, el aumento en la expresión de ABCA1 puede mejorar la excreción del colesterol vía HDL (lipoproteínas de alta densidad) y retrasar el desarrollo de la aterosclerosis (Malekpour-Dehkordi *et al.*, 2013). La oxidación de las lipoproteínas juega un papel importante en la progresión de la arterosclerosis, la SAC protege a las células endoteliales contra la citotoxicidad asociada a las lipoproteínas oxidadas (Ide y Lau 1999). El tetracloruro de carbono provoca fibrosis y cirrosis en el hígado, efecto inhibido por la SAC, que inhibe NF- κ B inducida por el factor de necrosis tumoral alfa y los linfocitos T (Kodai *et al.*, 2015).

En un modelo de sepsis la SAC previno el daño en pulmón e hígado, efecto atribuido a sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes y moduladores (Bayrakatar *et al.*, 2015). La SAC puede bloquear la activación de NF- κ B (revisado en Cruz C *et al.*, 2007), NF- κ B ha sido ligado a un sinnúmero de enfermedades metabólicas, inflamatorias y de diversos tipos de cáncer (Escárcega, 2010).



En el pulmón, la SAC atenúa la fibrosis pulmonar y la inflamación aguda inducida por la administración de tetracloruro de carbono, efecto atribuido a su capacidad para atrapar radicales libres e inducir el aumento de glutatión (Mizuguchi *et al.*, 2006).

La SAC podría ser una alternativa terapéutica en las enfermedades cardiovasculares, debido a su efecto cardioprotector (Padmanabhan y Prince, 2006) e hipolipidémico en modelos de infarto al miocardio, ya que incrementa los niveles de HDL, una lipoproteína cardioprotectora. Este hecho le proporciona una ventaja sobre el uso de otros compuestos hipolipidémicos debido a que la mayoría disminuyen los niveles de HDL (Basheeruddin-Asdaq, 2015). Además, disminuye los efectos tóxicos de la doxorubicina (anticancerígeno) en el corazón y en el hígado (Mostafa *et al.*, 1999).

La SAC también puede ayudar en el tratamiento de enfermedades que involucran la hipertensión, se ha probado que inhibe la producción de NO[•], la expresión de iNOS (Kim *et al.*, 2001), efecto que se ha probado en ratas hipertensas, donde se observó que disminuye la mortalidad, disminuyendo la incidencia de ataques cerebrovasculares (revisado en Cruz C *et al.*, 2007).

Varios estudios han demostrado que la SAC disminuye el estrés oxidativo en la isquemia experimental (Ashafaq *et al.*, 2012; Atif *et al.*, 2009; Numagami *et al.*, 1996; revisado en Shi *et al.*, 2015) efecto que se ha atribuido a la activación de Nrf2 (Shi *et al.*, 2015).

El potencial de la SAC en el sistema nervioso central abarca varias patologías además de la isquemia, se ha reportado que disminuye los déficits de aprendizaje en ratones con senescencia acelerada (Nishiyama *et al.*, 2001) protege contra la enfermedad de Parkinson (García *et al.*, 2008, 2010, 2014; Rojas *et al.*, 2011) la enfermedad de Alzheimer (Ito *et al.*, 2003; Kosuge *et al.*, 2003; Nishiyama *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2002; Pérez-Severiano *et al.*, 2004a, 2004b; Ray *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011) y la enfermedad de Huntington (Herrera-Mundo *et al.*, 2009; Pérez-de la Cruz *et al.*, 2006); así mismo, ha demostrado tener actividad neuroprotectora:



Protege a las neuronas contra el daño mediado por ERO y ayuda a mantener la estructura de las neuronas (Ray *et al.*, 2011), en modelos de toxicidad disminuye la lipoperoxidación, la disfunción mitocondrial y los déficits neuroquímicos y de comportamiento (García *et al.*, 2008). Actúa como neuromodulador, tiene actividad neurotrófica y antiapoptótica (García *et al.*, 2008).

Con un efecto renoprotector, la SAC previene el estrés oxidativo y el daño renal agudo causado por la gentamicina (Maldonado *et al.*, 2003), la nefrotoxicidad causada por cisplatino (Gómez-Sierra *et al.*, 2014), reduce el daño renal y la hipertensión en ratas 5/6, donde se observó que la SAC puede ser usada para disminuir la hipertensión y retrasar el daño renal (Cruz *et al.*, 2007), también se ha reportado que es capaz de inhibir el daño causado por la isquemia-reperfusión en el riñón (Segobiano-Murillo *et al.*, 2008)

En el caso de la diabetes, usando un modelo de diabetes inducida, se ha demostrado que la administración oral diaria de SAC tiene propiedades antidiabéticas disminuyendo los niveles de glucosa, aumento en los niveles de insulina (Saravanan *et al.*, 2009a), mejora las defensas antioxidantes (Saravanan y Ponmurugan, 2013; Saravanan y Ponmurugan, 2010), disminución de glucoproteínas en plasma, hígado y riñón (Saravanan *et al.*, 2010), ayuda a regular el metabolismo de la glucosa (Saravanan *et al.*, 2009b), modula el metabolismo del hierro (Saravanan *et al.*, 2013), posee un efecto antihiperlipidémico (Saravanan y Ponmurugan, 2012b), regulación de la secreción de hormonas tiroideas (Saravanan y Ponmurugan, 2012a) y en hígado regula la lipogénesis y el metabolismo de la glucosa (Takemura *et al.*, 2013).

La quimioprevención se define como el uso de productos naturales que inhiben el desarrollo del cáncer invasivo, estos agentes pueden ejercer sus efectos anticancerígenos a través de los siguientes mecanismos: inhibiendo la formación de metabolitos carcinógenos, induciendo enzimas que detoxifican carcinógenos, eliminando ERO, influenciando apoptosis e inhibiendo la proliferación celular (Sunderasan y Subramanian, 2008).



Se ha estudiado los efectos anticancerígenos y/o quimiopreventivos de la SAC en modelos de cáncer de colón (Hanoto *et al.*, 1996) cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2012), cáncer de pecho, cáncer de ovario (Xu *et al.*, 2014), cáncer de la cavidad oral (Balasenthil y Nagini, 2000), cáncer de pulmón de células no pequeñas, hepatocarcinoma, cáncer nasofaríngeo y neuroblastoma; a través de la estimulación de las vías apoptóticas, migración e invasión inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos, inhibición de la proliferación celular y el aumento en las enzimas antioxidantes (Revisado en Cho *et al.*, 2015)

Adicionalmente, también se ha reportado que la SAC mejora la calidad del espermatozoides y proporciona la protección contra el estrés oxidativo y la disfunción del mismo asociado con la edad (Takemura *et al.*, 2014).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son los medicamentos más usados en el mundo para el tratamiento del dolor, inflamación y fiebre, sin embargo, se asocian a los daños en la mucosa gástrica incluyendo a las úlceras formadas directa o indirectamente, por lo que se buscan tratamientos menos agresivos o que disminuyan los efectos adversos de los AINES. La SAC actúa como un gastroprotector pues previene la ulceración gástrica inducida por AINES bloqueando la inflamación, mostró un efecto superior a la rebamipida, un gastroprotector que se prescribe como tratamiento (Park *et al.*, 2014).



5.1.1.2 Farmacocinética

La farmacocinética de la SAC no ha sido bien estudiada en humanos; sin embargo, en un estudio preliminar se ha informado que se absorbe oralmente (Amano *et al.*, 2014). La SAC administrada por vía oral es bien absorbida en ratones, ratas y perros; la biodisponibilidad es alta (87-103%). Al administrar una dosis de 5 mg/Kg en ratas se ha reportado una biodisponibilidad del 98%; además, a ésta dosis tan pequeña se ha reportado que existe la probabilidad de que la SAC no sufra un metabolismo de primer paso en el hígado pues es uno de los aminoácidos solubles en agua cuya absorción está mediada por transportadores de aminoácidos situados en el lumen intestinal de las especies de mamíferos incluyendo las ratas. Hasta la fecha, el metabolismo de la SAC en animales y seres humanos no ha sido bien estudiado pero se ha mencionado que el metabolismo es limitado y sufre una extensa reabsorción renal, todo lo cual contribuye a la concentración elevada y relativamente de larga duración en el plasma. También se sugiere que el hígado y los riñones juegan un papel crítico en la eliminación de la SAC en ratas la cual se ha reportado que es excretada en la orina y en la bilis. En orina es excretada como su forma no transformada (1.6%) y casi en su totalidad como metabolitos N-acetilados como NAc-SAC (N-acetil-S-alil-L-cisteína) en un 83% y NAc-SACS (N-acetil-S-alil-L-cisteína sulfóxido) en un 11% y como SACS (S-allil-L-cisteína sulfóxido) en un 0.01%, mientras que en bilis apenas se excreta como su forma no transformada (0.45%), NAc-SAC en un 0.77% y NAc-SACS en un 0.05% (Amano *et al.*, 2015)

En la Figura 4 se muestra que después de una administración oral se observan dos fases muy rápidas (absorción y distribución) seguida de una fase lenta de eliminación. Si su administración es intravenosa se observa una distribución rápida seguida de una eliminación muy lenta.

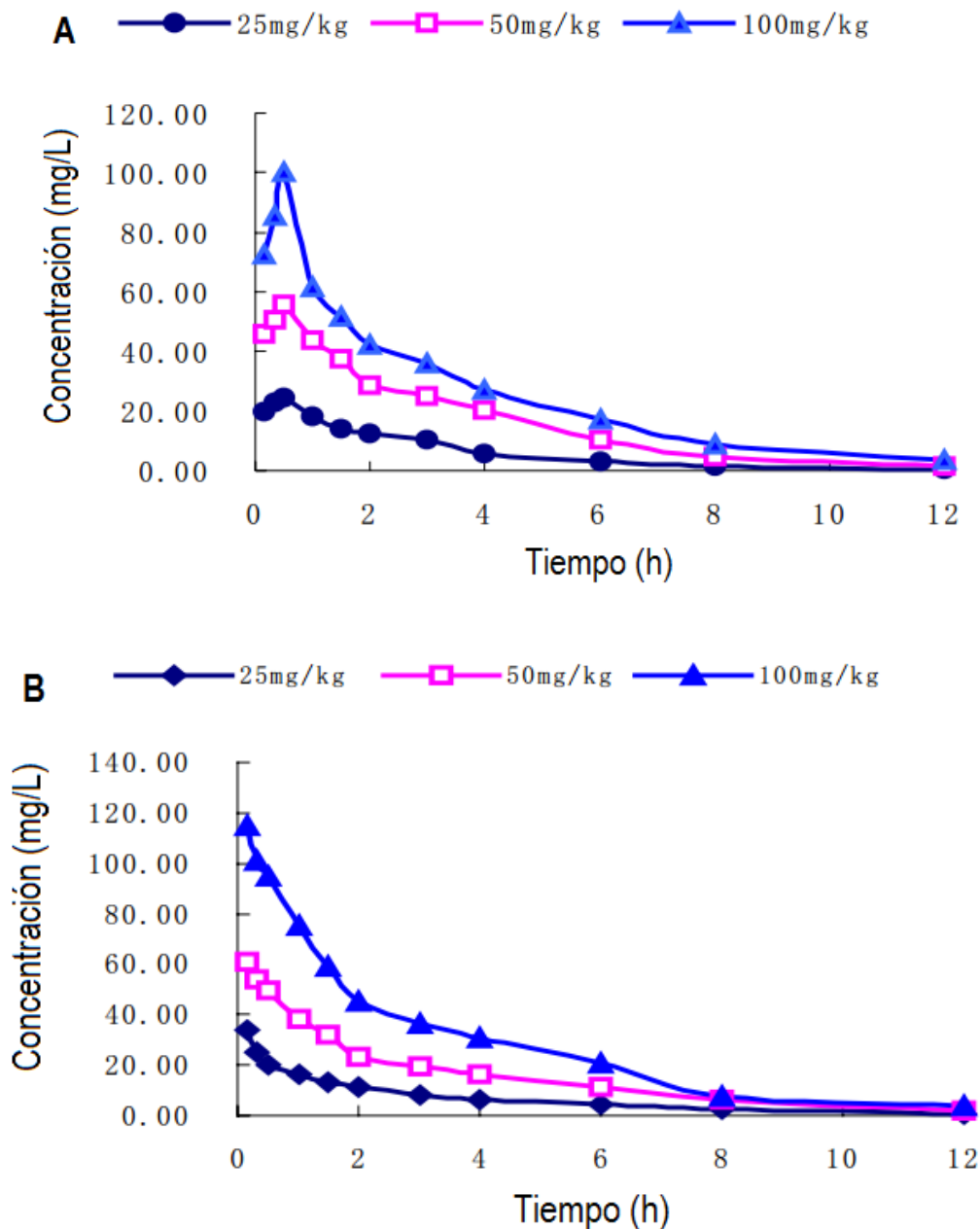


Figura 4. Perfiles de concentración promedio en plasma después de la administración (A) vía oral y (B) vía intravenosa (Modificada de Yan y Zeng, 2005).

5.1.1.3 Distribución en tejidos

Después de su administración oral, la SAC se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y puede ser encontrada en varios tejidos después de las 8 h de administración (Nagae *et al.*, 1994; Yan y Zeng, 2005). El tejido donde se alcanza una mayor concentración es el riñón (C_{max} = 65.7 mg/Kg a los 10 min). El tiempo de



vida media de eliminación varía entre los diferentes tejidos, así el tiempo más largo se observa en el hígado (2.2 h) y el de menor tiempo es en el cerebro (1.2 h). Ver Figura 5 y la Tabla 2 (Revisado en Colín-González *et al.*, 2012; Yan y Zeng, 2005).

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos después de la administración oral de una dosis de SAC 50 mg/Kg

Parámetro Tejido	C_{max} (mg/Kg)	ABC_{0-t} (mg·h/ Kg)	$T_{1/2}$ (h)
Riñón	65.7	169.2	2.1
Hígado	58.1	103.5	2.2
Corazón	43.3	118.8	2.1
Bazo	43.3	100.6	1.9
Pulmón	35.1	94.3	1.3
Cerebro	26.7	70.7	1.2

(Tomada de Colín-González *et al.*, 2012) C_{max} : pico de concentración a los 10 min; ABC_{0-t} : área bajo la curva de concentración plasmática contra tiempo, del tiempo cero hasta la última concentración cuantificable; $T_{1/2}$ tiempo de vida media de eliminación.

Si se administra por vía intravenosa se observan resultados similares ya que en el riñón también se observa la mayor concentración de SAC, mientras que el corazón presenta el tiempo de vida media de eliminación más largo (Yan y Zeng, 2005).

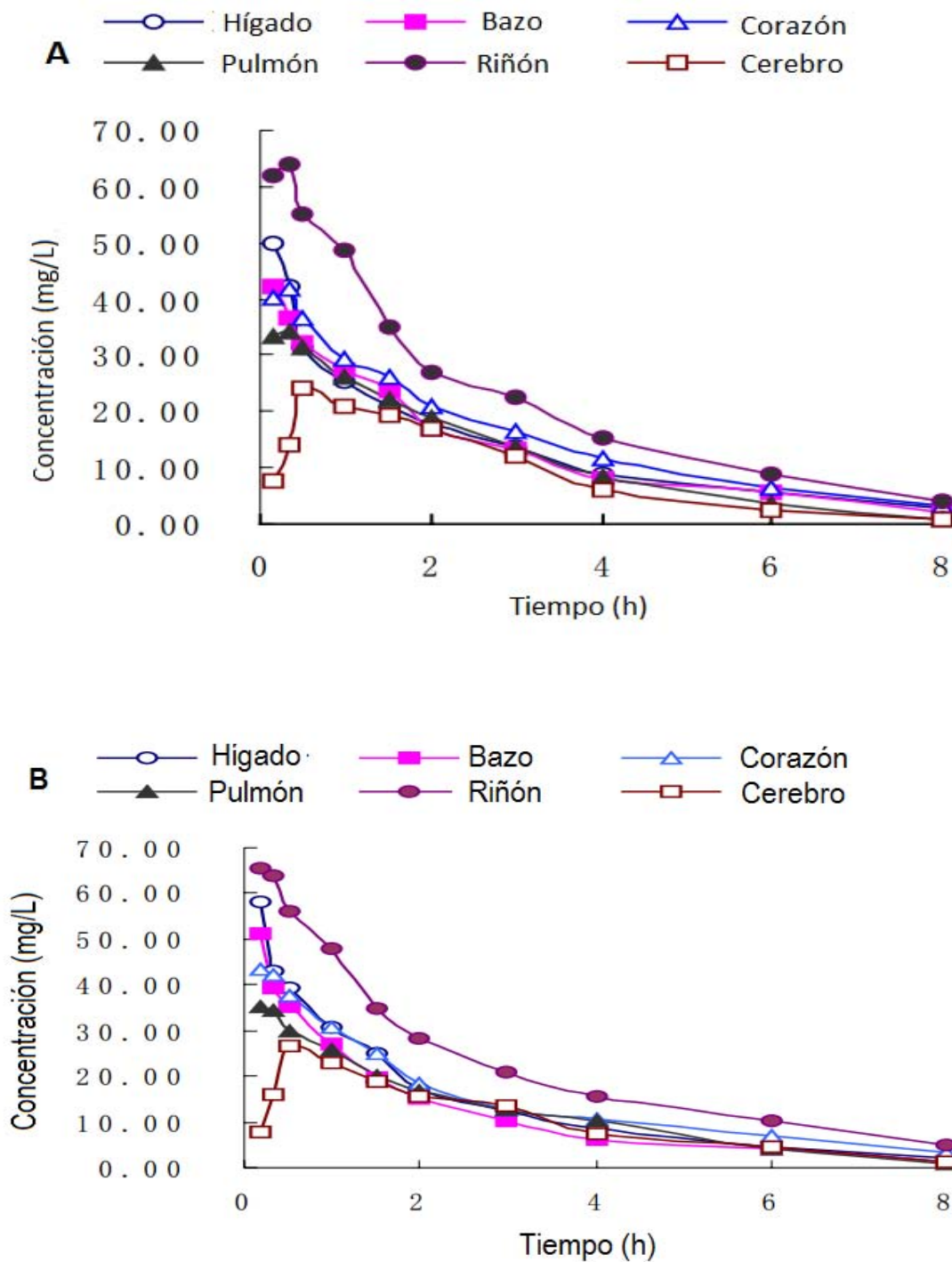


Figura 5. Perfiles de concentración promedio contra tiempo en hígado, bazo, corazón, pulmón, riñón y cerebro después de una dosis única de 50mg/Kg de SAC en ratas por (A) vía oral y (B) vía intravenosa (Tomada de Yan y Zeng, 2005).



5.1.1.4 Toxicidad

La SAC es 30 veces menos tóxica que otros compuestos del ajo como la alicina o el alildisulfuro (Revisado en Colín-González *et al.*, 2012).

La dosis letal por vía *i.p.* en rata es 3.34 g/Kg, más de 20 mM/Kg (Kodera *et al.*, 2002), la cual es muy similar a la de otros L-aminoácidos como la metionina, 29 mM/Kg (Revisado en Colín-González *et al.*, 2012). En la Tabla 3 se describe la dosis letal por vía *i.p.* y por vía oral en ratas y ratones.

Después de su administración oral durante un mes, los efectos negativos que se observaron a dosis ≥ 500 mg/Kg de SAC fueron los siguientes (Kodera *et al.*, 2002):

- Disminución del peso corporal en ambos géneros.
- Aumento del pH urinario en machos.
- Disminución de los niveles de proteínas urinarias (en hembras) y urobilinógeno (en machos). El urobilinógeno es un metabolito de la bilirrubina, generado por las bacterias intestinales que es reabsorbido. Por lo que esta información sugiere que la SAC podría tener efectos sobre la flora intestinal.
- Incremento de los niveles de glucosa en el suero de hembras, sugiriendo que la SAC induce atrofia del páncreas y disminuye la secreción de insulina. La atrofia en el tejido pancreático se observó solo en las hembras administradas con las dosis más altas de SAC de 1000 mg/Kg.
- Modificación de la función renal y hepática (disminución de los niveles de urea y creatinina en suero, aumento en el colesterol total, proteínas, lípidos y fosfatasa alcalina en suero) en hembras.
- Disminución del hematocrito, hemoglobina, el volumen corpuscular promedio, la hemoglobina corpuscular promedio y la concentración corpuscular de la hemoglobina en ambos géneros.



Tabla 3. Toxicidad de SAC en ratón y rata

		DL ₅₀ (g/Kg de peso corporal)	
		Oral	<i>i. p.</i>
Ratón	Macho	8.89	6.91
	Hembra	9.39	3.65
Rata	Macho	10.94	3.34
	Hembra	9.50	3.34

(Tomada de Colín-González *et al.*, 2012).

6. Desarrollo de nuevos fármacos

Para que se autorice la venta de medicamentos estos deben presentar eficacia y seguridad. Ningún medicamento es completamente seguro, ya que existen efectos adversos y secundarios que deben ser evaluados y comparados con los beneficios de su uso (Faqui, 2013).

Después de la identificación de moléculas con potencial terapéutico, se llevan a cabo los estudios preclínicos.

Los estudios preclínicos se realizan en animales y en modelos fisiológicos. En estos estudios se identifica, en un contexto controlado, las características fisicoquímicas del fármaco, como actúa el organismo sobre el fármaco (farmacocinética), como actúa el fármaco sobre el organismo (farmacodinamia) y se lleva a cabo una caracterización de los riesgos del uso de la molécula (estudios toxicológicos) (Gámez y Más, 2007).

Cuando se tienen los estudios preclínicos y la autorización necesaria se comienza con la investigación en humanos, estudios clínicos. Las fases de estos estudios son 4 (Magos y Lorenzana-Jiménez, 2009):

Fase I: Los estudios se realizan en pequeños grupos de voluntarios sanos. El objetivo es revisar la seguridad y evaluar los efectos adversos, establecer los límites de dosis clínicas seguras y la farmacocinética.



Fase II: El fármaco se estudia en pacientes con la enfermedad a tratar. El objetivo es probar la eficacia del fármaco y establecer la dosis mínima efectiva y la dosis máxima tolerada y determinar los efectos adversos. Se prueba junto con un fármaco de referencia del que se conocen sus características o junto a un placebo.

Fase III: Para esta fase los ensayos clínicos controlados son en una población más grande y no tan homogénea como en la fase II, el propósito es obtener datos que sustenten o no la eficacia del nuevo fármaco con respecto a uno de referencia en una población más parecida a la que utilizará el medicamento.

Fase IV: Son posteriores a la aprobación de la comercialización del medicamento, se mantiene una vigilancia continua de la seguridad y eficacia del medicamento.

7. Estudios de toxicidad

Para que un producto farmacéutico pueda ser utilizado en humanos son necesarios varios estudios previos. Los estudios que se llevan a cabo se categorizan en base a su duración como agudos (una sola dosis), sub agudos (14 a 28 días), sub crónicos (90 días) y crónicos (180 días roedores y 270 días no roedores) (Faqui, 2013).

En la práctica la duración de un estudio general de toxicidad y el número de dosis a administrar en los animales, se basa en las características específicas del medicamento, así como en el número de dosis que se espera administrar durante cada fase de los estudios clínicos en humanos. La duración de los estudios preclínicos debe ser igual o exceder la duración de los estudios que se llevarán a cabo en humanos (Faqui, 2013).

La toxicidad de una sustancia se clasifica en aguda y crónica, dependiendo de los efectos después de la exposición a la molécula. Los efectos agudos son aquellos que ocurren rápidamente después de una sola dosis o después de pocas exposiciones a la sustancia. Los efectos crónicos son aquellos que ocurren después



de repetidas (múltiples) exposiciones y se clasifican además como efectos no carcinógenos y carcinógenos (Faqui, 2013).

El objetivo de una evaluación toxicológica es caracterizar los efectos adversos dosis-respuesta en tejidos, órganos y sistemas, y cuando ocurren su posible reversibilidad. Además, permiten estimar una dosis inicial segura para iniciar estudios en humanos e identificar parámetros para monitorear los posibles efectos adversos (Klassen y Watkins, 2005; Faqui, 2013).

Para que una sustancia química provoque efectos tóxicos sobre el organismo, es necesario que dicha sustancia o sus metabolitos alcancen (en el lugar adecuado del cuerpo y durante un tiempo adecuado) una concentración suficiente como para producir una manifestación tóxica. El que tenga o no una respuesta tóxica, dependerá de las características químicas y físicas de las sustancias, del lugar de exposición, del metabolismo del agente por parte del sistema y de la sensibilización del propio individuo (Klassen y Watkins, 2005; Repetto y Repetto, 2009).

Los efectos producidos por la exposición crónica son diferentes a los producidos por una dosis única. Los efectos crónicos pueden deberse al intervalo de exposición que se da entre el momento de la administración y la eliminación, por lo que la velocidad de eliminación juega un papel importante. Además, existe la posibilidad de que tras cada administración haya daños tisulares o celulares residuales, aun cuando la sustancia no se acumule. Por lo tanto, el intervalo entre las dosis debe ser lo suficientemente largo como para permitir la reparación completa del daño tisular. En consecuencia, los efectos tóxicos crónicos pueden aparecer cuando la sustancia se acumula (la velocidad de absorción supera a la de biotransformación, a la excreción, o ambas), cuando el agente produce efectos tóxicos irreversibles o cuando el intervalo de exposición no concede el tiempo suficiente para que el sistema se recupere del daño tóxico (Klassen y Watkins, 2005; Repetto y Repetto, 2009).

El daño puede ser reversible o irreversible, dependiendo de si el organismo es capaz de reparar el daño provocado o no (Klassen y Watkins, 2005; Repetto y Repetto, 2009).



La toxicidad sistémica suele producir sus principales efectos en tan solo uno o dos órganos (órganos diana), el órgano afectado no siempre es el lugar donde se alcanza la concentración más alta de la sustancia administrada (Klassen y Watkins, 2005).

En el caso de las sustancias que son necesarias para las funciones fisiológicas normales y la supervivencia (vitaminas, oligoelementos como el cromo, el cobalto y el selenio), la relación gradual entre dosis y efecto en un individuo a lo largo de todo el intervalo de dosis tiene realmente forma de U. Es decir la magnitud de los efectos nocivos es grande a dosis muy bajas (o carencia) pero disminuye al aumentar la dosis. Cuando la dosis alcanza el punto en el que no hay carencia, los efectos nocivos desaparecen y el organismo alcanza un estado de homeostasis. No obstante si la dosis aumenta hasta valores anormalmente altos, aparecerá una respuesta adversa (que suele ser cualitativamente diferente de la observada con dosis deficitarias) cuya magnitud crecerá de acuerdo con la dosis (Klassen y Watkins, 2005).

La hormesis se refiere a la capacidad que tienen las sustancias tóxicas que no son nutritivas de ejercer efectos benéficos o estimulantes a dosis bajas, mientras que a dosis más altas producen efectos nocivos (Klassen y Watkins, 2005). En la Figura 6 se presenta la relación hipotética entre dosis y efecto que muestra las características de la hormesis, los efectos hormésicos de una sustancia ocurren cuando con dosis relativamente bajas se estimula una respuesta beneficiosa o protectora (Figura 6 B), como la inducción de las vías enzimáticas que protegen frente al estrés oxidativo. Por otro lado, aunque las dosis bajas proporcionan un efecto beneficioso, si al aumentar la dosis se supera el umbral los efectos netos serán nocivos (Figura 6 A) y se producirá un aumento típico de la toxicidad relacionado con la dosis. Finalmente, la curva completa de dosis respuesta (Figura 6 C) es conceptualmente semejante a la curva de dosis respuesta individual de nutrientes esenciales que aparecen en la figura (Tomada de Klassen y Watkins, 2005).

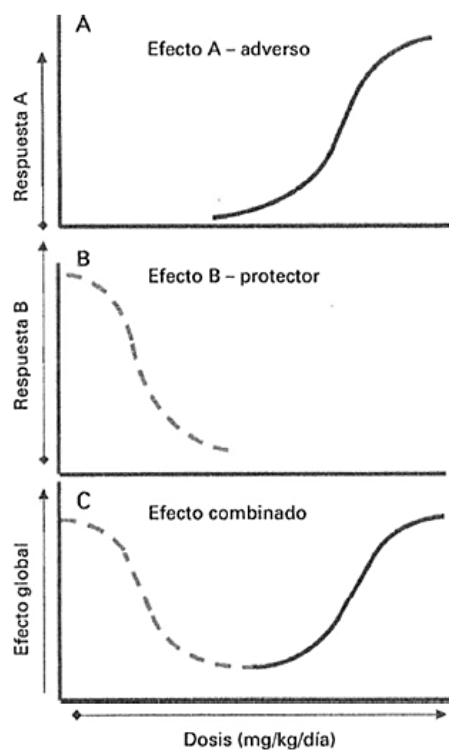


Figura 6. Relación hipotética entre dosis y efecto que muestra las características de la hormesis. (Tomada de Klassen y Watkins, 2005)



IV. INTRODUCCIÓN

La S-alilcisteína (SAC) es el componente principal del extracto de ajo envejecido; actualmente existe un gran interés en este compuesto debido a los efectos farmacológicos que muestra, y que incluyen acciones como: antioxidante directo, indirecto, antiapoptótico, antiinflamatorio, entre otras. En diversos trabajos se ha reportado que la SAC ejerce un efecto protector (hepatoprotector, cardioprotector, neuroprotector y renoprotector; además, de sus efectos anticancerígenos y/o quimiopreventivos en varios modelos de cáncer) cuando se administra como pretratamiento en diferentes modelos experimentales, donde el estrés oxidante está involucrado en el mecanismo de inducción de daño. Debido a las propiedades mencionadas de la SAC, se considera un compuesto prometedor para ser evaluado como agente terapéutico en diferentes modelos de daño.

Actualmente sólo existe un reporte en la literatura sobre la toxicidad aguda de la SAC y debido a que no se cuenta con información de los efectos de la SAC durante una administración mayor a 1 mes, el objetivo de nuestro trabajo, es realizar estudios de toxicidad subcrónica durante 90 días evaluando el efecto de la administración oral de SAC en dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg en diferentes grupos de ratas macho Wistar, mediante la determinación de citometría hemática, marcadores bioquímicos de daño renal, hepático, pancreático e histologías de riñón, hígado, pancreas, bazo, pulmón, corazón y cerebro.



V. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se ha demostrado que la SAC es eficaz como antioxidante, en diferentes modelos de daño, relacionados con enfermedades crónicas tales como cáncer, diabetes y enfermedades cerebrovasculares, entre otras (Herrera-Mundo *et al.*, 2009).

Para poder iniciar con los estudios clínicos, la duración de los estudios preclínicos debe ser igual o exceder la duración de los tratamientos que se llevarán a cabo en las pruebas clínicas. Además se debe de contar con estudios que prueben la seguridad del compuesto. En este sentido solo existe un estudio que evalúa la toxicidad de la SAC a corto plazo (1 mes), y que revela que su toxicidad es baja con dosis mayores a 500 mg/Kg y es similar a la de otros aminoácidos (Kodera *et al.*, 2002).

Debido a que se propone el uso de la SAC en el tratamiento de enfermedades crónicas, es necesario llevar a cabo estudios de toxicidad de larga duración.



VI. HIPÓTESIS

Se proponen las siguientes hipótesis

Ya que la DL_{50} de la SAC es alta y que efectos adversos se observan solo con dosis mayores a 500 mg/Kg después de 30 días de administración, es posible que al realizar una curva dosis respuesta después de su administración oral durante 90 días, se observen cambios con dosis altas en los siguientes parámetros:

1. Citometría hemática.
2. Marcadores bioquímicos de daño renal.
3. Marcadores bioquímicos de daño hepático.
4. Marcadores bioquímicos de daño pancreático.
5. Daño histológico.



VII. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el efecto tóxico de la administración oral de la SAC durante 90 días.

2. Objetivos particulares

Evaluar el efecto dosis respuesta de la administración oral de la SAC durante 90 días sobre:

- Citometría hemática.
- Marcadores bioquímicos de daño renal (nitrógeno de urea, creatinina y proteínas urinarias).
- Marcadores bioquímicos de daño hepático (triglicéridos, colesterol, transaminasas y fosfatasa alcalina en plasma).
- Marcadores bioquímicos de daño pancreático (glucosa en plasma).
- Daño histológico sobre riñón, hígado, páncreas, bazo, pulmón, corazón y cerebro.



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

El clorhidrato de L-cisteína, bromuro de alilo, el sodio y la albúmina sérica bovina (ASB) se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich Chemical Company (St Louis, Mo, EUA). El ácido tricloroacético, y el etanol absoluto se obtuvieron de Reactivos Química Meyer (Pampano, DF, México). La solución salina 0.9% se obtuvo de J. T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México) y el xilol se obtuvo de la casa comercial Golden Bell Reactivos (Cuenca, DF, México).

Para las determinaciones de glucosa (Kit 41011), triglicéridos (Kit 1001314), colesterol (Kit 41021), urea (Kit 1001333), creatinina (Kit 1001113), transaminasas (Kits AST 1001162 y ALT 1001172) y fosfatasa alcalina (Kit 1001132) se usaron Kits comerciales de SPINREACT, LAB CENTER DE MÉXICO.

2. Síntesis de la SAC

La síntesis química se llevó a cabo en un matraz de bola. Se colocaron 10.5 g de clorhidrato de L-cisteína monohidratada en 180 mL de etanol absoluto bajo condiciones de agitación constante. Al transcurrir 10 min se adicionaron 5.42 g de sodio metálico en diferentes porciones manteniendo una agitación vigorosa por 30 min a partir de la disolución total del sodio. A continuación se añadieron 5.4 mL de bromuro de alilo y la mezcla se mantuvo con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se le agregó agua fría (50 mL) y se continuó con la agitación durante 1 h. El etanol se evaporó por destilación a presión reducida y posteriormente se adicionaron 5.0 mL de ácido acético (pH final 5.6). El precipitado blanco formado se filtró al vacío y se dejó secar. Al compuesto obtenido se le midió el punto de fusión en un aparato Fisher-Johns y se comparó con el de un producto estándar (Maldonado *et al.*, 2003). En la Figura 7 se presenta un esquema del equipo usado para la síntesis química de la SAC.

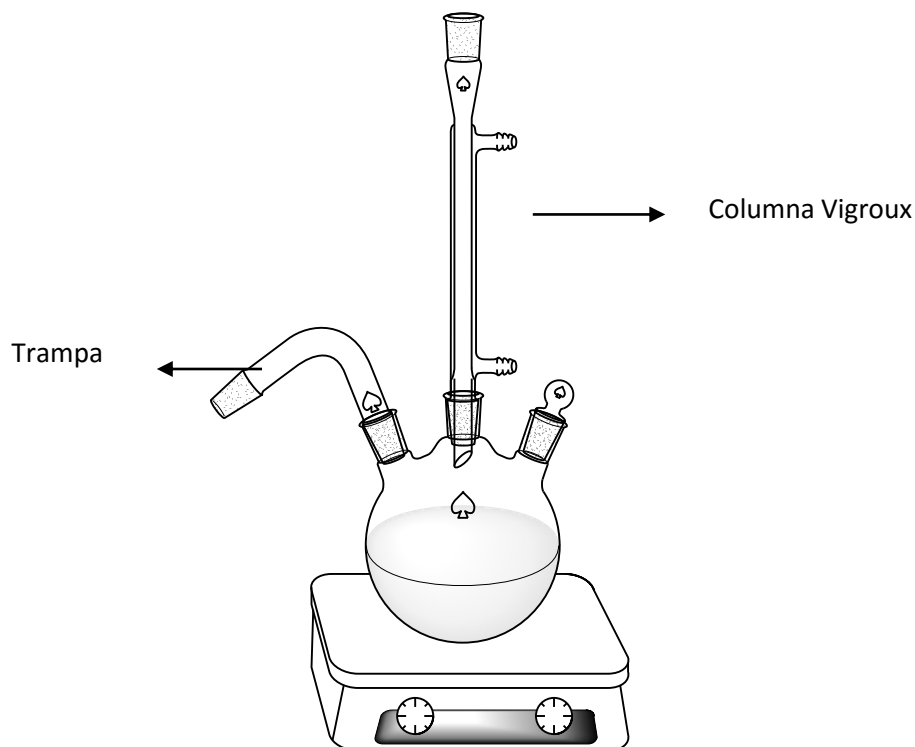


Figura 7. Esquema del equipo usado para la síntesis química de la SAC.

3. Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial entre 90 y 110 g, obtenidas de la Facultad de Medicina de la UNAM. Durante el experimento los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (5 animales por caja), con libre acceso a la comida (Laboratory rodent diet 5001) y agua *ad libitum*, los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50\pm 10\%$) y luz (ciclos 12 h luz/ 12 h oscuridad) constantes. Los animales de cada grupo se seleccionaron de manera aleatoria.

4. Esquema de administración de la SAC

Los animales se dividieron en 5 grupos:

- CT, grupo control.
- SAC 25, recibieron 25 mg/Kg de SAC.
- SAC 50, recibieron 50 mg/Kg de SAC.



- SAC 100, recibieron 100 mg/Kg de SAC.
- SAC 200, recibieron 200 mg/Kg de SAC.

Los animales del grupo control recibieron SSI 0.9% vía *i.g.* cada 24 h durante 90 días.

La SAC se administró vía *i.g.* cada 24 h durante 90 días con la dosis correspondiente a cada grupo.

El día 90 se llevó a cabo el sacrificio de los animales administrando por vía *i.p.* pentobarbital sódico (120 mg/Kg). Además se recolectaron muestras de orina, sangre y se extrajeron los diferentes órganos bazo, riñón, páncreas, hígado, pulmón corazón y cerebro.

5. Muestras

5.1 Orina

Se recolecto la orina de 24 h de los animales de cada grupo, usando jaulas metabólicas. Se midió el volumen urinario y la orina se congeló a -80°C hasta su uso.

5.2 Plasma

Se extrajo sangre por punción cardiaca, en un tubo que contenía heparina (5,000 UI/mL). La sangre se centrifugó a 835 g (Centrifuga eppendorf Modelo 5415D) durante 10 min a temperatura ambiente, el plasma resultante se separó y se congeló a -80°C hasta su uso.

5.3 Órganos

Los animales se perfundieron con 250 mL de SSI 0.9% con heparina fría (500 mL SSI + 2.5 mL heparina 5,000 UI/mL), seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% en amortiguador PBS. Los órganos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 h y se incluyeron en parafina.



5.4 Citometría hemática

La citometría hemática proporciona información sobre el número y características de las células de la sangre, los datos obtenidos pueden dividirse en tres grandes grupos o series hematopoyéticas: la serie roja, la serie blanca y la serie plaquetaria o trombocítica (Tabla 4).

De la sangre total obtenida por punción cardiaca de los diferentes grupos de animales, 3 mL se transfirieron a tubos con EDTA (BD Vacutainer) y se les realizó una dilución 1:10 antes de su estudio en el analizador hematológico.

El analizador hematológico utilizado (ADVIA 120, Siemens, Erlangen, Alemania) presenta tres sistemas analíticos:

- Un sistema de flujo con lámpara de diodo láser (para el canal de eritrocitos y plaquetas, el canal de lobularidad de basófilos y la determinación de reticulocitos).
- Un citómetro de flujo con lámpara de tungsteno (para el canal de peroxidasa)
- Un colorímetro (para la medición de la hemoglobina).

Mediante éstos, proporciona un hemograma completo y un recuento leucocitario diferencial con un recuento de reticulocitos automatizado por completo.

Se utilizan cuatro canales de medición independientes para determinar el hemograma y el recuento diferencial: 1) Canal para eritrocitos y plaquetas; 2) Canal para hemoglobina; 3) Canal para peroxidasa, y 4) Canal para lobularidad de basófilos para recuento leucocitario y datos diferenciales.

La hemoglobina se determina por el método de cianometahemoglobina modificado, que mide la absorbancia en una celda de flujo por colorimetría a 546 nm.

El método para los eritrocitos y plaquetas utiliza mediciones de dispersión óptica de la luz por citometría de flujo determinadas a medida que las células pasan a través de un flujo de corriente laminar por un ensamblaje óptico de láser. Estas células crean una dispersión frontal y ortogonal de la luz las cuales se detectan mediante



fotodetectores. La dispersión frontal de la luz (*forward scatter*) es un valor proporcional al volumen celular mientras que el ortogonal o lateral (*side scatter*) es un valor proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula. Este análisis bidimensional angular junto con una clasificación de esfericidad isovolumétrica permite trazar histogramas independientes del volumen eritrocitario y concentración de la hemoglobina, de igual manera permite una distinción entre las células plaquetarias, fragmentos de eritrocitos y eritrocitos pequeños. En consecuencia, las plaquetas más grandes pueden incluirse en el recuento. De las mediciones descritas derivan varios parámetros e índices. El volumen corpuscular medio (VCM) es la media del histograma del volumen eritrocitario. El hematocrito (HCT), la hemoglobina corpuscular media (HCM), y la concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM) se computan en forma matemática a partir de los valores de eritrocitos, hemoglobina y VCM.

Este equipo automatizado también determina el recuento leucocitario total y diferencial de seis componentes (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y células grandes no coloreadas [en inglés, *large unstained cells*, LUC]) por citoquímica y citometría de flujo óptica, utilizando los canales para peroxidasa y para lobularidad de basófilos, los cuales discriminan las poblaciones de la serie blanca basándose en el tamaño celular, la actividad de mieloperoxidasa y la densidad nuclear.



Tabla 4. Descripción de algunos de los parámetros que constituyen las diferentes series hematopoyéticas.

SERIE ROJA	SERIE BLANCA	SERIE TROMBOCITICA
<ul style="list-style-type: none">• Número de glóbulos rojos (HEM).• Hemoglobina (HGB).• Porcentaje de hematócrito (HCT).• Volumen corpuscular medio (VCM).• Hemoglobina corpuscular media (HCM).• Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).	<ul style="list-style-type: none">• Numero de globulos blancos• Recuento diferencial de globulos blancos:<ul style="list-style-type: none">• Neutrófilos o polimorfonucleares,• Linfocitos,• Monocitos,• Eosinófilos,• Basófilos,• Células grandes no coloreadas (LUC, en inglés Large Unstained Cells)	<ul style="list-style-type: none">• Número de plaquetas (PLQ)

Serie roja

Número de glóbulos rojos (HEM). Se mide en millones por microlitro.

Hemoglobina (HGB). Se mide en gramos por decilitro (g/dL) y representa la cantidad de esta proteína por unidad de volumen. Este parámetro se emplea para determinar si hay o no anemia.

Hematocrito (HCT). Se mide en porcentaje y representa la porción de eritrocitos en el total de la sangre. Se calcula a partir de la medición del número de eritrocitos y del volumen globular medio.

Volumen corpuscular medio (VCM). Se mide en femtolitros (fL) o micras cúbicas. Es de gran valor para establecer la causa de la anemia (macrocítica, normocítica o microcítica). Se calcula por el cociente entre el HCT multiplicado por 10 y el número de HEM en millones.

Hemoglobina corpuscular media (HCM). Se expresa en picogramos (pg) y representa la cantidad promedio de HGB en cada eritrocito. Los citómetros determinan este índice dividiendo la HGB entre el número de HEM y multiplicando el cociente por 10. Es útil en la determinación de hipocromía o normocromía.



Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Se expresa en g/dL y se obtiene de la siguiente ecuación:

$$CHCM \left(\frac{g}{dL} \right) = \frac{\text{Hemoglobina} \left(\frac{g}{dL} \right)}{\text{hematocrito}} \times 100$$

Serie blanca

Número de glóbulos blancos. Se mide en miles de millones por litro o miles por microlitro ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

Recuento diferencial de glóbulos blancos. Normalmente en la sangre periférica pueden encontrarse los siguientes tipos de leucocitos: neutrófilos o polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Se mide en miles de millones por litro o miles por microlitro ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

Serie trombocítica

Plaquetas. Se mide en miles de millones por litro o miles por microlitro ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

6. Marcadores de daño renal

6.1 Urea en plasma

La urea es un compuesto cristalino e incoloro que se encuentra abundantemente en los riñones y en la materia fecal. Es el principal producto terminal del metabolismo de las proteínas. El hígado es el único órgano donde la ureagénesis es completa y cuantitativamente importante. La deficiencia de alguna de las enzimas que interviene en el metabolismo de la urea provoca una acumulación anormalmente elevada de amoniaco en la sangre y en los tejidos. Puede aparecer la urea elevada en sangre en dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardiaca, hemorragias gástricas, hipovolemia y obstrucciones renales.



La urea presente en la muestra reacciona con la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de ésta en amoníaco y anhídrido carbónico. El amoníaco resultante de esta reacción se incorpora al α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa con oxidación paralela de NADH a NAD⁺. La disminución de la concentración de NAD⁺ en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada.

Para la medición se ajustó a 0 frente a agua destilada a una longitud de onda de 340 nm. Al estándar y a cada muestra se les agrego el reactivo de trabajo (amortiguador TRIS tris(hidroximetil)aminometano, pH 7.8, α -cetoglutarato, ureasa, glutamato deshidrogenasa, NADH). Las mediciones se llevaron a cabo a los 30 s y a los 90 s. El cálculo de la concentración de urea en la muestra se obtuvo dividiendo la diferencia de absorbancias a los diferentes tiempos de la muestra, entre la diferencia de absorbancias del estándar, el resultado de esta división se multiplicó por la concentración del estándar (50 mg/dL). El resultado se expresa en mg/dL.

6.2 Creatinina en plasma

La creatinina es un metabolito que deriva de la ciclación espontánea de la creatina del músculo que puede ser transformada en ATP. La producción de creatinina es proporcional a la masa muscular. Una característica importante es que su tasa de liberación al plasma es constante. Se elimina principalmente por filtración glomerular aunque una pequeña porción se excreta por el túbulo distal.

La creatinina en plasma se cuantificó con un método colorimétrico cinético basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino (reacción de Jaffe). El ácido pícrico en medio alcalino forma con la creatinina un tautómero de picrato de creatinina de color naranja rojizo que absorbe a 492 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Se ajustó la lectura a 0 con un blanco de agua. Se midió el estándar y las muestras a los 0, 30, 60 y 90 s. A la muestra y el estándar se les adicionó la mezcla de



reacción (ácido pícrico y NaOH 0.29 M 1:1 v/v). La cantidad de creatinina se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de absorbancia de la muestra (la lectura de 90 s menos la de 30 s) entre las absorbancias del estándar a los mismos tiempos multiplicado por la concentración del estándar (2 mg/dL). El resultado se expresa en mg/dL.

6.3 Proteínas urinarias

Proteínas incluyendo enzimas de bajo peso molecular (menos de 70 kDa) se filtran libremente por la membrana basal glomerular. Estas proteínas son reabsorbidas casi en su totalidad por las células tubulares proximales. La orina normal contiene pequeñas cantidades de proteínas. El aumento de proteínas en orina refleja daño glomerular y tubular. Las proteínas pueden aparecer en enfermedades renales, enfermedades cardíacas, etc.

La determinación cuantitativa de proteínas en orina se realizó por turbidimetría, el método se basa en la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético y la lectura fotométrica de la turbidez debida a la precipitación a 420 nm.

Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, 1 mL de orina diluida 1:5 (con SSI 0.9%) con 250 μ L de ácido tricloroacético 12.5% y se leyó la absorbancia a 420 nm. Se preparó un blanco para cada muestra que contenía 1 mL de orina diluida y 250 μ L de SSI. Se calibró a 0 con el blanco de cada muestra. Las absorbancias se interpolaron en una curva estándar de ASB (0.04-0.8 mg/mL). El resultado se expresó en mg/24 h.

7. Marcadores bioquímicos de daño hepático

7.1. Triglicéridos en plasma

Los triglicéridos son grasas cuya degradación suministra energía a la célula. Al igual que el colesterol, los triglicéridos son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre.



Su aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias, como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitus, pueden estar asociadas con su elevación.

La determinación cuantitativa de triglicéridos en la muestra se basa en una serie de reacciones enzimáticas sucesivas. Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado en presencia de glicerol cinasa para producir glicerol-3-fosfato y adenosina-5-difosfato. El glicerol-3-fosfato es entonces oxidado a dihidroxiacetona fosfato y a H_2O_2 por la enzima glicerol-3-oxidasa. Al final el H_2O_2 reacciona con 4-aminofenona y p-clorofenol, en una reacción que es catalizada por la peroxidasa dando una coloración roja. La intensidad del color es proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

La medición se realizó ajustando la lectura a 0 con un blanco de agua destilada. A cada muestra y al estándar se les adiciono la mezcla de reacción (amortiguador GOOD pH 7.5, p-clorofenol 2 mM, lipoproteinlipasa 150 000 U/L, glicerol cinasa 500 U/L, glicerol-3-oxidasa 3 500 U/L, peroxidasa 440 U/L, 4-aminofenona 0.1 mM y ATP 0.1 mM). La concentración del estándar con el que se trabajó fue de 200 mg/dL, la concentración de cada muestra se calculó dividiendo la absorbancia de la muestra entre la absorbancia del estándar y multiplicando el resultado por la concentración del estándar.

7.2. Colesterol en plasma

El colesterol forma parte de todas las células del organismo. Es un componente esencial para la estabilidad estructural y funcional de la membrana plasmática, es un precursor de los esteroides que cumplen importantes funciones fisiológicas, tales como ácidos biliares, hormonas esteroideas, vitamina D, etc. Además del colesterol exógeno procedente de la dieta que se absorbe en el tubo digestivo, todas las células del organismo pueden formar colesterol endógeno. Casi todo el colesterol endógeno que circula unido a lipoproteínas del plasma se sintetiza en el hígado. El aumento de colesterol en la sangre es uno de los principales factores de riesgo



cardiovascular. La hipercolesterolemia puede ser un efecto secundario de la diabetes o alteraciones hepáticas.

La determinación del colesterol se llevó a cabo mediante un método colorimétrico-cinético, el colesterol en sangre se encuentra esterificado con ácidos grasos. La primera parte del método consiste en obtener colesterol libre y ácidos grasos, mediante la enzima colesterol esterasa; posteriormente el colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa a colesteno y H_2O_2 . Se cuantifica el H_2O_2 por la reacción de Trinder donde reacciona con el fenol y la 4 aminofenazona dando una quinonimina, un compuesto colorido que absorbe a 505 nm. La absorción de la quinonimina es proporcional al colesterol presente en la muestra.

Para la cuantificación de colesterol se ajustó la lectura a 0 con un blanco de agua destilada. Al estándar y las muestras se les adiciono la mezcla de reacción (amortiguador PIPES ácido piperazina-N,N'-bis(2etaosulfónico) 90 mM (pH 6.9), fenol 26 mM, colesterol esterasa 300 U/L, colesterol oxidasa 300 U/L, peroxidasa 1250 U/L y 4-aminofenazona 0.4 mM/L). Para el cálculo de la concentración de colesterol en la muestra se dividió la absorbancia de la muestra entre la absorbancia del estándar, el resultado se multiplicó por la concentración del estándar (200 mg/dL). La cantidad de colesterol en la muestra se expresó en mg/dL.

7.3 Transaminasas

7.3.1 Aspartato aminotransferasa (AST)

Antes llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT), la AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células de músculo esquelético y en menores cantidades en otros tejidos.

Aunque un nivel alto de AST en el plasma no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT y ALP. También se emplea como control post-infarto en pacientes con desórdenes del músculo esquelético y otras afecciones.



La determinación cuantitativa se basa en que la AST cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada.

Para la medición se usó una longitud de onda de 340 nm y se ajustó a 0 frente a agua destilada. A cada muestra se le adiciono el reactivo de trabajo (amortiguador TRIS tris (hidroximetil)aminometano 80 mM (pH 7.8), lactato deshidrogenasa 800 U/L, malato deshidrogenasa (600 U/L), L-aspartato 200 mM, NADH 0.18 mM) y como sustrato α -cetoglutarato 12 mM. Se leyó la absorbancia inicial de la muestra (tiempo 0) y cada min durante 3 min. Se calculó el promedio del incremento de absorbancia por min ($\Delta A/\text{min}$) y se multiplicó por 1750, el resultado se expresó como unidades por litro de AST (U/L)

7.3.2 Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (TGP), es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón. Su mejor aplicación es en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Se observan niveles elevados en las enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades del músculo y traumatismos.

Cuando se emplea en conjunto con la AST ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la ALT se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de AST.

La determinación cuantitativa se basa en que la ALT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.



Para la medición se usó una longitud de onda de 340 nm y se ajustó a 0 frente a agua destilada. A cada muestra se le adiciono el reactivo de trabajo (amortiguador TRIS tris (hidroximetil)aminometano 100 mM (pH 7.8), lactato deshidrogenasa 1200 U/L, L-alanina 500 mM, NADH 0.18 mM) y como sustrato α -cetoglutarato 15 mM. Se leyó la absorbancia inicial de la muestra (tiempo 0) y cada min durante 3 min. Se calculó el promedio del incremento de absorbancia por min ($\Delta A/\text{min}$) y se multiplicó por 1750, el resultado se expresó como unidades por litro de ALT (U/L).

7.3.3 Fosfatasa alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra presente en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta su presencia en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tiene importancia clínica tanto su aumento como su disminución en el plasma.

Las causas más probables de aumento del nivel de ALP son la enfermedad de Paget, obstrucciones hepáticas, hepatitis, hepatotoxicidad por medicamentos y osteomalacia; mientras que las causas probables de disminución son cretinismo y déficit de vitamina C.

La determinación cuantitativa está basada en la hidrolisis de p-nitrofenilfosfato a pH 10.4 liberando p-nitrofenol y fosfato. La velocidad de formación del p-nitrofenol, es proporcional a la concentración de ALP en la muestra ensayada.

La longitud de onda usada fue de 405 nm y se ajustó a cero frente a agua destilada. A cada muestra se le adicionó el reactivo del trabajo (dietanolamina 1 mM (pH 10.4), cloruro de magnesio 0.5 mM) y como sustrato p-nitrofenilfosfato 10 mM. Después de incubar durante 1 min el reactivo de trabajo con la muestra se leyó la absorbancia inicial y la de cada min durante 3 min. Se calculó el promedio del incremento de absorbancia por min ($\Delta A/\text{min}$) y se multiplicó por 3300, el resultado se expresó como unidades por litro de ALP (U/L).



8. Marcadores de daño pancreático

8.1. Glucosa

La glucosa es la mayor fuente de energía en las células del organismo, la insulina facilita su entrada en las células. Es un marcador de cambios en las células o de cambios en la función celular.

La determinación de la glucosa se llevó a cabo mediante un método colorimétrico-cinético. Este método se basa en el uso de dos enzimas, la glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de la glucosa a gluconato y H_2O_2 , el cual reacciona con fenol y 4-aminofenazona gracias a la peroxidasa dando una quinona colorida que absorbe a 505 nm. La absorción de la quinona es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

Para la cuantificación de glucosa se ajustó la lectura a 0 con un blanco de agua destilada. Al estándar y las muestras se les adicionó la mezcla de reacción (amortiguador TRIS, tris (hidroximetil)aminometano 92 mM (pH 7.4), fenol 0.3 mM, glucosa oxidasa 1500 U/L, peroxidasa 1000 U/L y 4-aminofenazona 2.6 mM). Para el cálculo de la concentración de glucosa en la muestra se dividió la absorbancia de la muestra entre la absorbancia del estándar y el resultado se multiplicó por la concentración del estándar (100 mg/dL). La cantidad de glucosa en la muestra se expresó como mg/dL.

9. Análisis histológico

Los órganos en p-paraformaldehído 4%, se incluyeron en bloques de parafina; para ello, se colocaron dentro de cassettes y se pasaron por los siguientes disolventes (Tabla 5):



Tabla 5. Disolventes para incluir órganos

Disolvente	Tiempo
Agua corriente	15 min
Alcohol 60°	30 min
Alcohol 70°	30 min
Alcohol 80°	30 min
Alcohol 96° I	30 min
Alcohol 96° II	30 min
Alcohol 100° I	30 min
Alcohol 100° II	24 h
Alcohol-Xilol	30 min
Xilol I	30 min
Xilol II	30 min
Parafina I*	1 h
Parafina II*	1 h

Después de estar en parafina II los órganos se incluyeron en cubos de parafina.

Se usó un micrótopo para hacer cortes de 5 µm de espesor, que se fijaron en un portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE).

Para la tinción, los cortes se desparafinaron con dos lavados de xilol y se rehidrataron con lavados de alcohol de concentración creciente hasta llegar a agua, los tejidos se tiñeron con hematoxilina y se lavaron con abundante agua y con una solución de HCl al 1% en etanol al 70%, se viró la hematoxilina con LiCO₃ al 1%, se pasó por alcohol al 70% y se hizo la tinción con eosina, por último se hicieron lavados con etanol y finalmente se colocó en xilol.

Este tipo de tinción se utiliza para poner en evidencia las características estructurales de las células.

Los cortes se observaron con un microscopio Nikon (microscopio ECLIPSE E200 MV series)



10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism versión 5.3 (Graph pad). Para encontrar si había diferencia significativa entre las mediciones de cada uno de los marcadores bioquímicos evaluados se usó la prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett. Los resultados se expresaron como la media \pm EEM. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo en ambas pruebas.



IX. RESULTADOS

1. Peso corporal

El peso corporal de los animales no se alteró por la administración de la SAC a lo largo del tratamiento, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos tratados con SAC (Figura 8).

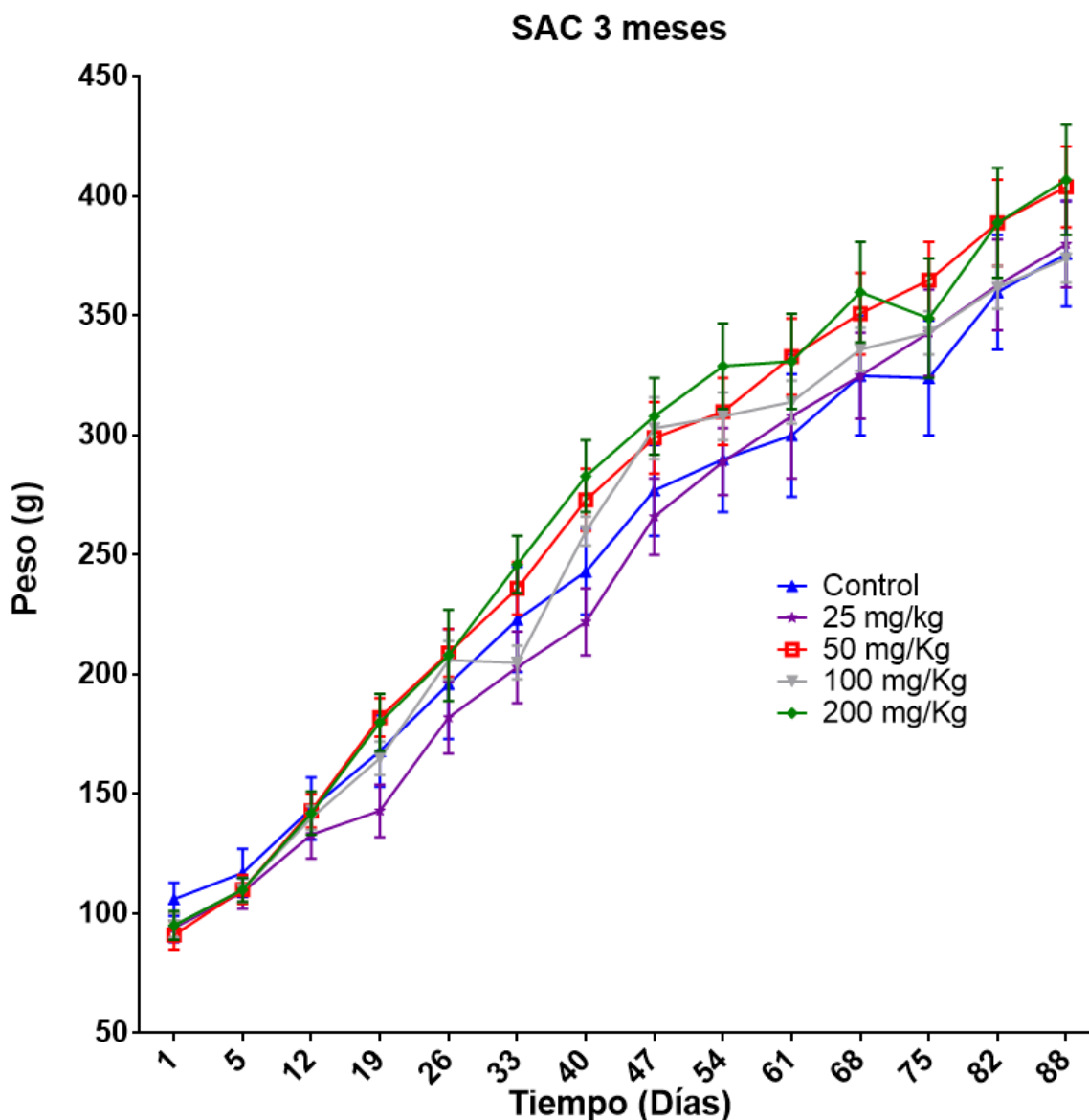


Figura 8. Efecto de la SAC sobre el peso corporal en gramos de los animales por grupo a lo largo del protocolo. CT, grupo control y grupos administrados con SAC (25, 50, 100 y 200 mg/Kg de peso) Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. n= 5-8



2. Citometría hemática

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la citometría hemática de la serie roja, trombocítica y serie blanca. No se observaron diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con SAC.

Tabla 6. Efecto de la SAC sobre los parámetros de la serie roja, trombocítica y serie blanca

SERIE ROJA Y TROMBOCÍTICA					
	Control	25 mg/Kg	50 mg/Kg	100 mg/Kg	200 mg/Kg
N	5	8	7	7	5
GR/μL (X10⁷)	6.65 ± 2.26	4.26 ± 1.46	4.80 ± 1.69	4.65 ± 1.59	6.82 ± 1.80
HB (g/dL)	118.40 ± 40.50	78.88 ± 27.37	88.14 ± 30.49	84.0 ± 28.66	124.8 ± 33.32
% HCT	46.08 ± 15.98	29.1 ± 9.533	32.3 ± 10.81	30.89 ± 10.06	47.87 ± 12.96
VCM (fL)	71.82 ± 3.412	72.09 ± 1.856	71.93 ± 2.304	70.23 ± 1.973	71.97 ± 2.76
HCM (pg)	18.04 ± 0.4	18.29 ± 0.34	18.69 ± 0.42	17.9 ± 0.26	18.2 ± 0.29
CHCM (g/dL)	25.24 ± 0.79	25.5 ± 0.76	26.11 ± 0.65	25.61 ± 0.79	25.48 ± 0.96
PLQ/μL (X10⁶)	4.088 ± 1.76	2.86 ± 1.11	3.46 ± 1.34	2.68 ± 1.13	3.55 ± 1.48

SERIE BLANCA					
	Control	25 mg/Kg	50 mg/Kg	100 mg/Kg	200 mg/Kg
LEU/μL	28560 ± 15782	21375 ± 8219	22871 ± 8889	26829 ± 10827	26280 ± 14384
NEUT/μL	2440 ± 816.5	1650 ± 336.5	1743 ± 475.5	2500 ± 837.8	1800 ± 673.8
LINF/μL	12680 ± 7299	12700 ± 5610	12771 ± 5498	12900 ± 5440	17250 ± 7643
MONO/μL	11900 ± 8218	5125 ± 1526	6586 ± 2352	9343 ± 4439	7520 ± 3573
EOS/μL	600 ± 154.9	625 ± 235.1	371 ± 99.32	657.1 ± 177.1	583.3 ± 212
BASO/μL	40 ± 24.49	37.5 ± 18.3	42.86 ± 20.2	42.86 ± 20.2	60.0 ± 40.0

Serie roja y trombocítica: GR glóbulos rojos; Hb hemoglobina; % HCT porcentaje de hematocrito; VCM volumen corpuscular medio; HCM hemoglobina corpuscular media; CHCM concentración de hemoglobina corpuscular media; PLQ plaquetas. Serie Blanca: LEU leucocitos; Neut neutrófilos; Linf linfocitos; Mono monocitos; Eos eosinófilos; Baso Basófilos. Los datos se presentan como media ± EEM. n= 5-7.



3. Marcadores bioquímicos de daño renal

3.1 Nitrógeno de urea (BUN)

Los resultados de nitrógeno de urea se presentan en la Figura 9, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con SAC y el grupo control.

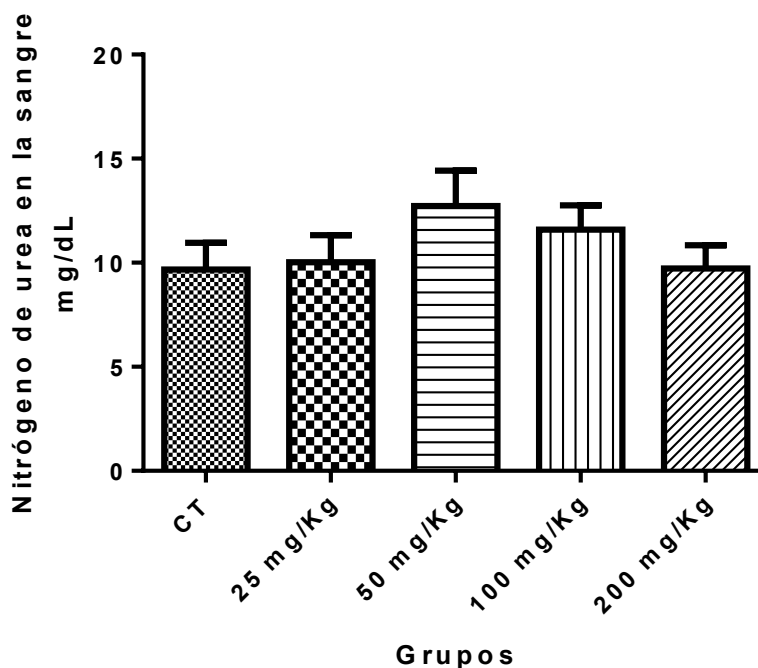


Figura 9. Efecto de la SAC sobre los niveles de nitrógeno en plasma en los grupos control (CT) y administrados con SAC 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=10-16.



3.2 Creatinina en plasma

No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con SAC y el grupo control para los resultados de creatinina en plasma (Figura 10).

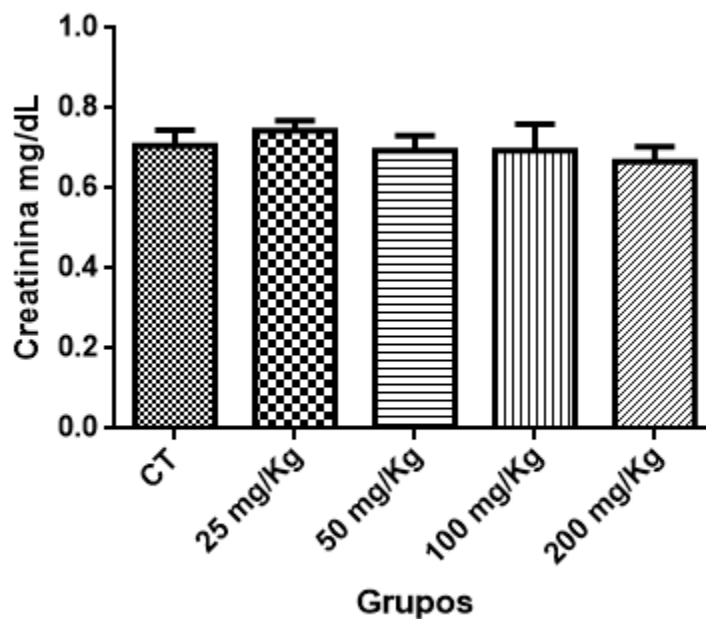


Figura 10. Efecto de la SAC sobre los niveles de creatinina en plasma en el grupo control (CT) y los grupos administrados con SAC 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Los datos se presentan como media \pm EEM. El número de muestras para la determinación de creatinina en plasma fue n=10-16.



3.3 Proteínas urinarias

La SAC administrada provocó una disminución en el nivel de proteínas excretadas en orina durante 24 h del grupo de 200 mg/Kg. Los grupos tratados con las dosis de 25, 50 y 100 no presentaron diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (Figura 11).

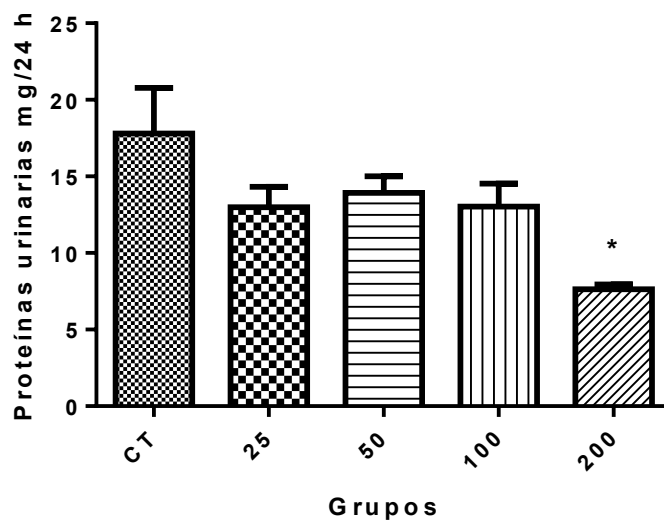


Figura 11. Efecto de la SAC sobre la excreción de proteínas urinarias (mg) durante 24 h en los grupos control (CT), y administrados con SAC 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Los datos se presentan como la media \pm EEM. $n=3-4$. * $p<0.05$ contra el grupo CT.



4. Marcadores bioquímicos de daño hepático

4.1 Triglicéridos y colesterol en plasma

No se observó diferencia significativa entre el grupo control y los grupos con el tratamiento de SAC en la medición de triglicéridos (Figura 12 A) y colesterol en plasma (Figura 12 B).

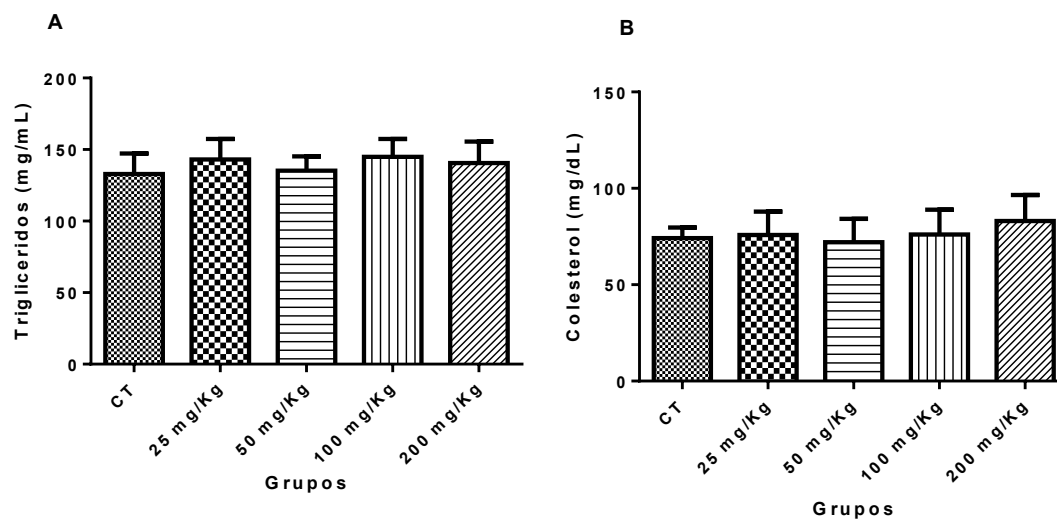


Figura 12. Efecto de la SAC sobre la concentración de triglicéridos (A) y colesterol (B) en plasma en los grupos control (CT) y administrados con SAC 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Los datos se presentan como la media \pm EEM. n=10-16.



4.2 Transaminasas y fosfatasa alcalina

No se pudo cuantificar la actividad de ALT y AST en ninguno de los grupos estudiados, sólo se pudo cuantificar la actividad de la ALP y no se observaron cambios estadísticamente significativos en los grupos (Figura 13).

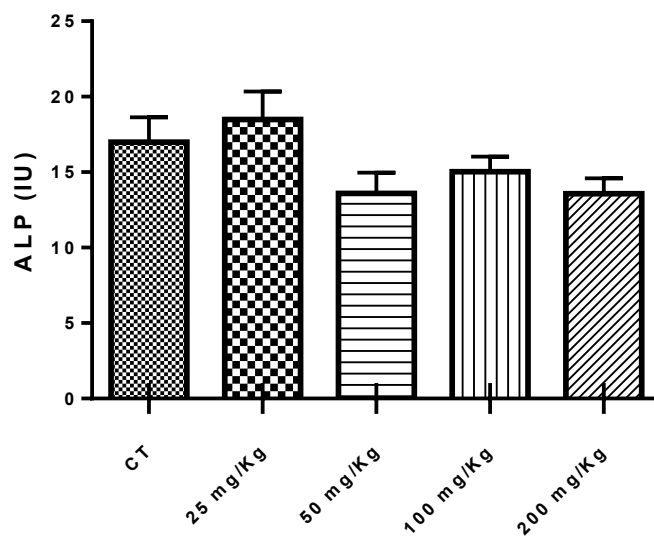


Figura 13. Efecto de la SAC sobre los niveles de fosfatasa alcalina en plasma, en los grupos control (CT) y administrados con SAC 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Los datos se presentan como la media \pm EEM. n=9-15.



5. Marcadores bioquímicos de daño pancreático

5.1 Glucosa en plasma

La glucosa en plasma no se afectó después del tratamiento con SAC, ya que no se observó diferencia significativa entre el grupo control y los grupos administrados con SAC (Figura 14).

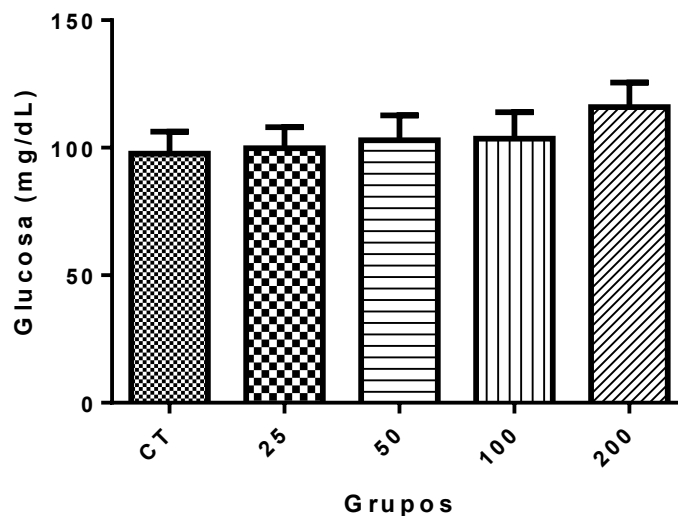


Figura 14. Efecto de la SAC sobre los niveles de glucosa en plasma en los grupos control (CT) y administrados con SAC 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Los datos se presentan como media \pm EEM. El número de muestras por grupo CT, 25, 50, 100 y 200 mg/Kg es 10, 25, 16, 14, 13 y 15, respectivamente.



6. Análisis histológico

6.1. Riñón

No se observó daño histológico en los glomérulos ni en los túbulos renales de los animales tratados con ninguna de las dosis de SAC. Los componentes celulares son muy similares de los animales del grupo control. Se presentan imágenes representativas del grupo control y del grupo 200 mg/Kg (Figura 15).

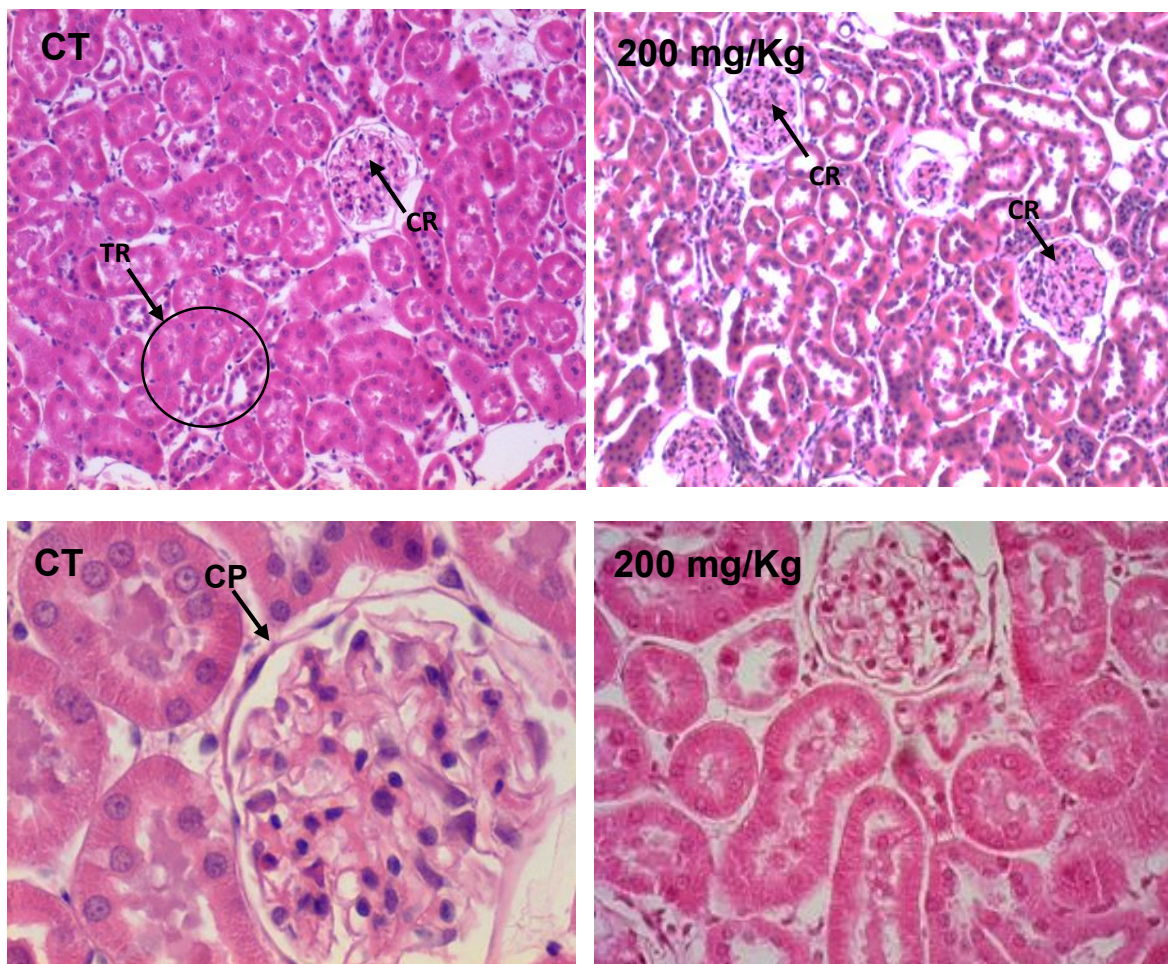


Figura 15. Efecto de la SAC sobre las alteraciones morfológicas en cortes histológicos de riñón del grupo control (CT) y del grupo tratado con SAC 200 mg/Kg. Microscopía de luz, panel superior 10X y panel inferior 40X. Tinción de hematoxilina y eosina. Se señalan las siguientes estructuras: Corpúsculo renal (CR), Túbulos renales (TR) y Capa parietal de la cápsula de Bowman (CP).



6.2 Hígado

En la tabla 7 se presenta el número de órganos que presentaron esteatosis y cambio en la estructura celular, en la Figura 16 se presentan imágenes representativas del grupo control y del grupo tratado con SAC 200 mg/Kg.

Tabla 7. Cantidad de órganos tratados y número de órganos que presentaron daño histológico según la dosis administrada.

Control		25 mg/Kg		50 mg/Kg		100 mg/Kg		200 mg/Kg	
# de órganos	con daño	# de órganos	Con daño	# de órganos	con daño	# de órganos	con daño	# de órganos	Con daño
3	0	4	0	5	0	4	1	4	1

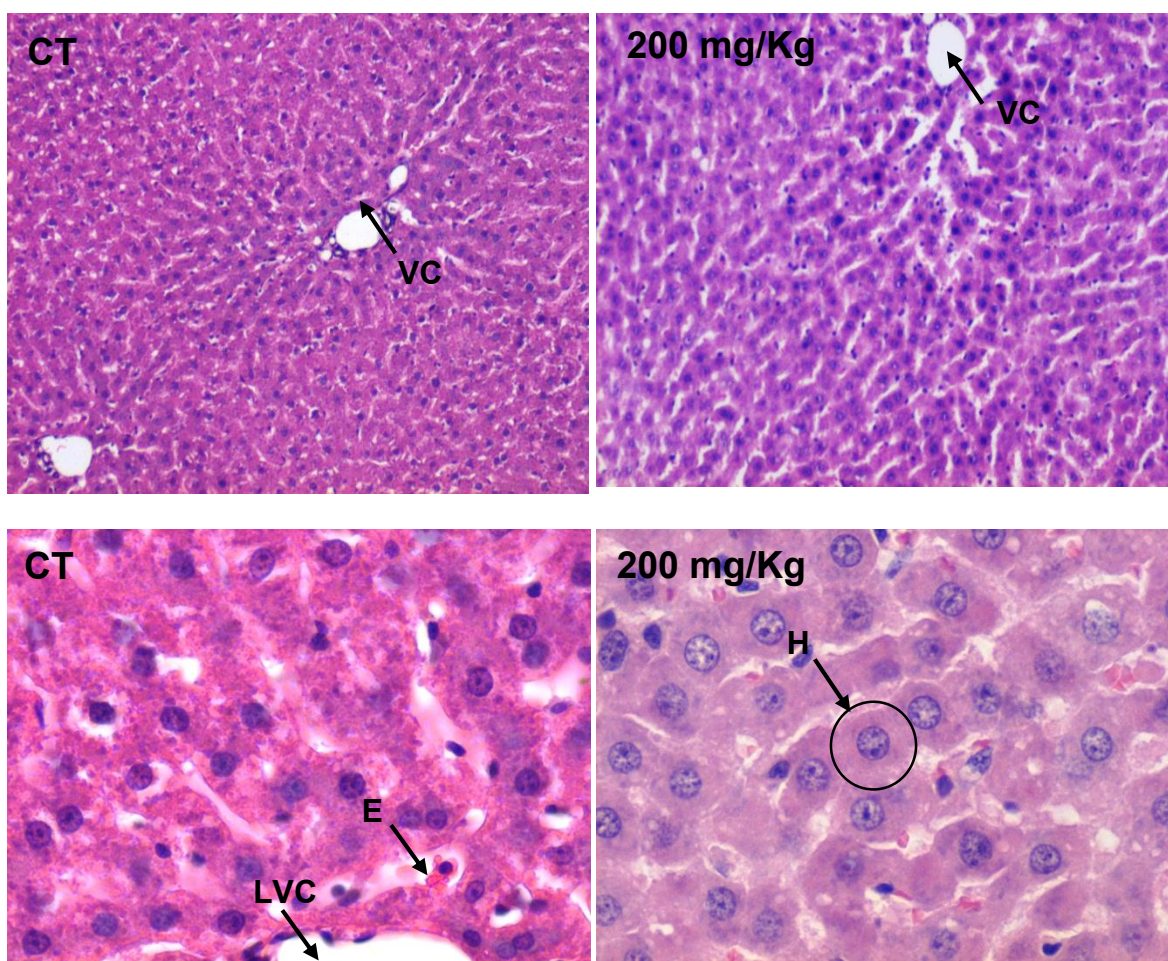


Figura 16. Efecto de la SAC sobre las alteraciones morfológicas en cortes histológicos de hígado del grupo control (CT) y grupo tratado con SAC de 200 mg/Kg tinción de hematoxilina y eosina. Microscopía de luz, panel superior 10X, panel inferior 40X. Se señalan las siguientes estructuras: Vena central del lóbulo hepático (VC), Lumen de la vena central (LVC), Eritrocitos en el sinusoides hepático (E) y Hepatocito (H).



En la Figura 17 se presenta una imagen representativa de uno de los hígados con esteatosis del grupo de 200 mg/Kg

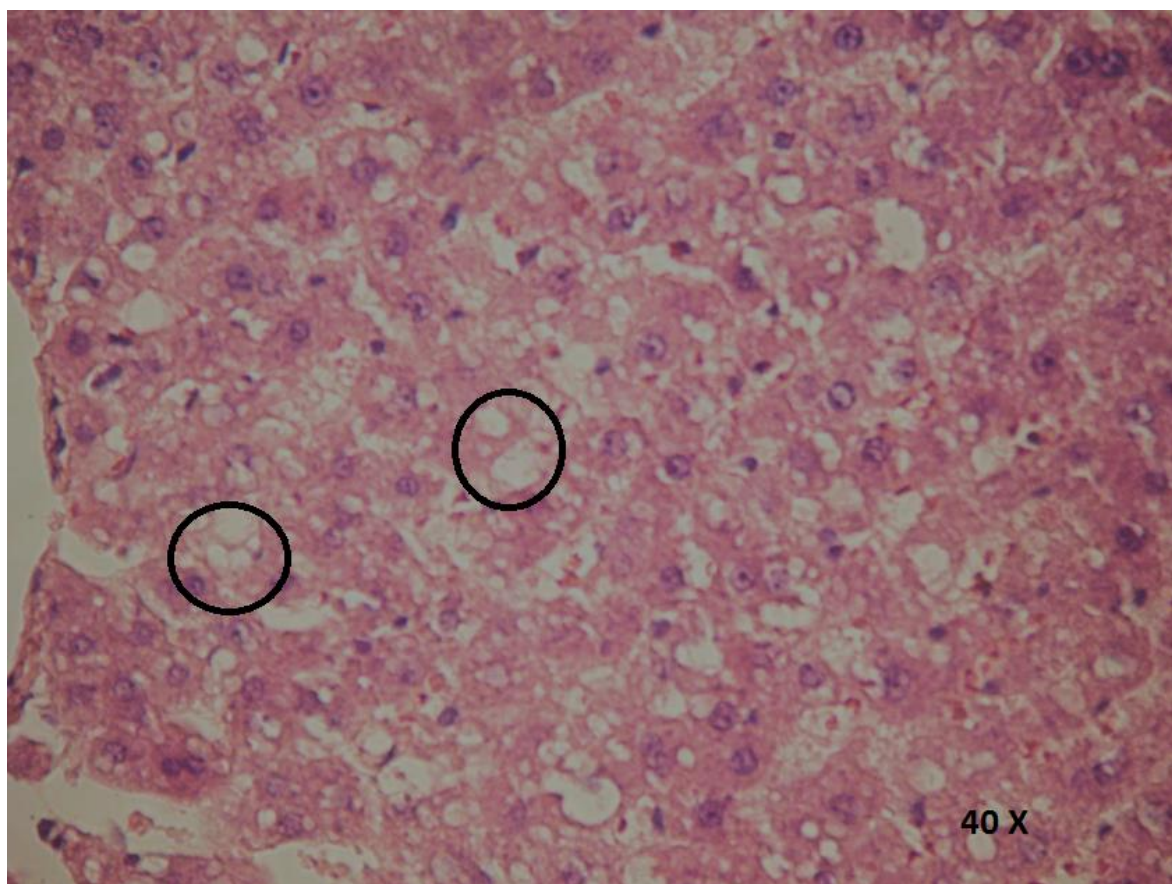


Figura 17. Efecto de la SAC sobre la alteración morfológica en corte histológico de hígado del grupo tratado con SAC de 200 mg/Kg, tinción de hematoxilina y eosina. Microscopía de luz, 40X. Se señalan las vacuolas asociadas a esteatosis con círculos.



6.3 Páncreas

No se observó daño en los cortes histológicos de páncreas de los grupos tratados con SAC y el grupo control. En la Figura 18 se presentan imágenes representativas del grupo control y del grupo tratado con SAC (200 mg/Kg).

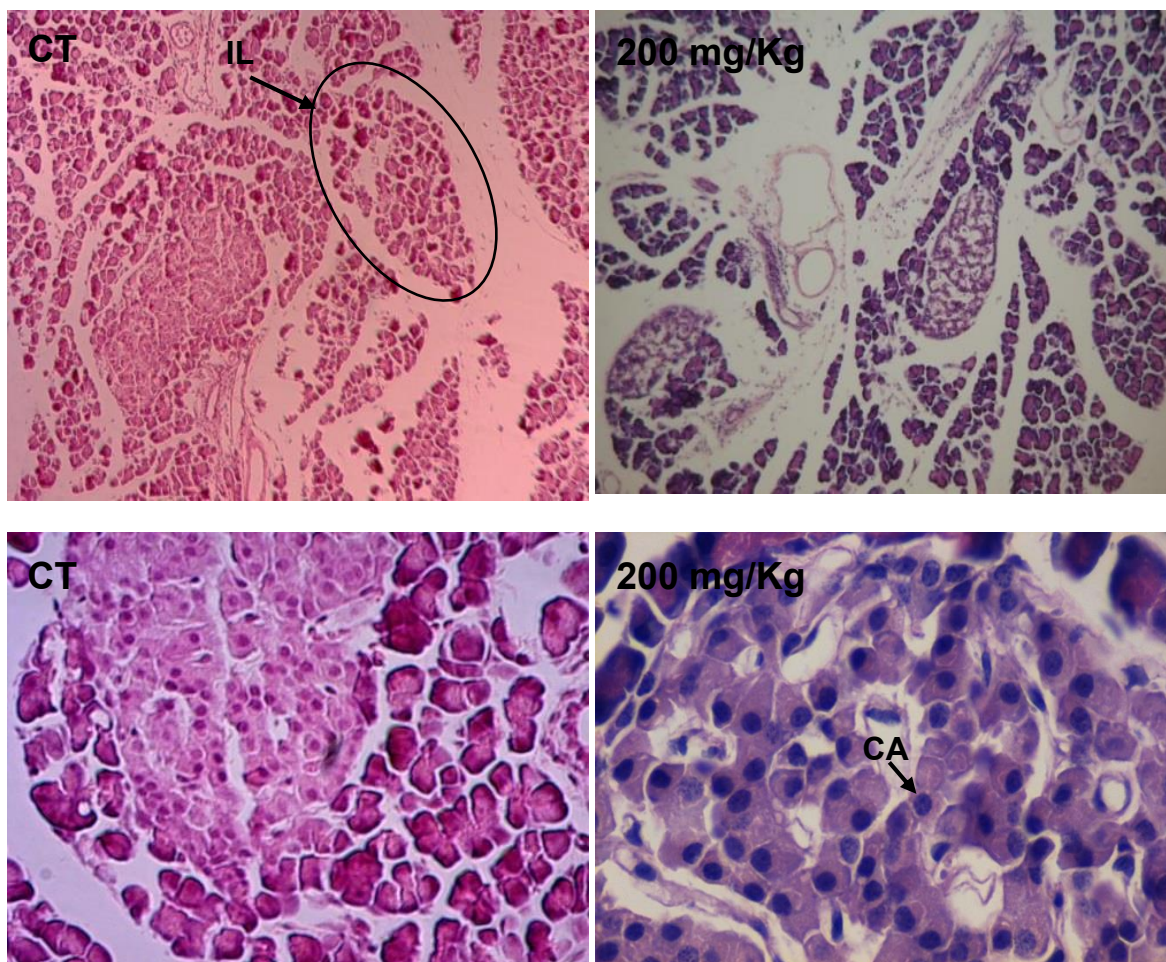


Figura 18. Efecto de la SAC sobre cortes histológicos de las alteraciones morfológicas en páncreas del grupo control (CT) y del grupo tratado con SAC 200 mg/Kg. Microscopia de luz panel superior 10 X, panel inferior 40X, tinción de hematoxilina y eosina. Se señalan las siguientes estructuras Células acinares serosas del páncreas exocrino (CA) e Islotes de Langerhans (IL) páncreas endocrino.



6.4 Bazo

No se observó daño en el bazo en los grupos tratados con SAC y del grupo control. En la Figura 19 se observan imágenes representativas del grupo control y el grupo de 200 mg/Kg, se señala la pulpa roja y la pulpa blanca.

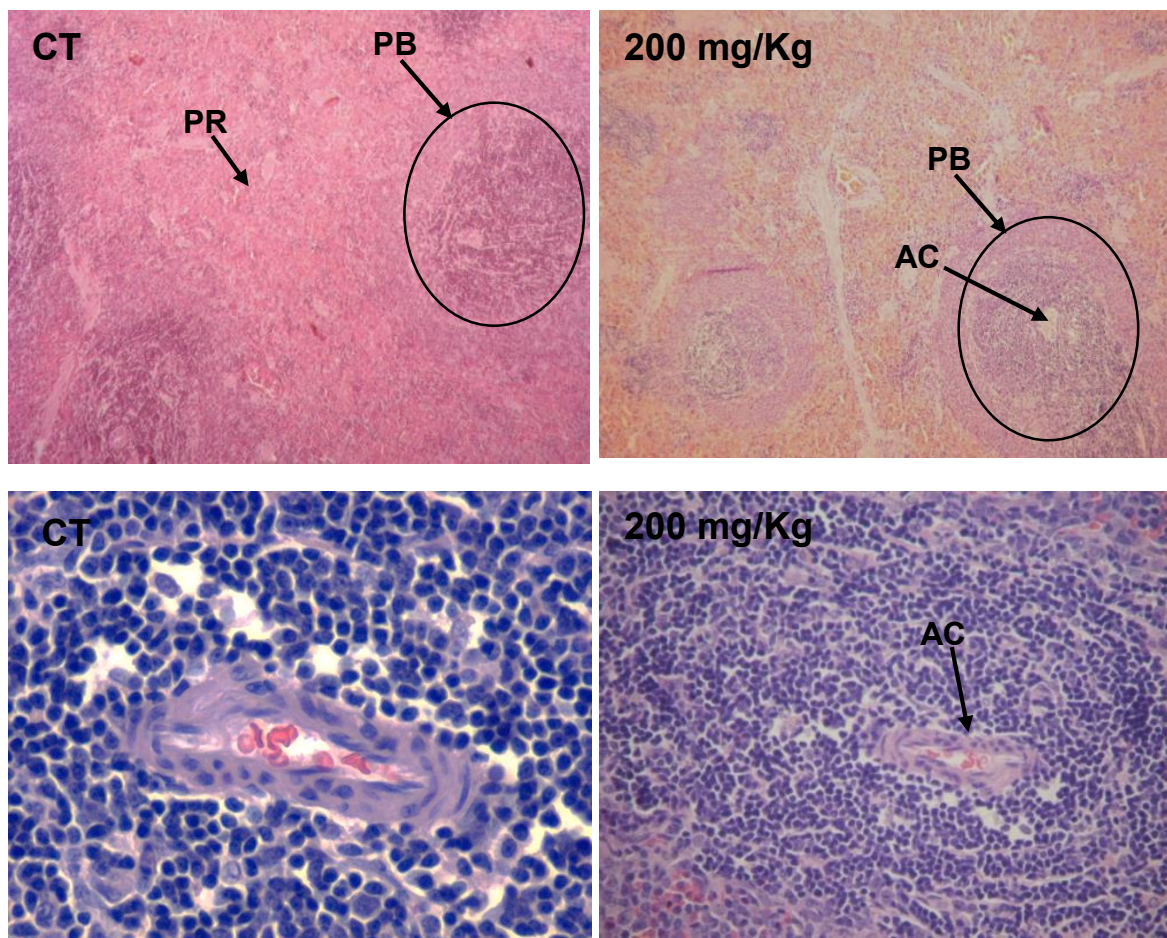


Figura 19. Efecto de la SAC sobre las alteraciones morfológicas en cortes histológicos de bazo, del grupo control (CT) y del grupo tratado con SAC 200 mg/Kg. Microscopia de luz, panel superior 10X, panel inferior 40X, tinción de hematoxilina y eosina. Se señalan las siguientes estructuras: pulpa roja (PR), pulpa blanca (PB), arteria central (AC).



6.5 Pulmón

En la tabla 8 se presenta el número de micrografías que presentaron infiltración de macrófagos alveolares y engrosamiento de la pared alveolar, en la Figura 20 se presentan imágenes del grupo control y del grupo de 200 mg/Kg sin daño.

Tabla 8. Cantidad de órganos tratados y número de órganos que presentaron daño histológico (infiltración de macrófagos alveolares y engrosamiento de la pared alveolar) según la dosis administrada.

control		25 mg/Kg		50 mg/Kg		100 mg/Kg		200 mg/Kg	
# de órganos	con daño	# de órganos	Con daño	# de órganos	con daño	# de órganos	con daño	# de órganos	Con daño
2	0	3	0	5	1	4	0	4	2

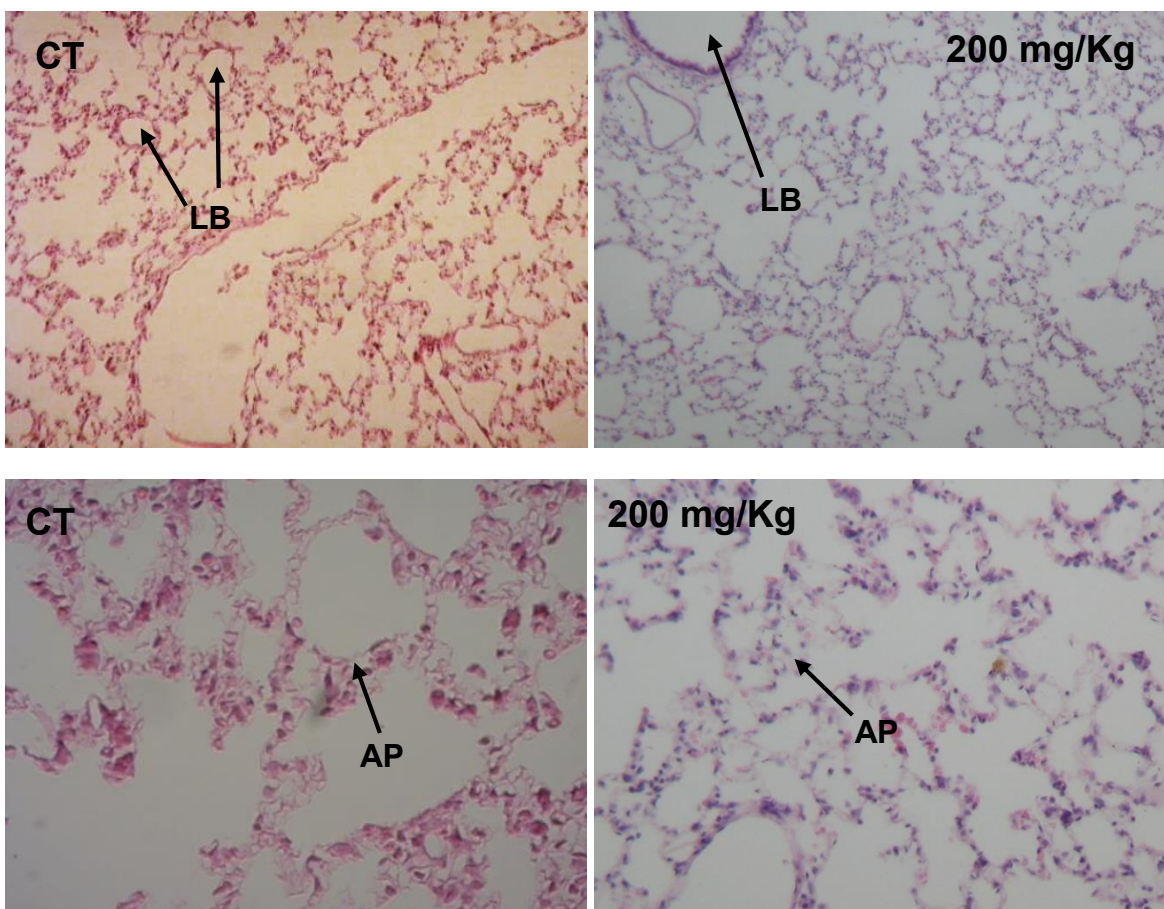


Figura 20. Efecto de la SAC sobre las alteraciones morfológicas en cortes histológicos de pulmón del grupo control (CT) y del grupo tratado con SAC 200 mg/Kg. Microscopia de luz, panel superior 10X, panel inferior 40X, tinción de hematoxilina y eosina. Se señalan las siguientes estructuras: lumen del bronquiolo (LB) y alveolo pulmonar (AP).



En la Figura 21 se observa un corte histológico de pulmón con engrosamiento de paredes alveolares e infiltración de macrófagos alveolares.

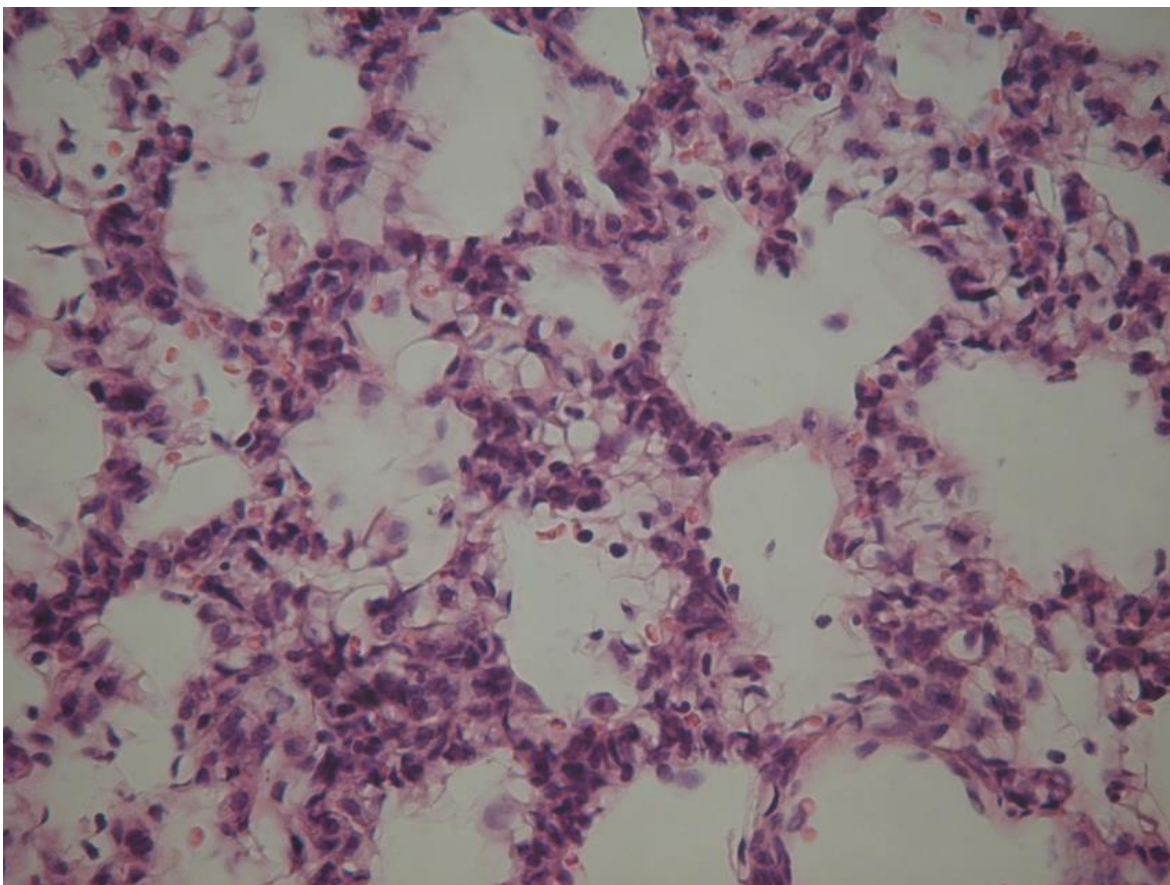


Figura 21. Cortes histológicos de pulmón, engrosamiento de paredes alveolares.grupo 200 mg/Kg, 40X, tinción de hematoxilina y eosina.



6.6 Corazón

No se observó daño en el tejido cardíaco en ninguno de los grupos tratados con SAC. En la Figura 22 se muestran imágenes representativas del grupo control y del grupo de 200 mg/Kg.

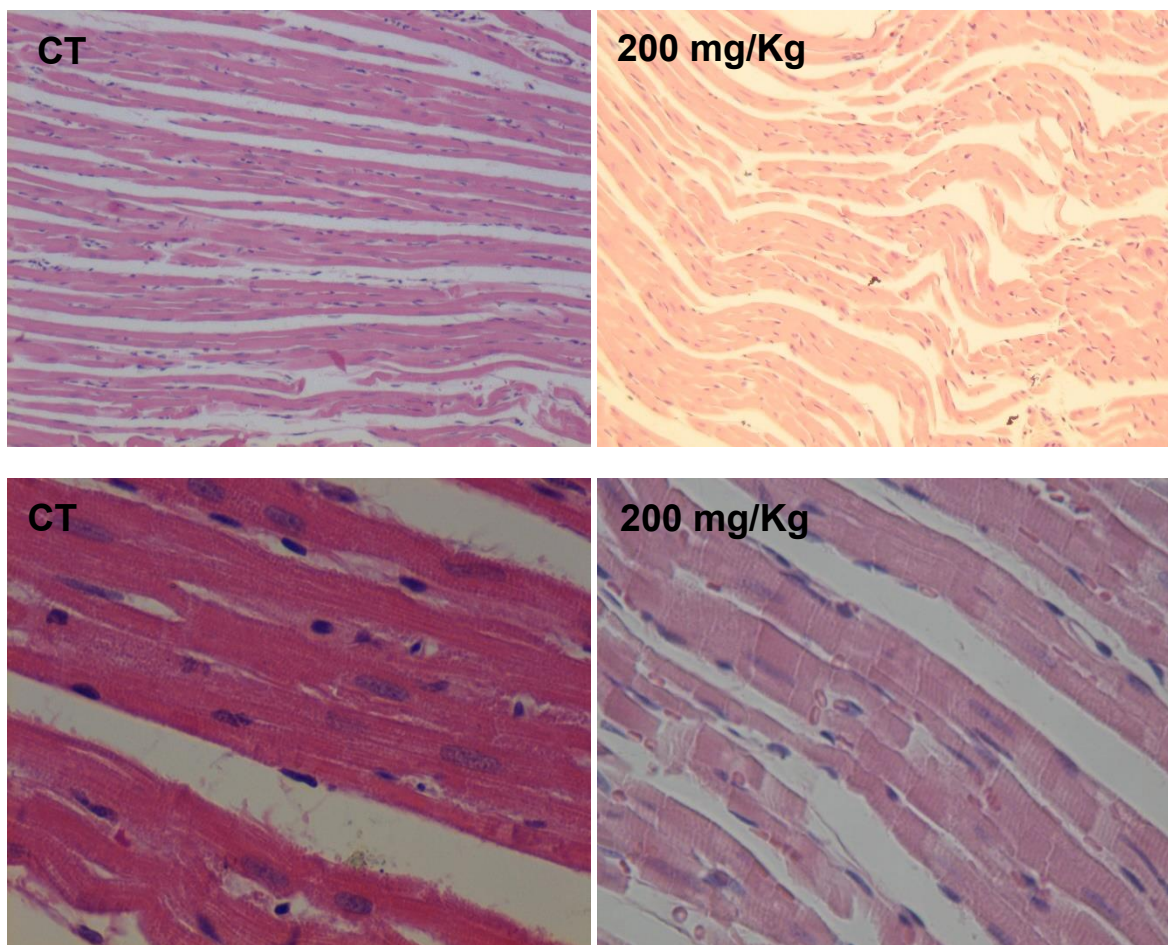


Figura 22. Efecto de la SAC sobre las alteraciones morfológicas en cortes histológicos de corazón, del grupo control (CT) y del grupo de 200 mg/Kg. Microscopia de luz, panel superior 10X, panel inferior 40X, tinción de hematoxilina y eosina. Se observan fibras cardíacas.



6.7 Cerebro

No se observó daño histológico en corteza frontal del cerebro en los grupos tratados con SAC, en la Figura 23 se presentan imágenes representativas del grupo control y del grupo de 200 mg/Kg.

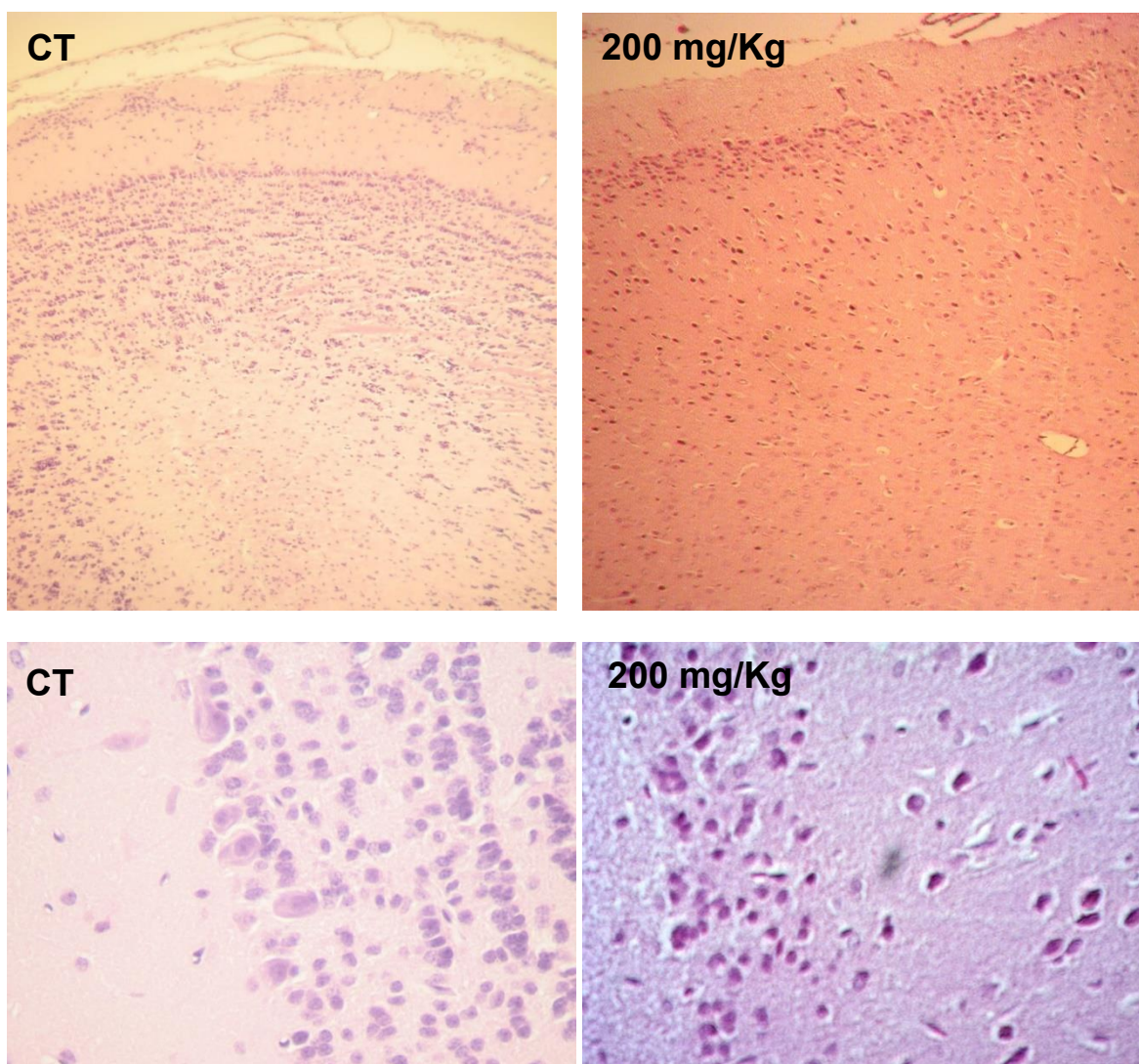


Figura 23. Efecto de la SAC sobre las alteraciones morfológicas en cortes histológicos de corteza frontal cerebral, del grupo control (CT) y del grupo tratado con SAC 200 mg/Kg. Microscopia de luz, panel superior 10X, panel inferior 40X, tinción de hematoxilina y eosina.



X. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el efecto tóxico de la administración subcrónica de la SAC en ratas macho Wistar, con el fin de proporcionar información sobre la función de este compuesto como antioxidante directo e indirecto considerando que el efecto protector de la SAC ha sido demostrado en diferentes modelos experimentales de daño renal, neurotóxico, hepatotóxico y de enfermedades crónico-degenerativas (Herrera-Mundo *et al.*, 2009)

Hasta ahora el único trabajo de investigación que ha evaluado el efecto tóxico de la SAC se realizó mediante esquemas de administración agudos y subagudos (Kodera *et al.*, 2002) por otro lado en general los estudios que evalúan el efecto protector de la SAC emplean dosis menores a 300 mg/Kg, y la administración de la SAC se realiza de forma previa (revisado en Pérez-Severiano *et al.*, 2004a); en este trabajo se evaluó el efecto tóxico de una dosis de 25 a 200 mg/Kg de SAC en un periodo de duración de 90 días, con el fin de demostrar que es posible su uso como un posible agente terapéutico en enfermedades crónicas, como las enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que la SAC es un antioxidante efectivo y seguro en modelos animales (Padmanabhan y Prince, 2006); por ello podría resultar una valiosa herramienta y un agente potencialmente terapéutico para contrarrestar los eventos perjudiciales de eventos como las enfermedades neurodegenerativas (García *et al.*, 2014).

En este trabajo no se encontraron cambios significativos en los diferentes parámetros cuantificados en la citometría hemática, en otro estudio (Kodera *et al.*, 2002) en donde se evaluaron dosis de 250, 500, 1000 y 2000 mg/Kg se observó la disminución del hematocrito, la hemoglobina, el volumen corpuscular promedio, la hemoglobina corpuscular promedio y la concentración corpuscular de la hemoglobina en ambos géneros de ratas Wistar aunque estos efectos sólo se observaron dosis mayores a 500 mg/Kg.



Por otro lado, los resultados de nuestro trabajo revelan una disminución en la cantidad de proteínas urinarias excretadas en 24 h, lo cual podría sugerir un incremento en la función renal y en el número de células renales como ya se había observado a dosis mayores y en menor tiempo de tratamiento según Kodera y colaboradores (2002). Por otro lado, los marcadores de BUN no presentaron cambios en las dosis empleadas al igual que en el estudio mencionado anteriormente.

En la medición de la actividad enzimática de ALT y AST se esperaba no observar diferencias significativas con respecto al grupo control al igual que se observó en la medición de la actividad enzimática de la ALP (Kodera *et al.*, 2002); sin embargo, la metodología empleada en la medición de las enzimas ALT y AST no permitió detectar su actividad en este trabajo, esto podría deberse a fallas en el método empleado como el que los tiempos empleados para la determinación debieron ser menores o se debió usar mayor cantidad de muestra.

En otros estudios se ha observado que con dosis altas de SAC (mayores a 500 mg/Kg) se induce una atrofia en el páncreas, la disminución de la secreción de insulina y no hubo cambios en los niveles de glucosa (Kodera *et al.*, 2002); además, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa y en los cortes histológicos del páncreas no se observó ningún tipo de daño.

En dos de los cortes histológicos del hígado de los grupos tratados con las dosis más altas (100 y 200 mg/Kg) se observó la formación de vacuolas (esteatosis); estas vacuolas podrían ser debidas al glucógeno en los hepatocitos o a las vías biliares causadas por la acumulación de lípidos. La presencia de lípidos está asociada con factores nutricionales o fuentes extra hepáticas, desordenes metabólicos o por daño tóxico. Para poder distinguir entre los lípidos que causan las vacuolas se pueden usar tinciones para fosfolípidos con la de Sudan negro o el rojo oleoso (Faqui, 2013); sin embargo, existe un estudio en el que después de la administración oral de la SAC con una dosis de 200 mg/Kg durante 20 semanas (140 días) no se observaron



cambios en las histologías de hígado (Sundaresan y Subramanian, 2008). Adicionalmente, las histologías obtenidas se reanalizaron por el Dr. Rogelio Hernández Pando, Coordinador de la Unidad de Patología Experimental en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, que asocia el daño observado al proceso de perfusión.

En las histologías de pulmón de los grupos a los que se les administró la dosis de 50 y 200 mg/Kg, se observó infiltración de macrófagos alveolares. La función de los macrófagos alveolares es la de eliminar sustancias presentes en el pulmón que pueden llegar por cualquier ruta, pero principalmente por inhalación (Faqui, 2013). Se ha identificado que estas lesiones pueden deberse a infecciones respiratorias en los animales de laboratorio (McInnes, 2012). La ausencia de una asociación entre la lesión y la dosis del fármaco administrado, es interpretado como la ausencia de causa-efecto, especialmente en las lesiones comunes en los animales de laboratorio (Faqui, 2013). Agregados de macrófagos son comunes en roedores grandes y pueden estar asociadas con la respuesta a una gran variedad de sustancias inhaladas o desechos endógenos celulares. Es común que los macrófagos se acumulen en los alveolos de los animales en los estudios de toxicidad donde la vía de administración es por inhalación o por la tráquea en largos periodos de tiempo (Greaves, 2012).

Finalmente las histologías de bazo, cerebro y corazón, no revelaron daño, sugiriendo que la SAC no produce un cambio o lesión durante su administración durante 90 días. También se sabe que las dosis de 50, 100 y 150 mg/Kg durante 45 días no tienen efecto sobre fibras cardíacas y las enzimas de daño entre las que se mencionaron la ALT y AST (Padmanabhan y Prince, 2006).



XI. CONCLUSIÓN

Al administrar SAC durante 90 días a diferentes grupos de animales con las dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg, no se encontró evidencia significativa que confirme un efecto tóxico en los parámetros de la citometría hemática ni en los marcadores de daño renal, hepático y pancreático evaluados. Además no se observaron lesiones asociadas a un daño tóxico en tejidos como bazo, riñón, páncreas, cerebro y corazón; sin embargo, se observó una disminución en la excreción de proteínas urinarias a 24 h y pocas lesiones en pulmón e hígado no directamente asociadas a la administración del compuesto en estudio.



XII. REFERENCIAS

Amagase H, Petesch B, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of nutrition*, vol. 131, pp. 955-962.

Amano H, Kazamori D, Itoh K, (2014) Pharmacokinetics of S-Allyl-L-cysteine in Rats Is Characterized by High Oral Absorption and Extensive Renal Reabsorption. *The journal of Nutrition*, vol. 146, pp. 456-459.

Amano H, Kazamori D, itoh K, Kodera Y, (2015) Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics of S-Allyl-L-Cysteine in Rats and Dogs. *Drug metabolism & Disposition*, vol. 43, pp.749-755.

Ashafaq M, Khan M, Shadab Raza S, Ahmad A, Khuwaja G, Javed H, Khan A, Islam F, Siddiqui M, Safhi M, Islam F (2012) S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutrition research*, vol. 32, pp. 133-143.

Atif f, Yousuf S, Agrawal S (2009) S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain research*, vol. 1265, pp. 128-137.

Azam S, Hadi N, Khan N, Hadi S (2004) Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in vitro*, vol. 18, pp. 555-561.

Balasantil S, Nagini S (2000) Inhibition of 7,12-dimethylbenza[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *Oral Oncology*. vol. 36, pp. 382-386.

Basheeruddin-Asdaq S (2015) Antioxidant and Hypolipidemic Potential of Aged Garlic Extract and Its Constituent, S-Allyl Cysteine, in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, pp. 1-7.

Bayrakatar O, Tekin N, Aydin O, Fahrettin A, Musmul A, Burukoglu D (2015) Effect of the S-allylcysteine on lung and liver tissue in rat model of lipopolysaccharide-induced sepsis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, vol. 388, pp. 327-335.



Berlett B, Stadtman E (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, pp. 20313-20316.

Block E (1985) The chemistry of garlic and onions. *Scientific american*, vol. 252, pp. 114-119.

Cárdenas R, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverrí J. Glutación peroxidasas: una familia de enzimas. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008) Konigsberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 201-217.

Cheng-chin H, Chien-ning H, Yu-chuan H, Mei-chin Y (2003) Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *Journal of nutrition, Nutrient interactions and toxicity research communication*, vol. 134, pp. 149-152.

Cho O, Hwang H, Lee B Oh Y, Kim C, Chun M (2015) Met inactivation by S-allylcysteine suppresses the migration and invasión of nasopharyngeal cáncer cells induced by hepatocyte growth factor. *Radiation oncology journal*, vol. 33, pp. 328-336.

Chu Q, Lee D, Tsao S, Wang X, Wong Y (2007) S-allylcysteine, a water-soluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgen-independent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. *BJU International*; vol. 99, pp. 925-932.

Colín-González A, Santana R, Silva-Islas C, Chánez-Cárdenas M, Santamaría A, Maldonado P (2012) Review Article The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine- induced protection. Hindawi publishing corporation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2012, pp. 1-16.

Cruz C, correa-Rotter R, Sánchez-González D, Hernández-Pando R, Maldonado P, Martínez-Martínez C, Medina-Campos O, Tapia E, Agular D, chirinos Y, Pedraza-Chaverrí J (2007) Renoprotective and antihypertensive effects of S-alllcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *American journal of physiology. Renal physiology*, vol. 293, pp. 1691-1698.

Decker E (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition reviews*, vol. 55, pp. 396-398.

Escárcega O (2010) El factor de transcripción nuclear Kappa en las enfermedades humanas. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 48, pp. 55-60.



Faqui A (2013) A compressive guide to toxicology in preclinical drug development, 1st Edition, Elsevier.

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

Gapter L, Yuin O, Ng K (2008) S-Allylcysteine reduces breast tumor cell adhesion and invasion. Biochemical biophysical research communications, vol. 367, pp. 446-51.

García E, Limon D, Pérez-De La Cruz V, Giordano M, Díaz-Muñoz M, Maldonado P, Herrera-Mundo M, Pedraza-chaverrí J, Santamaría A (2008) Lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and neurochemical and behavioral deficits in different neurotoxic models: protective role of s-allylcysteine. Free radical research, vol. 42, pp. 892-902.

García E, Santana-Martínez R, Silva-Islas C, Colín-González A, Galván-Arzate S, Heras Y, Maldonado P, Sotelo J, Santamaría A (2014) S-allyl cysteine protects against MPTP-induced striatal and nigral oxidative neurotoxicity in mice participation of Nrf2. Free radical research, vol. 48, pp. 159-167.

García E, Villeda-Hernández J, Pedraza Chaverrí J, Maldonado P, Santamaría A (2010) S-allylcysteine reduces the MPTP-induced striatal cell damage via inhibition of pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expressions in mice. Phytomedicine, vol. 18, pp. 65-73.

Gómez Q., Cuevas B. Superóxido dismutasa. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008) Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 169-181.

Gómez-Sierra T, Molina-Jijón E, Tapia E, Hernández-Pando R, Ramsés W, Maldonado P, Reyes J, Barrera-Oviedo D, Torres I, Pedraza-Chaverri J (2014) S-allylcysteine prevents cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. Journal of pharmacy and pharmacology, vol. 66, pp. 1271-1281.

González A. (2010) Principios de bioquímica clínica y patología molecular, Editorial Elsevier.

Greaves P (2012) Histopathology of preclinical toxicity studies – interpretation and relevance in drug safety evaluation, Fourth edition, Academic Press.



Hahn G (1996) History folk medicine, and legendary uses of garlic. The science and therapeutic application *Allium Sativum L.* and related species. Editores H. P. Koch and L. D. Lawson, pp 1-24.

Han S, Hu Y, Anno T, Yanagita T (2002) S-propyl cysteine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and triacylglycerol by HepG2 cells. *Nutrition* vol. 18, pp. 505- 509.

Hanoto S, Jimenez A, Wargovich M (1996) Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis*, vol. 17, pp. 1041-1044.

Hansberg W. El dioxígeno y sus especies reactivas. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008) Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 25-45

Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free Radicals in biology and medicine*. Fourth Edition, OXFORD University press.

Haschek W, Rousseaux C, Walling M (2002) *Fundamentals of toxicologic pathology*, Second edition, San Diego, Academic Press. Herrera-Mundo M, Silva-Adaya D, Maldonado P, Galván-Arzate S, Andrés-Martínez L, Pérez-de la Cruz V, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A (2006) S-allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neuroscience research*, vol. 56, pp. 39-46.

Herrera-Mundo N, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A, León-Aparicio D, Maldonado P. Antioxidant effect of S-allylcysteine, a garlic compound, in several experimental disease models. *Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications*. (2009) Editores Diaz-Muñoz M, Santamaria A. *Research Signpost*. Kerala, India. pp. 67-84.

Hwang Y, Gyun H, Ho J, Truong M, Chul Y, Cheon T, Gwang H (2013) S-Allyl cysteine attenuates free fatty acid-induced lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the AMP-activated protein Kinase-dependent pathway. *Journal of nutritional biochemistry*, vol. 24, pp. 1469-1478.

Ide N, Lau B (1999) S-Allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 25, pp. 619-624.



Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K (2003) Neurotoxicity induced by amyloid β -peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain research*, vol. 985, pp. 98-107.

Kim K, Chun S, Koo M, Choi W, Kim T, Kwon Y, chung H, Biliar T, Kim Y (2001) Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allylcysteine. *Free radical biology and medicine*, vol. 30, pp. 747-756.

Klaassen C, Watkins J, (2005) Casarett y doull. *Fundamentos de toxicología*, 1a Ed., McGraw-Hill.

Kodai S, Takemura S, Kubo S, Auma H, Minamiyama Y (2015) Therapeutic administration of an ingredient of aged-garlic extracts, S-allyl cysteine resolves liver fibrosis established by carbon tetrachloride in rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, vol. 56, pp. 179-185.

Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka S, Kanezawa A, Taru N, Fujikawa M, Nagae S, Masamoto K, Maeshige K, Ono K (2002), Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, pp. 622–632.

Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative Stress Phenomena, antioxidants, Redox Reactions, and Methods for their Quantification. *Toxicologic pathology* vol. 30, pp. 620-650.

Konigsberg M. Cadena respiratoria mitocondrial. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008a) Konigsberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 49-60.

Konigsberg M. Sistemas mocosomales de monooxigenasas, citocromo P₄₅₀. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008b) Konigsberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 61-72.

Konigsberg M. NADPH oxidasa. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008c) Konigsberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 73-84.



Konigsberg M. Xantina oxidoreductasa. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008d) Konigsberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 85-93.

Kosuge Y, Koen Y, Ishige K, Minami K, Urasawa H, Saito H, Ito Y (2003) S-allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid β -protein and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience*, vol. 122, pp. 885-895.

Kunwar A, Priyadarsini K (2011) Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of medical and allied sciences*, vol. 1, pp. 53-60.

Lawson L (1998) Garlic: A review of its medical effects and indicated active compounds. *Phytomedicines of Europe: Chemistry and biological activity*. Editores L. D. Lawson y R. Bauer, Washington, USA, ACS Symposium Series 691, pp. 179-209.

Lawson L, Gardner C (2005) Composition, stability and bioavailability of garlic products used in clinical trials. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, pp. 6254-6261.

Lippmann G (2010) Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 3, pp. 228-237.

Liu L, Yeh Y (2000) Inhibition of cholesterol biosynthesis by organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids*, vol. 35, pp. 197–203.

Liu Z, Li M, Chen K, Yang J, Chen R, Wang T, Liu J, Yang W, Ye Z (2012) S-allylcysteine induces cell cycle arrest and apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cells. *Molecular medicine reports*, vol. 5, pp. 439-443.

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

Maldonado P, Alvarez-Idaboy J, Aguilar-González A, Lira-Rocha A, Jung-Cook H, Medina-Campos O, Pedraza-chaverrí J, Galano A (2011) Role of allylgroup in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of S-allylcysteine. *The Journal of physical chemistry B*, vol. 115, pp. 13408-1417.



Maldonado P, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos O, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J (2003) Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free radical biology and medicine*, vol. 35, pp. 317-324.

Malekpour-Dehkordi Z, Javadi E, Doosti M, Paknejad M, Nourbakhsh M, Yassa N, Gerayesh-Nejad S, Heshmat R (2013) S-allylcysteine, a garlic compound, increases ABCA1 expression in Human THP-1 macrophages. *Phytotherapy research: PTR*, vol. 27, pp. 357-361.

McInnes E (2012) *Background lesions in laboratory animals. A color atlas.* Saunders Elsevier.

Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, Inoue K, Okada S, Suehiro S (2006) S-allylcysteine attenuated CCl₄-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactors*, vol. 26, pp. 81-92.

Mostafa M, Mima T, Ohnishi S, Mori K (1999) S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta medica*, vol. 66, pp. 148-151.

Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y (1994) Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Medica*, vol. 60, pp. 214-217.

Ng K, Guo D, Cheng Q, Geng W, Ling C, Li C, Liu X, Ma Y, Lo C, Poon R, Fan S, Man K (2012) A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *PloS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0031655.

Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H (2001) Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *The journal of nutrition*, vol. 131, pp. 1093-1095.

Numagami Y, Sato S, Ohnishi S (1996) Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as anti-oxidants. *Neurochemistry international*, vol. 29, pp. 135-143.



Padmanabhan M, Prince P (2006) Preventive effect of S-allylcysteine on lipid peroxides and antioxidants in normal and isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats: A histopathological study. *Toxicology*, vol. 224, pp. 128-137.

Park J, Han Y, Kangwan N, Lee S, Jung M, Kim E, Hahm K (2014) S-allylcysteine alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damages by increasing cyclooxygenase-2 inhibition, heme oxygenase-1 induction, histone deacetylation inhibition. *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 29, pp. 80-92.

Pedraza-Chaverrí J, Granados-Silvestre M, Medina-Campos O, Maldonado P, Olivares-Corichi I, Ibarra-Rubio M (2001) Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 216, pp. 9-19.

Peng Q, Buz`Zard A, Lau B (2002) Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, vol. 8, pp. 328-337.

Peraza R. Catalasa. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (2008) Konisberg M. Editorial Manual Moderno, México, pp. 183-199.

Pérez de la Cruz V, Gonzáles-Cortés C, Pedraza-chaverrí J, Maldonado P, Andrés-Martínez L, Santamaría A (2006) Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain research bulletin*, vol. 68, pp. 379-383.

Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado P, Medina-Campos O, Ortiz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A (2004a) S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International*, vol. 45, pp. 1175-1183.

Pérez-Severiano f, Salvatierra-Sánchez R, Rodríguez-Pérez M, Cuevas-Martínez E, Guevara J, Limón D, Maldonado P, Medina-Campos O, Pedraza-chaverrí J, Santamaría A (2004b) S-allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *European journal of pharmacology*, vol. 489, pp. 197-202.



Pham-Huy L, He H, Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, vol 4, pp. 89-96.

Pisoschi A, Pop A (2015) The role of antioxidants stress: A review. Elsevier. *European journal of medicinal chemistry*, vol. 97, pp. 55-74.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Brijesh Y, Ruchi T, Sandip C, kuldeep D (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed research international*, Hindawi publishing corporation, vol. 2014, pp. 1-19.

Ray B, Chauhan N, Lahiri D (2011) The aged Garlic extract (AGE) and one of its active ingredients s-allyl-L-cysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agents for Alzheimer's disease (AD). *Cuurrent medicinal chemistry*, vol. 18, pp. 3306-3313.

Raza H, John A (2005) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments. *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 207, pp. 212-20.

Repetto M. y Repetto G., (2009) *Toxicología fundamental*, cuarta edición, ediciones Díaz de Santos.

Rojas P, Serrano-García N, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverri J, Maidonado P, Ruíz-Sánchez E (2011) S-allylcysteine, a garlic compound, protects against oxidative stress in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism in mice. *The journal of nutritional biochemistry*, vol. 22, pp. 937-944

Sadi G, Bozan D, Yildiz H (2014) Redox regulation of antioxidant enzymes: post-traslational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Molecular cellular biochemistry*, vol. 393, pp.111-122.

Saravanan G, Ponmurugan P (2012a) Antidiabetic effect of S-allylcysteine: Effect on thyroid hormone and circulatory antioxidant system in experimental diabetic rats. *Journal of diabetes and its complications*, vol. 26, pp. 280-285.

Saravanan G, Ponmurugan P (2012b) Ameliorative potential of S-allylcysteine: Effect on lipid profile and changes in tissue fatty acid composition in experimental diabetes. *Experimental and toxicology pathology*, vol. 64, pp. 639-644.



Saravanan G, Ponmurugan P (2010) Beneficial effect of S-allylcysteine on blood glucose and pancreatic antioxidant system in streptozotocin diabetic rats. *Plant food for human nutrition*, vol. 65, pp. 374-378.

Saravanan G, Ponmurugan P (2013) S-allylcysteine improves Streptozotocin induced alterations of blood glucose, liver cytochrome P450 2E1, plasma antioxidant system, adipocytes hormones in diabetic rats. *International journal of endocrinology and metabolism*, vol. 11, pp. 1-8

Saravanan G, Ponmurugan P, Periasamy G, Kumar S, Rajarajan T (2009a) antidiabetic properties of S-allylcysteine, a garlic component streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of applied biomedicine*, vol. 7, pp. 151-159.

Saravanan G, Ponmurugan P, Periasamy G, Senthilkumar P, Rajarajan T (2009b) Modulatory effect of S-allylcysteine on glucose metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Journal of functional foods*, vol. 1, pp. 336-340.

Saravanan G, Ponmurugan P, Senthil G, Rajarajan T (2010) Antidiabetic effect of S-allylcysteine: effect on plasma and tissue glycoproteins in experimental diabetes. *Phytomedicine*, vol. 17, pp. 1086-1089.

Saravanan G, Ponmurugan P, Shabana M (2013) Effect of S-allylcysteine, a sulphur containing amino acid on iron metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of trace elements in medicine and biology*, vol. 27, pp. 143-147.

Segobiano-Murillo S, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Cruz C, Maldonado P, Pedraza-Chaverrí J (2008) S-allylcysteine ameliorates ischemia and reperfusion induced renal damage. *Phytotherapy research*, vol. 22, pp. 836-840.

Shi H, Jing X, Wei X, Pérez R, Ren M, Zhang X, Lou H (2015) S-allyl cysteine activates Nrf-2-dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry*, vol. 133, pp. 298-308.

Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, vol. 82, pp. 291-295.



Sundaresan S, Subramanian P (2008) Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by S-allylcysteine. *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 310, pp. 209-214.

Takemura S, Ichikawa H, Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T, Minamiyama Y (2014) S-allyl cysteine ameliorates the quality of sperm and provides protection from age-related sperm dysfunction and oxidative stress in rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, vol. 55, pp. 155-161.

Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, Okada S, Azuma H, Kubo S (2013) S-allylcysteine improves nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats via regulation of hepatic lipogenesis and glucose metabolism. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, vol. 53, pp. 94-101.

Tang F, Chiang E, Chung J, Lee H, Hsu C (2009) S-allylcysteine modulates the expression of E-cadherin and inhibits the malignant progression of human oral cancer. *The journal of nutritional biochemistry*, vol. 20, pp. 1013-1020.

Tang F, Chiang E, Pai M (2010) Consumption of S-allylcysteine inhibits the growth of human non-small-cell lung carcinoma in a mouse xenograft model. *Journal of agricultural food chemistry*, vol. 58, pp. 11156-11164.

Tsai S, Perry chiu c, Hui-ting Y, Mei-chin Y (2011) S-allyl cysteine, s-ethyl cysteine, and s-propyl cysteine alleviate β -amyloid, glycation, and oxidative injury in brain of mice treated by D-galactose. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 59, pp. 6319-6326.

Veskouski A, Tsatsakis A, Kouretas D (2012) Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell stress and chaperones*, vol. 17, pp. 11-21.

Watjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkotter A, Tran-Thi Q, Proksch Q, Kahl R (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The journal of nutrition*, vol. 135, pp. 525-531.

Welch C, Wuarin L, Sidell N (1992) Antiproliferative effect of the garlic compound S-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer letters*, vol. 63, pp. 211-219.



Witerbourn C (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*, vol. 4, pp. 278-286.

Xu Y, Feng J, Zhang B, Luo M, Su D, Lin N (2014) S-allylcysteine, a garlic derivative, suppresses proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells *in vitro*. *Acta pharmacologica sinica*, vol. 35, pp. 267-274

Yan C, Zeng F (2005). Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, vol. 5, pp. 61–69.

Yu J, Feng L, hou Y (2012) Effect of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: Potential benefits to preeclampsia. *Placenta*, vol. 33, pp. 487-494.

Zentella de Piña M, Piña E. (2008) El Daño en proteínas. Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas Konisberg M. Manual Moderno. México.* pp. 97-118.

(2006) Aged Garlic Extract, Research Excerpts from peer Reviewed Scientific Journals and Scientific Meetings, Wakunaga of America, USA.