



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA S-ALILCISTEÍNA (SAC) SOBRE  
LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES Y EL DAÑO  
CEREBRAL QUE SE INDUCE EN UN MODELO  
EXCITOTÓXICO-PROOXIDANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

**YESSICA ITZEL GARCÍA ESTRADA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

Vocal: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Secretario: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

1er. Suplente: ABRAHAM MADARIAGAL MAZÓN

2do. Suplente: KRUTZKAYA JUÁREZ REYES

Esta tesis se llevo a cabo bajo la dirección de la Dra. Perla D. Maldonado Jiménez en el Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) Manuel Velasco Suárez.

**Este trabajo fue apoyado por el proyecto de CONACYT 241655.**

**ASESOR DEL TEMA:**

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ \_\_\_\_\_

**ASESOR TÉCNICO:**

M. EN C. RICARDO A. SANTANA MARTÍNEZ \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

YESSICA ITZEL GARCÍA ESTRADA \_\_\_\_\_

## INDICE

<b>1. Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>3</b>
3.1 Estrés oxidante.....	3
3.2 Radicales libres.....	4
3.3 Tipos de ROS.....	4
3.3.1 Radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	4
3.3.2 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	5
3.3.3 Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ).....	7
3.4 Especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés).....	7
3.5 Otras especies oxidantes.....	9
3.6 ¿Quién produce estas especies oxidantes? (Fuentes de ROS y RNS).....	11
3.7 ¿Por qué los ROS/RNS nos dañan?.....	12
3.7.1 Daño a proteínas.....	12
3.7.2 Daño al ADN.....	13
3.7.3 Daño a lípidos.....	14
3.8 ¿Cómo equilibramos naturalmente la generación de las ROS/RNS?.....	16
3.8.1 Antioxidantes endógenos.....	16
3.8.1.1 Vía Keap1/Nrf/ARE (Expresión de genes).....	16
3.8.1.2 Enzimas antioxidantes.....	17
3.8.1.3 Moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular.....	19
3.8.2 Antioxidantes exógenos.....	20
3.9 Estrés oxidante y patología.....	22
3.10 Neurodegeneración.....	22
3.10.1 Estrés oxidativo en neurodegeneración: Causa o Consecuencia.....	23
3.10.2 Excitotoxicidad.....	24

3.10.3 Consecuencias de un aumento de $\text{Ca}^{2+}$ .....	24
3.10.4 Vía de la kinurenina.....	25
3.11 Ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín di-carboxílico) como modelo de estudio de la excitotoxicidad.....	27
3.12 Neuro-protección.....	28
3.13 Extracto de ajo envejecido. Una fuente de antioxidantes.....	29
3.13.1S-Alilcisteína: Antioxidante exógeno como blanco terapéutico de la exitotoxicidad.....	32
<b>4. Justificación.....</b>	<b>34</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Objetivo general.....</b>	<b>37</b>
6.1 Objetivos particulares.....	37
<b>7. Materiales y Métodos.....</b>	<b>38</b>
7.1 Reactivos.....	38
7.2 Síntesis de SAC.....	38
7.3 Animales.....	39
7.4 Grupos experimentales y esquema de administración.....	39
7.5 Cirugía estereotáxica.....	41
7.6 Conducta rotatoria.....	41
7.7 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E).....	41
7.8 Preparación del homogenado.....	42
7.9 Método de Lowry.....	42
7.10 Marcador de daño oxidativo.....	42
7.11 Actividad de las enzimas antioxidantes.....	43
7.11.1 Cuantificación de SOD.....	43
7.11.2 Cuantificación de CAT.....	44
7.11.3 Cuantificación de GST.....	44

7.12 Análisis estadístico.....	44
<b>8. Resultados.....</b>	<b>45</b>
8.1 Peso de las ratas.....	45
8.2 Conducta rotatoria.....	45
8.3 Tinción de H&E.....	46
8.4 Marcador de daño oxidativo.....	48
8.5 Actividad de las enzimas antioxidantes.....	49
<b>9. Discusión.....</b>	<b>51</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>11. Perspectivas.....</b>	<b>55</b>
<b>12. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>56</b>

## 1. Abreviaturas.

<b>AGE</b>	Extracto de ajo envejecido.
<b>CAT</b>	Catalasa.
<b>DNPH</b>	2,4-Dinitrofenilhidrazina
<b>GABA</b>	Acido- $\gamma$ -amino-butírico.
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa.
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa.
<b>NADPH oxidasa</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato.
<b>·NO</b>	Radical óxido nítrico.
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical dióxido de nitrógeno.
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa.
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide 2-relacionado con el factor 2.
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido.
<b>·OH</b>	Radical hidroxilo.
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno (por sus siglas en inglés).
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés).
<b>ROO<sup>·</sup></b>	Radical peroxilo
<b>SAC</b>	S-alilcisteína.
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa.
<b>QUIN</b>	Ácido quinolínico.

## 2. Resumen.

La neurodegeneración es un proceso donde progresivamente se daña y muere el tejido neuronal por diversas causas como el estrés oxidante y la excitotoxicidad. Por esa razón, el uso de antioxidantes como la S-alilcisteína (SAC), un aminoácido organosulfurado derivado del ajo, podría ser una alternativa para evitar la neurodegeneración ya que posee efectos benéficos en diferentes modelos experimentales de neurodegeneración, cuando se administra de forma previa.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la SAC como agente terapéutico tras un evento de excitotoxicidad inducida por ácido quinolínico (QUIN). Para ello, ratas fueron tratadas con SAC (100 mg/Kg) después de la administración de QUIN (120 nmol) durante seis días. Se realizó una prueba conductual basada en el número de giros ipsilaterales, se evaluó el daño histológico y se cuantificó la actividad de algunas enzimas antioxidantes y un marcador de estrés oxidativo. El tratamiento con SAC no tuvo efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes; sin embargo, redujo significativamente el número de giros ipsilaterales, aumentó el porcentaje de células vivas y disminuyó la cantidad de proteínas oxidadas inducidas por la administración de QUIN. En conclusión, el tratamiento con SAC indujo un efecto protector sobre las alteraciones conductuales y el daño cerebral inducido por el QUIN.

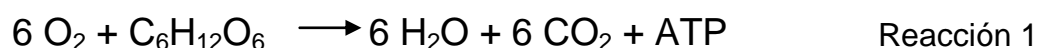


### 3. Introducción.

#### 3.1 Estrés oxidante.

El O<sub>2</sub> y la glucosa son esenciales para la vida ya que permiten la generación de energía en forma de ATP que las células necesitan para poder realizar sus funciones biológicas.

La ecuación de la oxidación completa de la glucosa es la siguiente:



Realmente, a nivel molecular para que se lleve a cabo esta reacción y se obtenga energía, se llevan a cabo muchas otras reacciones que involucran el transporte de electrones. Durante este movimiento, de forma natural se produce en las células moléculas oxidantes también conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, reactive oxygen species) (Lee, 2016). La célula se ha adaptado a ellas y en algunas ocasiones las emplea para desencadenar vías de señalización, que participan en funciones fisiológicas en la célula (Ellah et al., 2009). Además, la célula cuenta con sistemas para mantener el balance de estas especies generadas mediante el uso de antioxidantes que pueden ser de tipo enzimático y no enzimático capaces de prevenir o eliminar la oxidación de un sustrato (como una proteína o un lípido) (Siti et al., 2015).

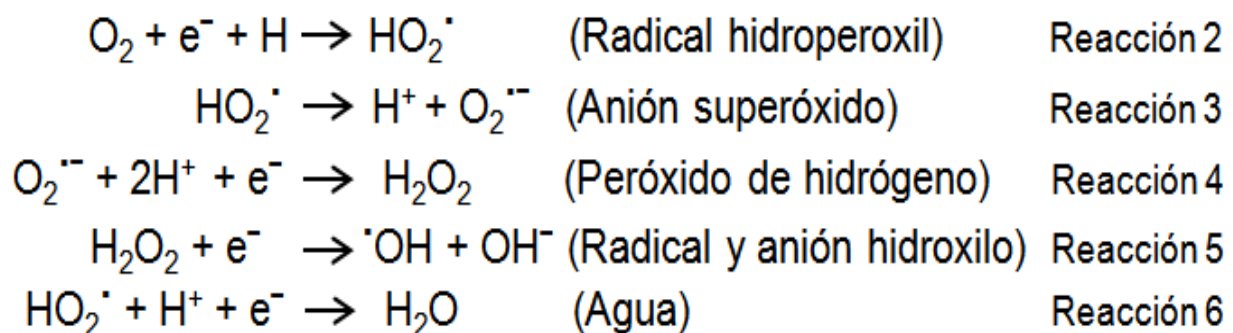
Sin embargo, cuando se pierde el equilibrio entre la formación de ROS y el nivel de los antioxidantes, y este favorece a las especies oxidantes, se desencadena un proceso conocido como **estrés oxidante** que genera daño celular e incluso la muerte celular (Rashid et al., 2013).

### 3.2 Radicales libres.

Un radical libre se define como cualquier especie que puede existir independientemente, y que contiene uno o más electrones desapareados; lo que las hace moléculas inestables y reactivas (Bayir, 2005). Se sabe que son capaces de extraer electrones de una multitud de biomoléculas y producir nuevos radicales libres, los que a su vez pueden atacar a otras moléculas (Brown et al., 2004), y generar más radicales o bien dañar a las moléculas que atacaron. En la célula los principales radicales libres derivan del  $O_2$  pero no son los únicos.

### 3.3 Tipos de ROS.

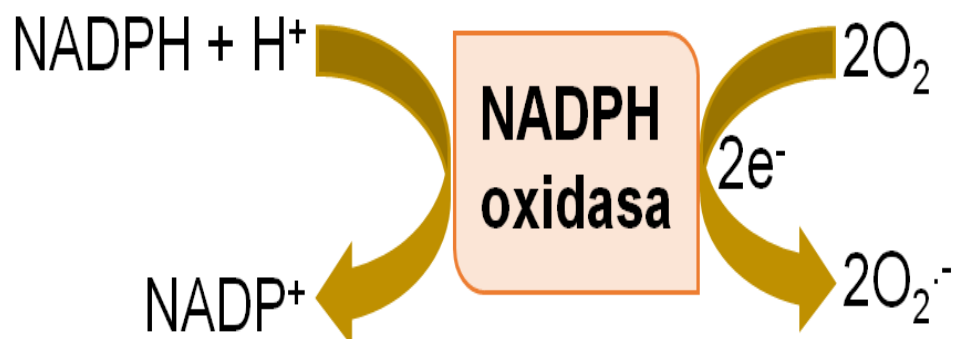
Las ROS son moléculas derivadas del  $O_2$  y por lo general se identifican como moléculas que son radicales libres aunque también existen especies no radicales. El  $O_2$  tiene una alta reactividad y durante el proceso aerobio (reacción 1) paso a paso es reducido en especies intermedias como en las siguientes reacciones (Pisoschi y Pop, 2015):



#### 3.3.1 Radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ).

La formación de  $O_2^{\cdot -}$  resulta de la adición de un electrón al  $O_2$  como se ve en el proceso de las reacciones 2 y 3. Se genera en las mitocondrias cuando se lleva

a cabo el transporte de electrones (Li et al., 2016). El  $O_2$  que entra en esta vía, aproximadamente del 1-3% se convierte en este radical (Lee, 2016). Existen otras fuentes de generación de  $O_2^{\cdot-}$  como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) (**Figura 1**), la xantina oxidasa, las ciclooxigenasas y el citocromo P450, entre otros.

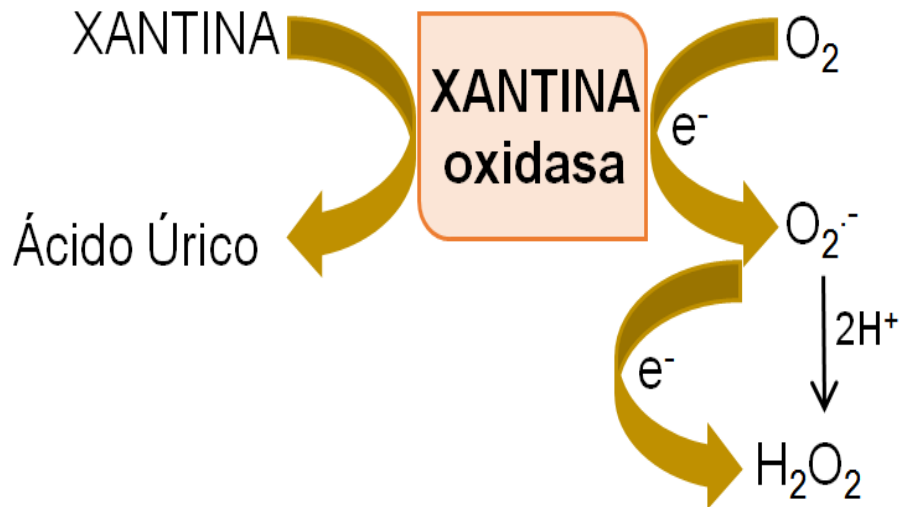


**Figura 1.** La NADPH oxidasa cataliza la reducción del  $O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$  utilizando los electrones del NADPH. Esta enzima es una de las principales generadoras de  $O_2^{\cdot-}$ .

El  $O_2^{\cdot-}$  es menos reactivo que el mismo  $O_2$  pero se considera el principal radical de las ROS (Juránek et al., 2013) porque a partir de él se pueden generar otros radicales secundarios más reactivos (Ejemplo: Reacciones 4-6). También es una especie nucleofílica que reacciona con compuestos donadores de  $H^+$  como la vitamina C y la vitamina E.

### 3.3.2 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El  $H_2O_2$  no es un radical libre y se genera a partir de diferentes oxidases que provocan la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  como: la superóxido dismutasa, la xantina oxidasa (**Figura 2**), la urato oxidasa, la glucosa oxidasa y la D-aminoxidasa, entre otras (Galea et al., 2012).

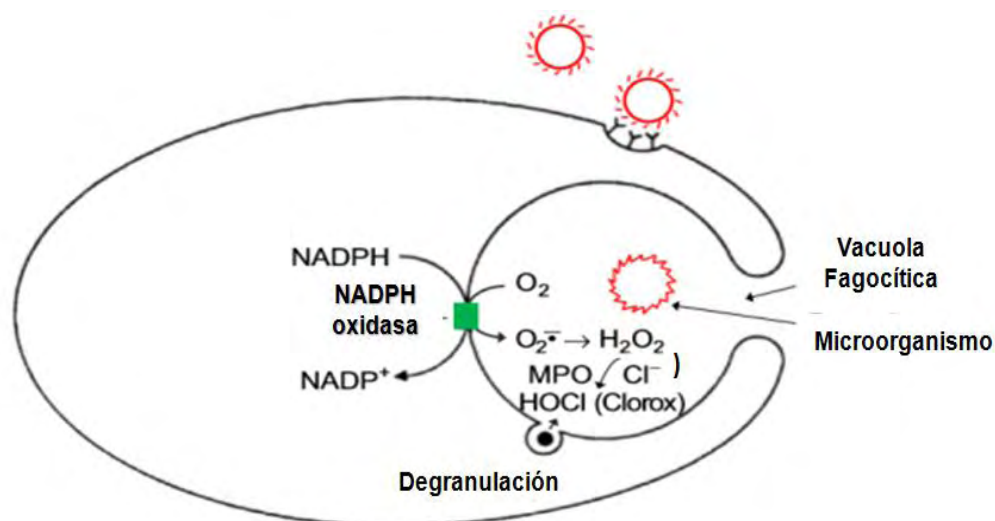


**Figura 2.** La xantina oxidasa cataliza la oxidación de xantina en ácido úrico y durante este proceso se libera  $H_2O_2$ .

El  $H_2O_2$  puede atravesar membranas y se considera un oxidante débil, pero tiene la capacidad de inactivar enzimas, lípidos, grupos  $-SH$  y ceto-ácidos como el piruvato y el 2-oxoglutarato (Gutowski y Kowalczyk, 2013).

Ataca principalmente proteínas que tienen grupo hemo como la mioglobina, la hemoglobina y el citocromo C (Kohen y Nyska, 2002). Una de las principales funciones que desempeña el  $H_2O_2$  es facilitar la fagocitosis y regular la estimulación de ciertas moléculas relacionadas con el proceso de inflamación.

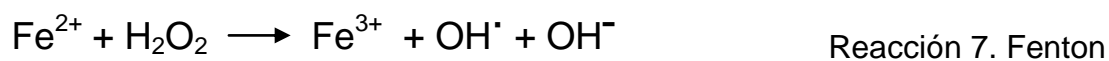
Cuando una célula fagocítica detecta un microorganismo o un agente extraño, forma una vacuola alrededor de él, donde la NADPH oxidasa produce  $O_2^{\cdot-}$  que dismuta en  $H_2O_2$ . Posteriormente, la mieloperoxidasa metaboliza el  $H_2O_2$  en presencia de iones cloro ( $Cl^-$ ) formando una especie altamente oxidante llamada ácido hipocloroso ( $HClO$ ) que puede inducir la oxidación de biomoléculas como lípidos y otros componentes de las membranas, proteoglicanos, aminoácidos, etc. **(Figura 3)** (Kalyanaraman, 2013; Kohen y Nyska, 2002).



**Figura 3.** Representación esquemática de un microorganismo en una vacuola fagocítica. La NADPH oxidasa es selectivamente activada en la pared de la vacuola, generando  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en el lumen de la vacuola. Enzimas como la mieloperoxidasa (MPO) son liberadas en la vacuola por los gránulos citoplasmáticos (Kalyanaraman, 2013).

### 3.3.3 Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ).

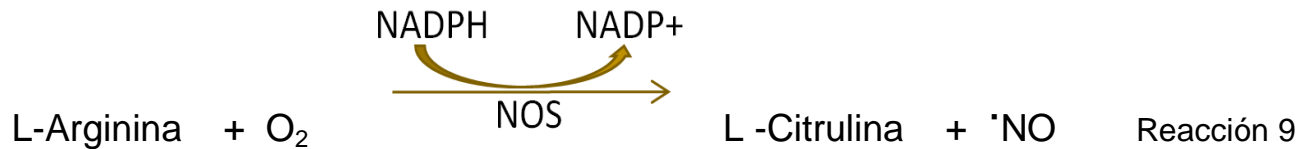
Se considera el radical más reactivo de las ROS ya que reacciona muy rápido con prácticamente cualquier molécula que encuentra a su paso como: azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácidos orgánicos y moléculas inorgánicas (Galea et al., 2012). Esta especie se genera por múltiples sistemas mediante las reacciones de Fenton (Reacción 7) y Haber-Weiss (Reacción 8):



### 3.4 Especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés).

Las RNS son otro tipo de agentes oxidantes pero derivados del nitrógeno, estás

especies también existen en forma de radicales y no radicales y se forman principalmente por el grupo de enzimas óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) que catalizan la siguiente reacción (Cobb y Cole, 2015):



Existen 3 isoformas de NOS localizadas en diferentes tipos celulares produciendo el radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ): la nNOS (neuronal) se encuentra en neuronas y el  $\cdot\text{NO}$  producido actúa como neurotransmisor; la iNOS (inducible) se encuentra en los macrófagos y en las células del músculo liso produciendo  $\cdot\text{NO}$  como mecanismo de defensa contra microorganismos, lipopolisacáridos, citocinas y glucocorticoides; y la eNOS (endotelial) se encuentra en las células endoteliales de cerebro y corazón produciendo  $\cdot\text{NO}$  como vasodilatador y para mantener el equilibrio en la presión sanguínea (Kalyanaraman, 2013).

El  $\cdot\text{NO}$  también actúa como segundo mensajero de la enzima guanilato ciclasa que es la encargada de convertir GTP en guanosin monofosfato cíclico (GMPc) provocando la relajación del músculo liso (Gutowski y Kowalczyk, 2013).

Este radical puede reaccionar con diversas moléculas y formar nuevas RNS como el radical dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2\cdot^-$ ), el radical trióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_3\cdot^-$ ), el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), entre otros. Uno de los principales radicales que se produce a partir de  $\cdot\text{NO}$  es el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) como se observa en la Reacción 10:



El  $\text{ONOO}^-$  que se encuentra en equilibrio con su forma protonada ( $\text{ONOOH}$ ), es considerado como una especie altamente reactiva, ya que tiene una acción similar a la del  $\cdot\text{OH}$ . Depleta grupos sulfhidrilo, rompe cadenas de ADN, oxida proteínas, ácidos grasos insaturados, etc. (Cobb y Cole, 2015). Se puede descomponer en otros radicales como:



Que a su vez genera nuevas especies oxidantes como el ión nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCOO}^-$ ) que se forma al reaccionar el  $\cdot\text{NO}_2$  con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) o el ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Kohen y Nyska, 2002).

### **3.5 Otras especies oxidantes.**

En las secciones anteriores (Sección 3.3 y 3.4) se mencionaron los radicales más comunes, aunque cabe mencionar que no son las únicas especies oxidantes. En la Tabla 1 se describen otras especies oxidantes que inducen y promueven reacciones en cadena que conducen a la co-oxidación y peroxidación de biomoléculas (Dorado et al., 2003).

**Tabla 1.** Especies oxidantes descritas en la literatura de las que se conoce alguna función celular o el tipo de daño que puede generar.

ESPECIE OXIDANTE	DESCRIPCIÓN
<b>RADICALES</b>	
$\text{HO}_2^\cdot$	Es la forma protonada del $\text{O}_2^{\cdot-}$
<b>Alcoxi (<math>\text{RO}^\cdot</math>) y Peroxi (<math>\text{ROO}^\cdot</math>)</b>	Tienen la capacidad de aceptar electrones, de ese modo sufren reacciones de reducción entre ellos mismos y tienden a re-arreglarse en otros radicales.
<b>NO RADICALES</b>	
<b>Oxígeno singulete (<math>^1\text{O}_2</math>)</b>	Reacciona con diversas biomoléculas. Ejemplo: riboflavina, bilirrubina o retinol. Se puede generar por reacciones de fotosensibilidad.
<b>Ácido hipocloroso (<math>\text{HClO}</math>)</b>	Facilita la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos
<b>Trióxido de dinitrógeno (<math>\text{N}_2\text{O}_3</math>)</b>	Potente agente nitrosante que puede alterar la función de proteínas.
<b>Ozono (<math>\text{O}_3</math>)</b>	Fuerte oxidante de proteínas principalmente en el pulmón.
<b>METALES DE TRANSICIÓN</b>	
<b><math>\text{Fe}^{+2, +3}</math></b>	Tiene un papel importante en el transporte del $\text{O}_2$ (en la hemoglobina) y es capaz de producir el radical hidroxilo. Es el metal más abundante en el cuerpo humano.
<b><math>\text{Cu}^{+1, +2}</math></b>	También es capaz de producir el radical hidroxilo.



### 3.6 ¿Quién produce estas especies oxidantes? (Fuentes de ROS y RNS).

Las fuentes productoras de ROS y RNS se pueden clasificar en 2 tipos: fuentes enzimáticas y no enzimáticas (Bhat et al., 2015).

#### a) Fuentes enzimáticas.

Se les conoce como fuentes endógenas ya que algunas enzimas cuando catalizan una reacción, sus productos pueden ser una especie oxidante como en la **Figura 1** que participa la enzima NADPH oxidasa, la cual está considerada como una de las principales fuentes generadoras de ROS; la **Figura 2** donde participan las xantinas oxidasas; en la **Figura 3** la participación de la MPO en células fagocíticas; en la Reacción 9 donde participa la NOS; entre otras fuentes como: las ciclo-oxigenasas, el citocromo P450, algunas enzimas que participan en el metabolismo de la  $\beta$ -oxidación, el metabolismo en la mitocondria, etc. (Harrison, 2014).

#### b) Fuentes no enzimáticas

Se les conoce como fuentes exógenas ya que promueven la formación de especies oxidantes a partir de un agente físico externo. Ejemplo: xenobióticos, contaminación, fármacos, alimentos, ultrasonido, radiación gamma y UV.

La exposición a las fuentes endógenas es extremadamente alta ya que día a día estamos en contacto con todas esas fuentes y en algunas ocasiones no podemos evitar la interacción con ellas como los alimentos, que contienen peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición. La exposición a radiación ionizante como la radiación gamma genera una serie de radicales debido a la ionización del agua intracelular. Contaminantes como el humo de autos, el humo de cigarrillos o los contaminantes industriales son los que generan mayores tipos de RNS, aquellos fármacos que contribuyen a la

producción de ROS principalmente son los analgésicos y los narcóticos. Finalmente, dentro de los xenobióticos se encuentran las toxinas, los pesticidas y los herbicidas (Juránek et al., 2013; Veskoukis et al., 2012).

### **3.7 ¿Por qué los ROS/RNS nos dañan?**

En concentraciones bajas o moderadas (equilibrio homeostático redox) se ha demostrado que las ROS/RNS funcionan como reguladores y activadores de vías de señalización, participan en la activación de genes, en el crecimiento celular, modulan diferentes reacciones químicas, entre otras funciones (Dunning et al., 2013; Lee, 2016). Cuando ocurre un desequilibrio es cuando pueden ser tóxicas, causando daño a las principales biomoléculas de la siguiente manera.

#### **3.7.1 Daño a proteínas.**

Todas las ROS y RNS pueden generar daño a las proteínas sobre todo a aquellas que contienen residuos de aminoácidos de cisteína y metionina, ya que son susceptibles a la oxidación por el grupo SH que tienen (también conocido como grupo sulfhidrilo o grupo tiol) (Bhat et al., 2015). Los aminoácidos con anillos aromáticos como la tirosina, también son susceptibles a la oxidación por diferentes especies, por ejemplo el  $\cdot\text{OH}$  inicia la oxidación de tirosinas resultando en di-tirosina. Por otro lado, el  $\cdot\text{NO}_2$  forma 3-nitrotirosina que al reaccionar con HClO forma 3-clorotirosina (Pisoschi y Pop, 2015) un indicador de estrés oxidativo.

Los tipos de daño pueden ser directos e indirectos. Por ejemplo, el daño específico a un residuo de aminoácido de forma reversible o irreversible, como la oxidación a los grupos SH en algunos casos es reversible debido a la actividad de las disulfuro reductasas, pero en otros casos las ROS/RNS pueden

generar cambios en su estructura terciaria, fragmentar a las proteínas e incrementar su degradación proteolítica (Andersen, 2004).

La consecuencia del estrés por todos estos cambios es una pérdida de la actividad catalítica que altera las funciones celulares como la producción de energía, interfiere con el potencial de membrana y realiza cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares (Ellah et al., 2009).

Los productos de la oxidación a proteínas por lo general son aldehídos, ceto-ácidos y carbonilos. Por ejemplo, la formación de S-carboximetilcisteína y S-(2-succinil)cisteína implica la formación de fumarato y grupos di-carbonilos, unidos covalentemente al grupo SH, es decir de forma irreversible. La oxidación de lisina, prolina, arginina y treonina también da lugar a la formación de derivados carboxílicos (Galea et al., 2012; Lee, 2016). La forma más fácil de identificar el daño a las proteínas es el uso del marcador 3-nitrotirosina. Otro ejemplo de modificación reversible es el caso de la carbonilación de las proteínas provocado por el  $\cdot\text{OH}$  (Dorado et al., 2003).

### **3.7.2 Daño al ADN.**

Aunque el ADN es una molécula estable y bien protegida, las ROS pueden interactuar con él, causando una serie de daños como: entrecruzamiento entre ADN-proteína, rompimiento de la doble hélice, impacto negativo en la transcripción o replicación, alteraciones en las bases púricas (sitios apurínicos) y pirimídicas del ADN provocando mutaciones, daño en el azúcar desoxirribosa, daño en el sistema de reparación, etc. (Kohen y Nyska, 2002). Este tipo de daños es atribuido principalmente al  $\cdot\text{OH}$ . La interacción directa entre otros ROS más débiles como el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no generan ningún tipo de daño, sin embargo son generadores de la especie  $\cdot\text{OH}$  y el  $\text{ONOO}^-$  que es otra especie

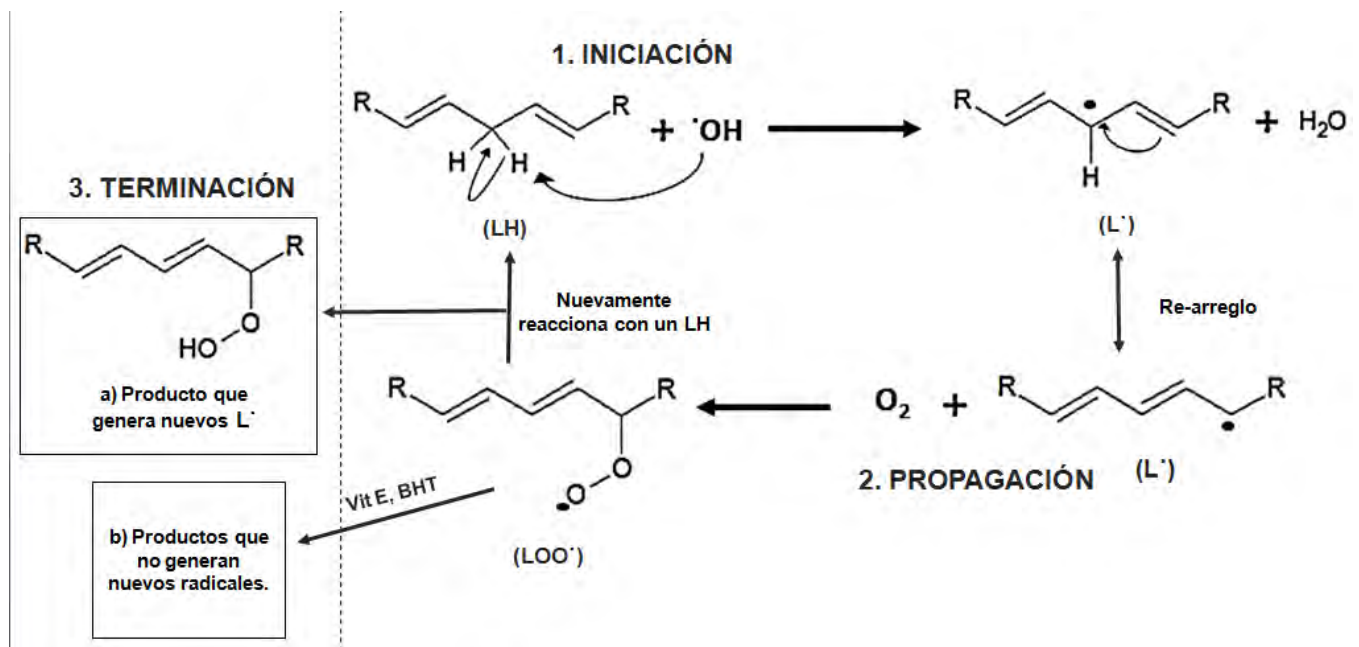
que también daña fácilmente al ADN.

La reacción del  $\cdot\text{OH}$  con anillos aromáticos casi siempre es por adición, puede atacar bases como la adenina llevando a la formación de 8(4 o 5)-hidroxiadenina o también puede ocurrir el daño si se une a la base timina que reacciona con  $\text{O}_2$  y este a su vez forma otro radical llamado peroxil-timina (Colín-González et al., 2015a; Gan y Johnson, 2014).

El marcador más usado para identificar el daño al ADN es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) que surge cuando el  $\text{OH}\cdot$  se añade a la base guanina por adición (Bayir, 2005).

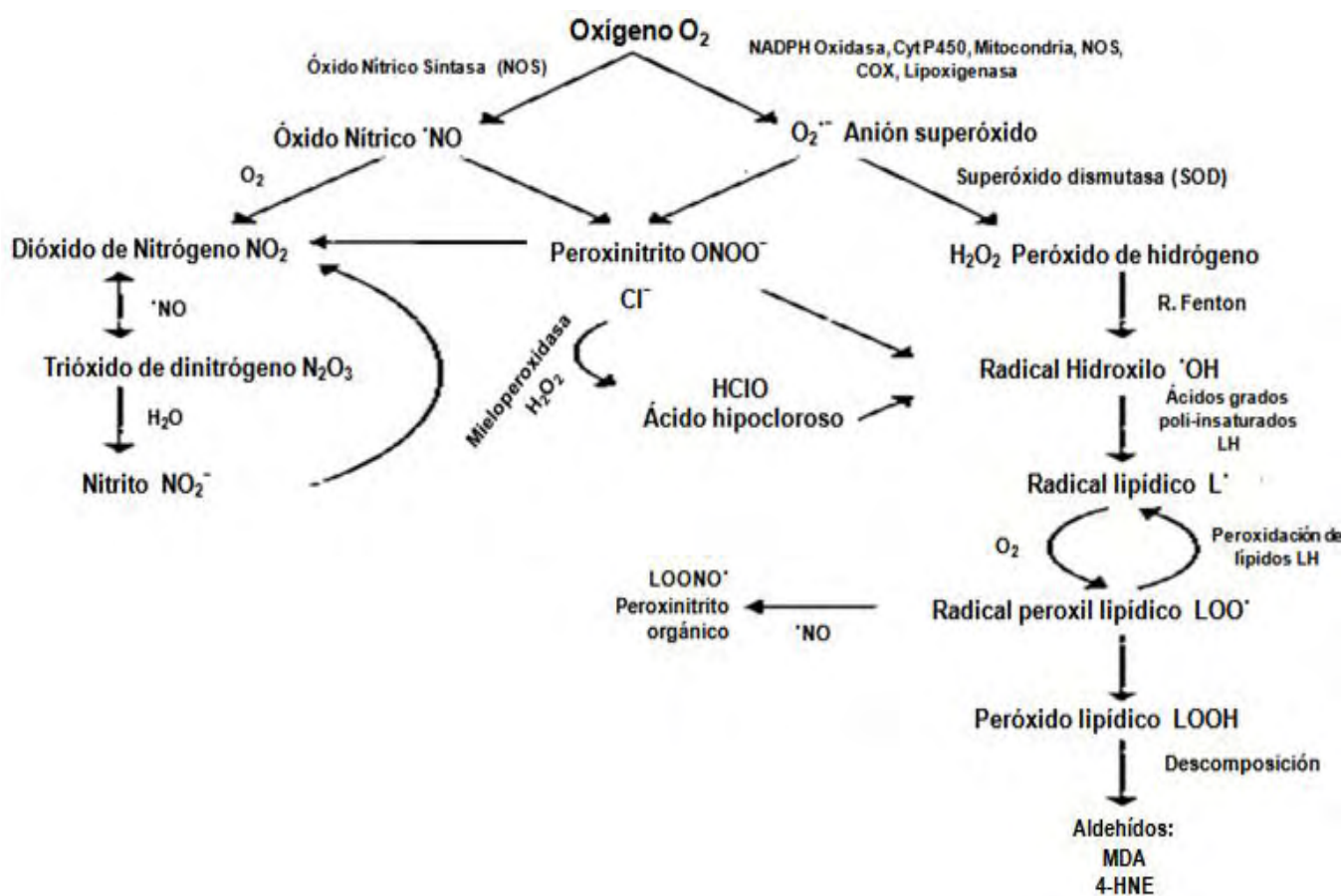
### 3.7.3 Daño a lípidos

Todas las membranas celulares son vulnerables a la oxidación debido a sus altas concentraciones de ácidos grasos poli-insaturados. El daño a los lípidos generalmente ocurre por un proceso llamado peroxidación de lípidos, que se lleva a cabo en tres etapas (Dorado et al., 2003; Kohen y Nyska et al., 2002): iniciación, propagación y terminación (**Figura 4**).



**Figura 4.** Peroxidación de lípidos. **1)** Iniciación: Un hidrógeno es removido de un lípido (LH) por un radical libre generando un radical de ácido graso ( $L^{\cdot}$ ) y una transición (re-arreglo); **2)** Propagación: Es característico por la oxidación de un  $L^{\cdot}$  al reaccionar con oxígeno ( $O_2$ ) para generar el radical lipídico peroxilo ( $LOO^{\cdot}$ ), o bien el radical  $LOO^{\cdot}$  ataca nuevamente a otro lípido, entrando a un ciclo y generando nuevos  $L^{\cdot}$  y  $LOO^{\cdot}$  y **3)** Terminación: El radical  $L^{\cdot}$  y  $LOO^{\cdot}$  reacciona con nuevos  $L^{\cdot}$  y  $LOO^{\cdot}$  o un antioxidante como la Vitamina E (Vit E) o el butilhidroxitolueno (BHT) donando un átomo de hidrógeno a la especie  $LOO^{\cdot}$  o  $L^{\cdot}$  neutralizándolos.

La oxidación de los lípidos resulta en la formación de aldehídos como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (4-HNE), la acroleína o los F2-isoprostanos que después atacan proteínas e interfieren en sus funciones (Arimon et al., 2015; Padmanabhan y Prince, 2006). Estos productos de la peroxidación se utilizan como marcadores de daño. Los lípidos se consideran las biomoléculas más susceptibles al proceso de oxidación (García et al., 2008). Un resumen de todas las ROS y RNS se presenta en la **Figura 5**, la cual muestra las interacciones entre las ROS/RNS y los productos lipídicos mencionados anteriormente. Adicionalmente, representa las diferentes fuentes de estas especies.



**Figura 5.** Conjunto de ROS y RNS. Todas estas especies surgen a partir de una molécula en común, el  $O_2$ , y dependiendo de la enzima que lo metabolice, se generaran diferentes especies reactivas que a su vez reaccionan con otras moléculas y generan más ROS y RNS (Kalyanaraman, 2013).

### 3.8 ¿Cómo equilibramos naturalmente la generación de las ROS/RNS?

Un antioxidante es una molécula que inhibe la formación de un pro-oxidante (aquel que causa o promueve la oxidación) o bien inhibe la oxidación. Se clasifican en endógenos y exógenos (Cobb y Cole, 2015).

#### 3.8.1 Antioxidantes endógenos.

##### 3.8.1.1 Vía Keap1/Nrf2/ARE (Expresión de genes).

Los tres componentes celulares implicados en este mecanismo de señalización

a nivel transcripcional son: Kelch como la proteína asociada a ECH 1 (Keap1), el factor nuclear eritroide 2-relacionado con el factor 2 (Nrf2) y los elementos de respuesta antioxidante (ARE).

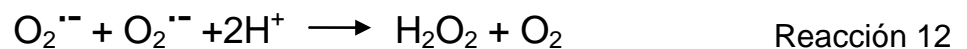
Esta vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE es la responsable de "encender " la respuesta adaptativa contra el estrés oxidante cuando hay un exceso de ROS/RNS (Denzer et al., 2016).

Esta vía induce la transcripción de una serie de genes citoprotectores y antioxidantes que incluyen proteínas como: las superóxido dismutasas (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT), la gamma-glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS), la glutatión-S-transferasa (GST), la hemo oxigenasa (HO), la NADPH quinona oxido reductasa-1 (NQO1), entre otras.

### **3.8.1.2 Enzimas antioxidantes.**

#### **SOD**

Existen tres isoformas de esta enzima como: la SOD-EC (líquido extracelular), la Cu-Zn SOD (citosólica) y la MnSOD (mitocondrial) (Galea et al., 2012). Estas isoformas difieren en estructura, lugar donde se encuentran y en los cofactores que requieren pero todas catalizan la siguiente reacción:



Así, cuando disminuye la concentración de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  evita indirectamente la formación de otras especies oxidantes. Ejemplo: Evita la formación de  $\text{ONOO}^-$  que proviene de la reacción entre el  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y el  $^{\cdot}\text{NO}$  (ver reacción 10), también evita que el  $\text{O}_2^{\cdot -}$  libere iones de Fe de algunas enzimas (centro Fe-S) con las que reacciona y provoque daño a la mitocondria o al ADN. Sin embargo, no

prevé la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Andersen, 2004).

La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede disminuir por la actividad de otras enzimas como la catalasa o bien la familia de peroxidasas como la GPx.

### **CAT**

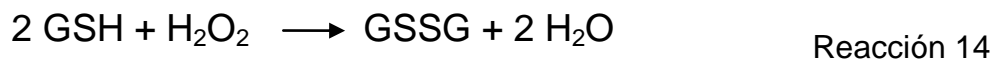
Esta enzima es una óxido-reductasa que cataliza la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando esta especie se encuentra en altas concentraciones. Es una enzima con 4 subunidades proteicas y cada una contiene un grupo hemo (contiene Fe).

Una primera molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con el grupo hemo para producir  $\text{Fe}^{3+}$ , una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sirve como donador de electrones que da como resultado final la destrucción de dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la formación de agua y  $\text{O}_2$  (Denzer et al., 2016; Veskokoukis et al., 2012), como se ve en la siguiente reacción:



### **GPx**

En contraste con la catalasa, las peroxidasas poseen una mayor afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando se encuentra en concentraciones bajas (Dunning et al., 2013), sin embargo el donador de electrones en este caso es una molécula pequeña llamada glutatión (GSH).

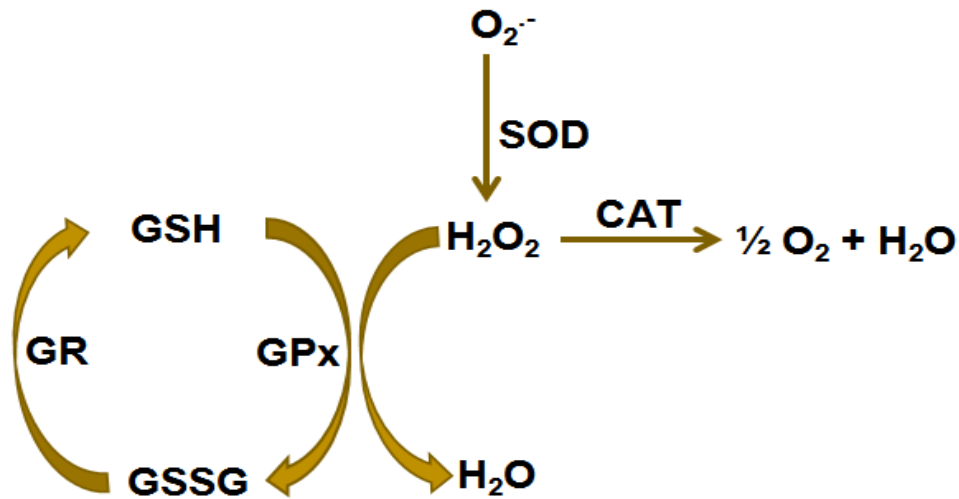


Otra cosa que distingue a las peroxidasas de la catalasa es que no producen  $\text{O}_2$  y en otras ocasiones la GPx ayuda a disminuir la concentración de especies  $\text{LOO}^\cdot$ .

La acción de las enzimas anteriormente mencionadas (SOD, CAT, GPx) se



representan en la **Figura 6**. Todas estas enzimas ayudan de manera indirecta a que no se forme el  $\cdot\text{OH}$ .



**Figura 6.** Relación entre las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GPx).

Otras enzimas importantes son aquellas que almacenan Fe como la ferritina o Cu como la ceruloplasmina. Además, también son importante aquellas que ayudan a eliminar la concentración de aldehídos formados como la glutatión-S-transferasa (Hsu et al., 2004).

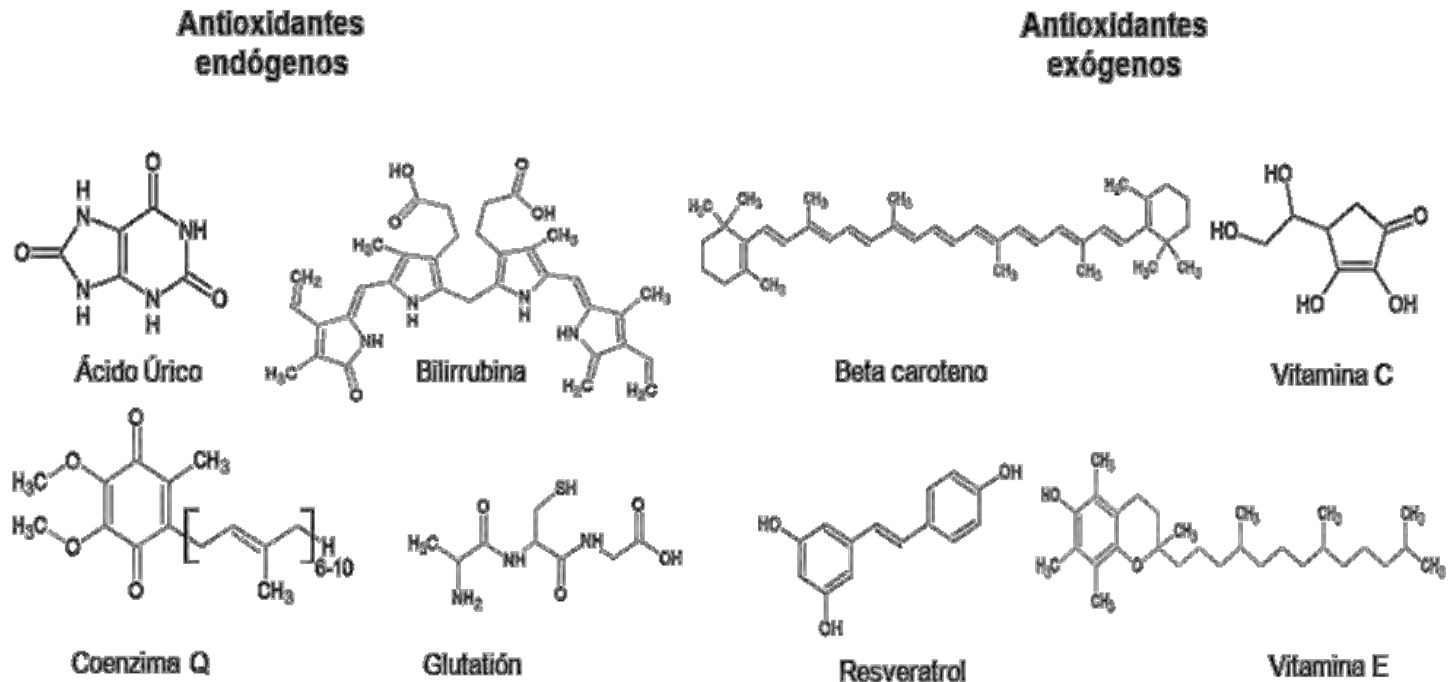
### **GST**

Forma parte de la familia de enzimas glutatión transferasas que catalizan la reacción de compuestos electrofílicos (algunos con esta característica son especies oxidantes) con ayuda del glutatión reducido (Denzer et al., 2016; Hatono et al., 1996).

#### **3.8.1.3 Moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular.**

Dentro de esta categoría entran las siguientes moléculas: el glutatión reducido, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina, la melatonina, el ácido alfa lipóico,

entre otros (**Figura 7**). Por ejemplo: el ácido úrico es eficiente en disminuir la concentración de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $ROO^{\bullet}$  y  $\cdot OH$ ; además de proteger la membrana de los eritrocitos contra la peroxidación de lípidos (Kohen y Nyska, 2002).



**Figura 7.** Imagen de antioxidantes end6genos y ex6genos (Pisoschi & Pop, 2015).

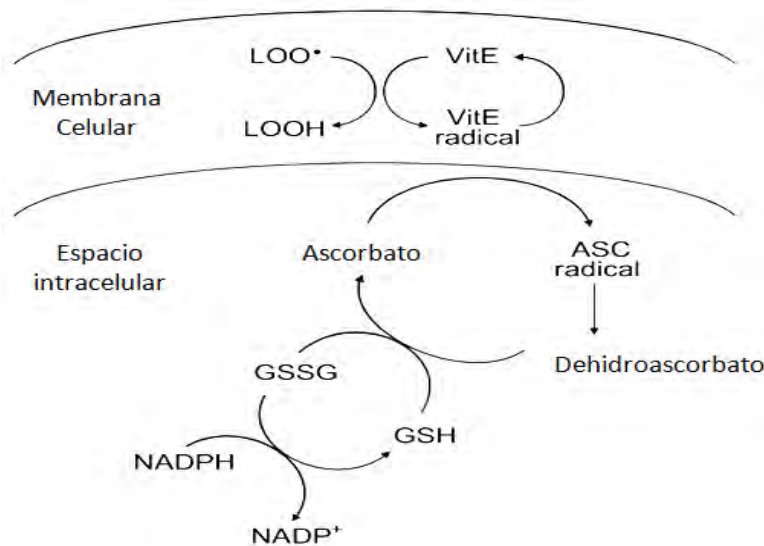
### 3.8.2 Antioxidantes ex6genos.

Estos antioxidantes se obtienen de la ingesta de la dieta diaria. Proviene principalmente de frutas y verduras y son mol6culas de bajo peso molecular. Se pueden dividir en liposolubles e hidrosolubles; esta característica permitir6 que combatan diferentes especies reactivas (Veskoukis et al., 2012).

Algunos de ellos son: la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides ( $\beta$ -caroteno), la vitamina A, el butilhidroxitolueno (BHT) y algunos compuestos fen6licos como: flavonoides, flavonas, flavonoles, derivados del 6cido hidroxicin6mico, antocianinas, etc. (Forman et al., 2014) (**Figura 7**).

Los carotenoides juegan un gran papel contra el  $O_2^{\bullet-}$  que se induce por la radiaci6n de la luz UV en la piel.

La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) o el BHT son moléculas liposolubles por eso pueden terminar con la formación de radicales peroxilo en el proceso de peroxidación de lípidos y acabar con el ciclo (**Figura 4, 8**). En contraste con estos antioxidantes, la vitamina C (Ascorbato, ASC) es soluble en agua y reacciona rápidamente con una variedad de especies oxidantes incluyendo el  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$  formando el radical ascorbato que reacciona con otro ascorbato para formar dehidroascorbato y ascorbato (**Figura 8**).



**Figura 8.** El paso entre los antioxidantes solubles en agua y liposolubles (Kalyanaraman, 2013).

Otras fuentes de antioxidantes exógenos pueden ser los suplementos alimenticios que proveen nutrientes como: vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos que no son tan comunes en las dietas diarias de las personas.

También cabe mencionar que a altas concentraciones los antioxidantes pueden volverse pro-oxidantes. Es por eso que se le llama homeostasis redox, ya que debe existir un balance entre ambas partes. De haber un incremento en los

niveles de los antioxidantes, estos provocarán el “estrés antioxidante” generando estrés y daño celular (Kohen y Nyska, 2002).

### **3.9 Estrés oxidante y patología.**

Existe evidencia científica de que el estrés oxidante se presenta de manera severa en diversas enfermedades. Más de 200 enfermedades se han descrito en la literatura en la que las ROS juegan un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad (Lee, 2016).

Las ROS son importantes mediadoras e iniciadoras en padecimientos como el cáncer, la disfunción endotelial, la diabetes mellitus, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la inflamación, la isquemia/reperfusión, la apnea del sueño, la hipertensión, la aterosclerosis, las enfermedades oculares, las enfermedades neurodegenerativas, el envejecimiento, entre muchas otras más (Arimon et al., 2015).

### **3.10 Neurodegeneración.**

Se define como la pérdida progresiva de función del tejido nervioso que desencadenan una serie de trastornos según el área afectada hasta provocar la muerte celular (Denzer et al., 2016).

Las principales afecciones en este tipo de enfermedades son las alteraciones en la actividad motora como sucede en la Enfermedad de Parkinson (PD), la Enfermedad de Huntington (HD) y la Esclerosis lateral amiotrófica (ALS). En algunos otros casos existe la pérdida de la memoria como en la Enfermedad de Alzheimer (AD).

Los trastornos neurodegenerativos habitualmente empeoran con el tiempo y no

hay un tratamiento eficaz, solo existen tratamientos paliativos para disminuir los efectos progresivos de la enfermedad y alargar el tiempo de vida del paciente. Las causas pueden ser genéticas, por un tumor, un derrame cerebral, una lesión, una droga, un microorganismo, falta de oxígeno, un trastorno metabólico, entre otros (Andersen, 2004; Bossy-Wetzel et al., 2004; Galea et al., 2012).

### **3.10.1 Estrés oxidativo en neurodegeneración: Causa o Consecuencia.**

En ciertas enfermedades neurodegenerativas se han encontrado proteínas características de cada enfermedad que funcionan con irregularidad y/o se acumulan en los tejidos progresivamente provocando la muerte celular (Cobb y Cole, 2015; De la Cruz et al., 2013). En muestras de tejido posmortem en pacientes con AD, PD y ALS las principales regiones afectadas del cerebro han sido: la corteza, el hipocampo, la sustancia nigra, la neocorteza y el estriado; donde se han encontrado altos índices de ROS y RNS (Galea et al., 2012).

Sin embargo, esta evidencia no indica que las ROS y RNS sean la causa o el evento primario que provocó el mal funcionamiento de las proteínas y que esto a su vez provoca la muerte. Algunos autores afirman (Andersen, 2004) que el evento primario fue el mal funcionamiento de las proteínas y el estrés generado es un evento secundario. Saber cuál es el evento primario podría dar pauta a la elucidación de nuevos blancos moleculares para la búsqueda de un tratamiento eficaz contra estas enfermedades.

Una de las principales consecuencias del aumento de estrés en las células es que provoca alteraciones en sus mitocondrias, las que a su vez generan más estrés, un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y excitotoxicidad (Ashafaq et al., 2012).

### **3.10.2 Excitotoxicidad.**

Es un proceso patológico neuronal que ocurre como consecuencia de la sobre-activación de receptores de aminoácidos excitadores como el glutamato y sus análogos como la glicina.

Los receptores glutamatérgicos se dividen en dos (Gagliardi, 2000):

a) Metabotrópicos acoplados a proteína G

b) Ionotrópicos de tipo: ácido kaínico, alfa-amino-3-hidroxi-5-metil4-isoxazolepropionato (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA).

La deficiencia de ATP produce disfunción de las bombas iónicas con lo que se altera el potencial de membrana en reposo y finalmente conduce a la despolarización de la membrana favoreciendo la activación de los receptores NMDA.

El glutamato es necesario para la función cerebral normal (involucrado en el almacenamiento de la memoria), la liberación excesiva de glutamato puede causar la muerte en las neuronas post-sinápticas. Esto se debe a que la estimulación excesiva de receptores de NMDA causa un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas post-sinápticas, seguido de un estado de estrés oxidante (Fuentes-Bello et al., 2013).

### **3.10.3 Consecuencias de un aumento de $\text{Ca}^{2+}$ .**

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desencadena la siguiente serie de mecanismos tóxicos (Rueda et al., 2016):

a) Alteración de la fosforilación oxidativa, disminuyendo la producción de energía en la mitocondria.

b) Activación de fosfolipasas que actúan sobre los fosfolípidos y

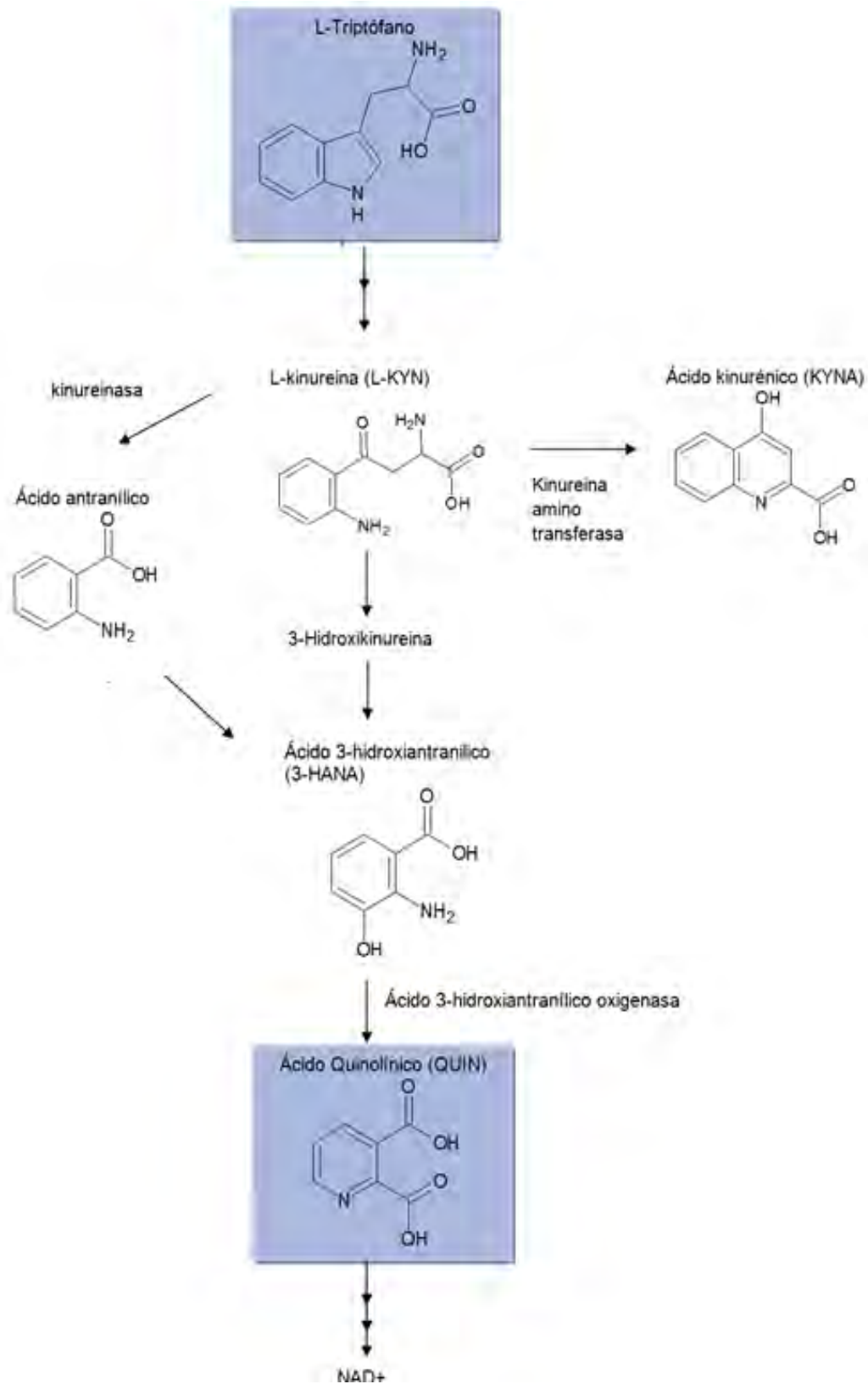
contribuyen a la destrucción de las membranas neuronales.

- c) El exceso de ácido araquidónico permite la biosíntesis de productos como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos que tienen propiedades vasoconstrictoras.
- d) Activación de proteasas que juegan un papel importante en la producción de radicales libres.
- e) Activación de la enzima NOS que aumenta las concentraciones de  $\cdot\text{NO}$ . El cual también permite la liberación de glutamato, y finalmente
- f) La muerte neuronal por necrosis o apoptosis.

En cada enfermedad neurodegenerativa se expresarán más algunos mecanismos que otros desencadenando así una serie de reacciones diferentes debido a las zonas donde se ha llevado el daño, el tipo de receptores que exprese cada célula, entre otras causas.

#### **3.10.4 Vía de la kinurenina.**

Es la vía catabólica del triptófano (aminoácido necesario para la producción del neurotransmisor serotonina) y más del 95% es metabolizado a través de esta vía en el sistema nervioso central de los mamíferos. Tiene como producto final la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), y se ha informado que está presente principalmente en el hígado y en el tejido nervioso (**Figura 9**) (Maddison y Giorgini, 2015). La importancia de la vía de la kinurenina es que forma dos de los metabolitos más neuroactivos: el ácido kinurenico, antagonista endógeno de los receptores NMDA y el ácido quinolínico (QUIN), agonista de los receptores NMDA.



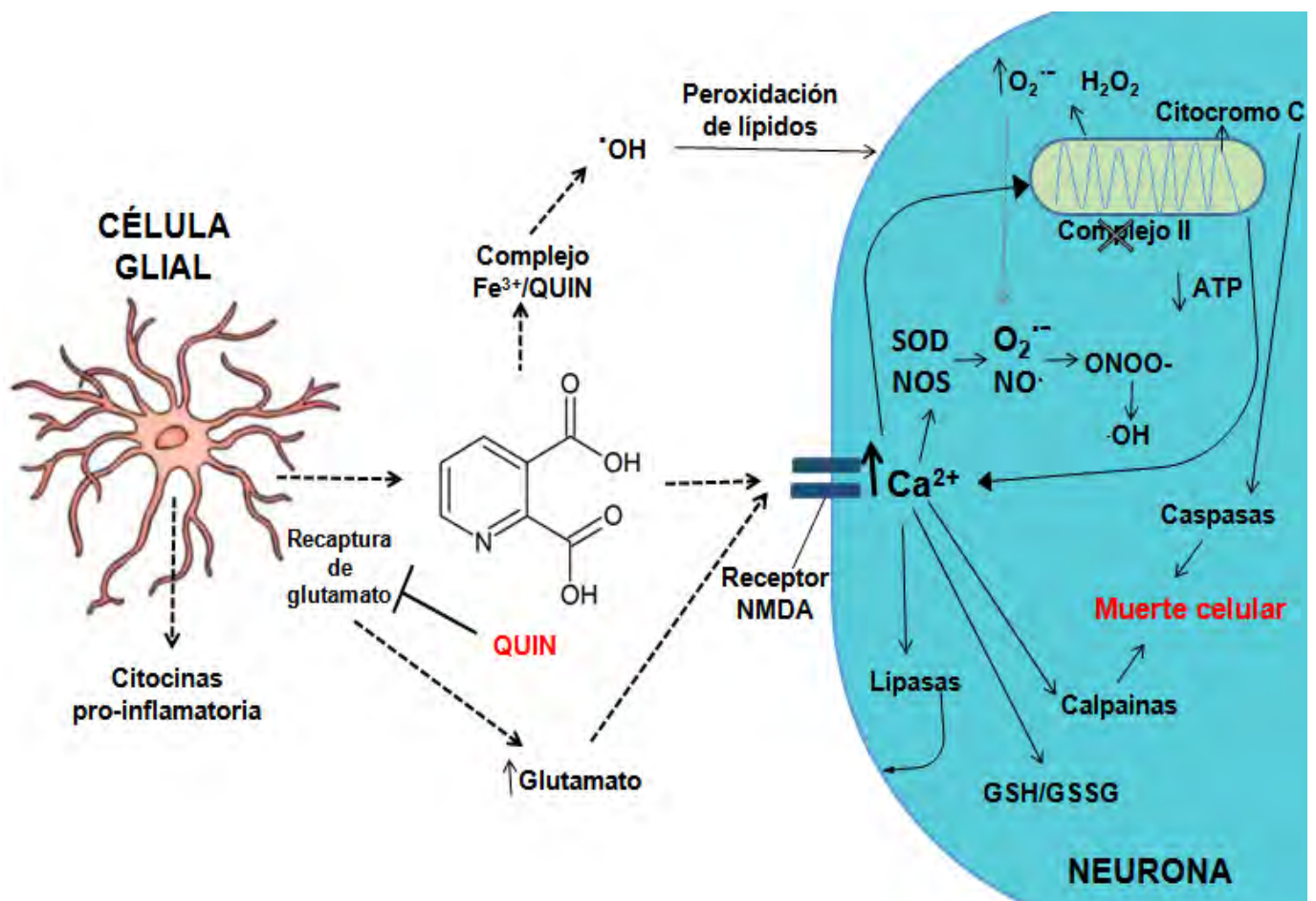
**Figura 9.** Vía de la kinurenina. Producción endógena de ácido quinolínico (QUIN) a partir del aminoácido triptófano (Maddison y Giorgini, 2015).



### 3.11 Ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín di-carboxílico, QUIN) como modelo de estudio de la excitotoxicidad.

El QUIN es una molécula endógena que se ha observado incrementada en varios desordenes neurológicos. Este incremento es provocado por las células gliales que en procesos inflamatorios liberan citocinas (como interferón- $\gamma$ ) que estimulan la vía de la kinurenina y esta a su vez aumenta la concentración de QUIN (De la Cruz et al., 2013; Santana et al., 2014).

El incremento de la concentración de QUIN produce toxicidad ya que sobreactiva los receptores NMDA inhibiendo la recaptura de glutamato, provoca el incremento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, seguida de disfunción mitocondrial, liberación del citocromo c, agotamiento de ATP, formación de radicales libres y daño oxidativo (**Figura 10**). Este proceso tóxico es responsable de la pérdida selectiva de las neuronas espinosas medianas GABAérgicas en el estriado y las alteraciones motoras en animales de experimentación con una lesión inducida por QUIN (De la Cruz et al., 2013). También se ha demostrado que puede formar complejos con el Fe induciendo la formación directa de radicales libres como el radical  $\cdot\text{OH}$  (Huitrón et al., 2013; Maddison y Giorgini, 2015).



**Figura 10.** Representación esquemática del mecanismo excitotóxico del ácido quinolínico (QUIN) en el sistema nervioso central. Primero se incrementan los niveles de QUIN debido a una respuesta inflamatoria por la activación de las células gliales. El QUIN puede después actuar de dos formas: (1) Sobreactivando el receptor NMDA e inducir eventos excitotóxicos en la neurona; y/o (2) Interaccionando directamente con el Fe (De la Cruz et al., 2013).

### 3.12 Neuro-protección.

Aquellas moléculas que evitan la excitotoxicidad o bien disminuyen sus efectos, se conocen como neuro-protectores, lo pueden hacer actuando en los siguientes blancos moleculares como (Gagliardi, 2000; García et al., 2014):

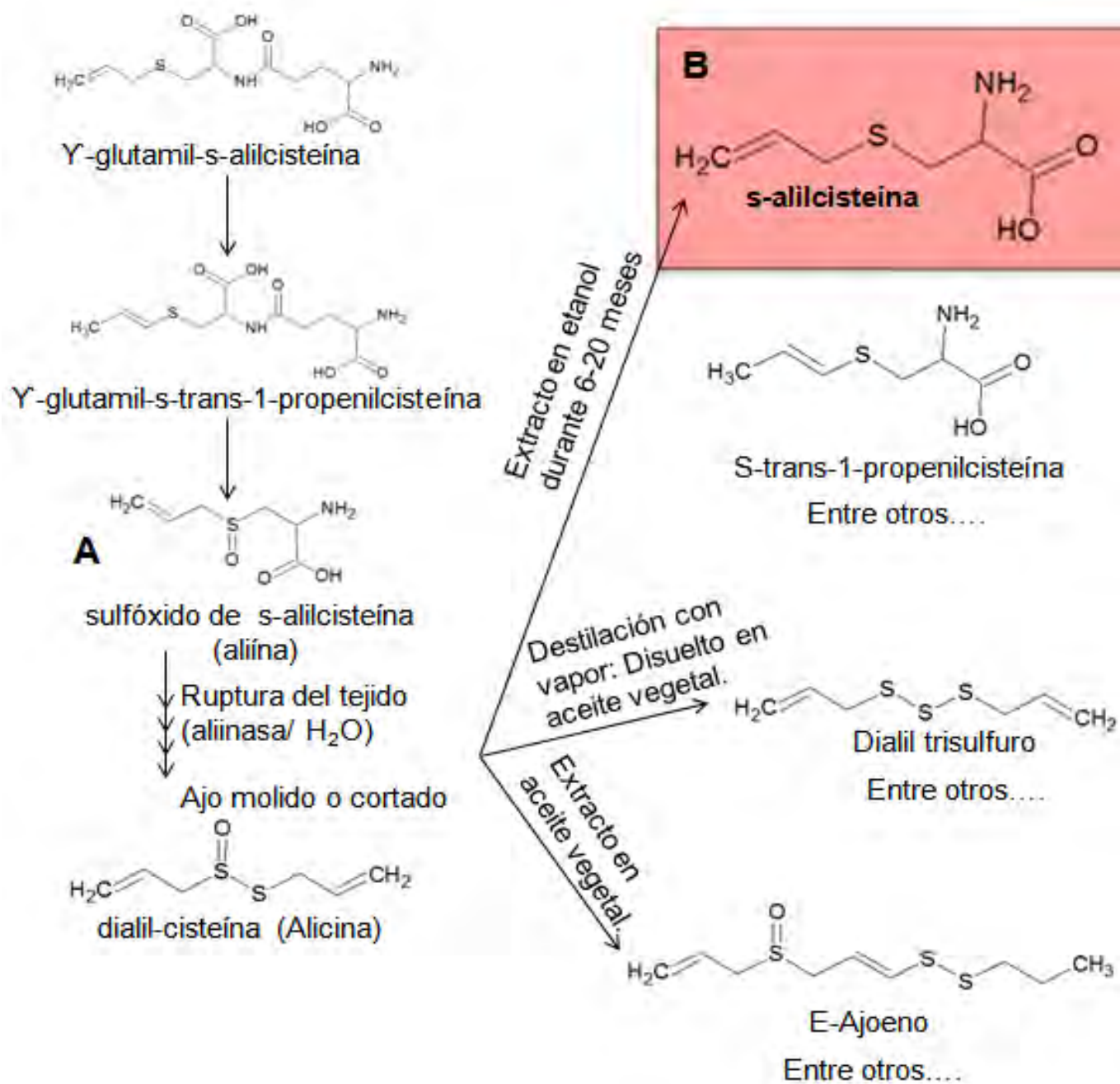
- a) Agonistas de GABA: es el principal amino-ácido inhibitorio. El efecto de GABA puede revertir los efectos tóxicos del glutamato a través de la hiperpolarización en la membrana neuronal.

- b) Inhibiendo las vías de modulación de  $\text{NO}$ . Para evitar el daño neuronal.
- c) Antagonistas de las bombas de  $\text{Na}^+$ : la inhibición de los canales pre-sinápticos de  $\text{Na}^+$ , permiten la estabilización del potencial de membrana, ya que inhibe la liberación pre sináptica de glutamato.
- d) Factores de crecimiento: se les conoce como neurotrofinas a aquellas moléculas que participan en la regeneración de los axones dañados como: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), factor neurotrófico derivado del células gliales (GDNF, por sus siglas en inglés).
- e) Hipotermia: puede reducir la liberación de glutamato y puede ser usado como acción neuro-protectora.
- f) Antagonista del receptor para NMDA: es una proteína compleja, que cuenta con sitios de unión a cationes divalentes, poliamidas y glicina. El glutamato es el principal agonista, la unión de un antagonista a cada uno de sus sitios de unión induce neuro-protección.

### **3.13 Extracto de ajo envejecido. Una fuente de antioxidantes.**

El ajo (*Allium sativum* L.) se ha utilizado desde la antigüedad tanto por sus usos culinarios como por sus múltiples propiedades medicinales. Es una especie que pertenece a la familia de *Lilaceae* y es originario de Asia central. En la actualidad se cultivan diversas variedades de ajo en numerosos países del mundo. El ajo contiene numerosos componentes activos, de entre los que destacan sus compuestos azufrados. El almacenamiento y manipulación del ajo produce diferentes compuestos (López, 2007) **(Figura 11)**.

Una de las presentaciones comerciales del ajo es el extracto de ajo envejecido (AGE) que es altamente biodisponible y presenta actividad biológica en animales y seres humanos (Lawal y Ellis, 2011). El AGE es resultante de la extracción del ajo fresco que fue almacenado en etanol por un tiempo aproximado de 20 meses a temperatura ambiente (**Figura 11**); el cual contiene compuestos únicos y beneficiosos (Charron et al.,2016; Yun et al., 2014).



**Figura 11.** Compuestos mayoritarios de azufre presentes en el ajo como la aliína (A), que al ser triturada y almacenada en solventes orgánicos (extracción química) forma diversos compuestos de los cuales destaca la S-allylcisteína (SAC) (B) (Charron et al., 2016).

Los principales cambios químicos en el extracto de ajo envejecido es la completa hidrólisis de los compuestos Y-glutamyl-cisteínas a S-allylcisteína (SAC) y S-1-propenil-cisteína (Kodera et al., 2002; Oommen et al., 2004; Yun et al., 2014). En varios estudios se ha demostrado que el AGE previene el daño

oxidativo en varios modelos animales, en humanos, in-vitro y en cultivos celulares. Esta propiedad se ha asociado con su principal componente: la S-alilcisteína (SAC) (Revisado en Colín-Gonzalez et al., 2012), donde la respuesta antioxidante de la SAC depende de la dosis y el tiempo de administración (Yun et al., 2014).

Se ha visto que la SAC es eficaz para inhibir la formación de radicales libres, refuerza el mecanismo de captación de radicales endógenos, aumenta los niveles de las enzimas antioxidantes, protege las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación, entre otros mecanismos.

### **3.13.1 S-Alilcisteína: Antioxidante exógeno como agente terapéutico de la exitotoxicidad.**

En el AGE, la SAC se mantiene sin cambios durante un máximo de 2 años. Es un polvo cristalino blanco con un olor característico, es higroscópico y su punto de fusión es 223.3 -223.7°C. Los cristales almacenados presentan un cambio de color amarillento pero no es indicio de transformación o descomposición (Kodera et al., 2002). Las propiedades antioxidantes de la SAC se han descrito en varios estudios, estas propiedades se deben al grupo alilo unido al átomo de azufre que tiene (Maldonado et al., 2011; Veskoukis et al., 2012; Weiss et al., 2013).

Maldonado et al. (2011) mostraron que la SAC es capaz de disminuir las concentraciones de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^{\cdot}OH$  y  $OONO^{\cdot}$  en diversos modelos que implican células endoteliales, modelo renal, un modelo de isquemia y modelo neurológico. También la SAC previene la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas.

Otros mecanismos antioxidantes asociados a la SAC es que disminuye las concentraciones de ácido hipocloroso (HClO) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) producido en las células gliales (Colín-González et al., 2015a). Además, tiene propiedades quelantes con los metales  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  evitando por lo tanto la reacción de Fenton (Revisado en Colín-González et al., 2012).

Finalmente, también se ha informado que la SAC inhibe la translocación del factor NF- $\kappa$ B al núcleo evitando así la señalización apoptótica inducida por este factor.

#### **4. Justificación.**

Las enfermedades neurodegenerativas no tienen un tratamiento eficaz, debido a que aún se desconocen o no están dilucidados por completo las vías moleculares que generan el daño neurodegenerativo. Como consecuencia no existe un blanco molecular que detenga por completo la neurodegeneración. De ahí la importancia de buscar agentes terapéuticos potenciales que traten la patología o prolonguen la vida de los pacientes, mejorando algunos de los síntomas que se presentan en cada enfermedad.

Experimentalmente, la administración intraestriatal de QUIN en roedores constituye uno de los modelos bioquímicos que más se utiliza para reproducir las alteraciones conductuales, morfológicas y bioquímicas que se observan en algunas enfermedades neurodegenerativas. Además, es una herramienta ampliamente utilizada para generar y estudiar el proceso de excitotoxicidad, que es un mecanismo común en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas como se describió anteriormente (apartado 3.10.2). En la mayoría de los experimentos que se han realizado con QUIN, una dosis de 240 nmol se considera tóxica y ya se ha informado que el tratamiento previo con SAC presenta un efecto neuroprotector, asociado a sus propiedades antioxidantes en tiempos cortos (horas).

En este trabajo se eligió administrar una dosis de 120 nmol de QUIN que se considera una dosis subtóxica (Fuentes-Bello et al., 2013) y evaluar la capacidad antioxidante de la SAC en un tiempo prolongado (6 días) simulando el daño progresivo y lento que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas. Además, hasta el momento no se ha estudiado el efecto de la administración de 120 nmol de QUIN y SAC sobre un tratamiento de 6 días.



La excitotoxicidad tiene como consecuencia la generación de ROS y RNS que también son importantes en el deterioro neuronal. Es por eso que el uso de antioxidantes exógenos podrían ser buenos agentes terapéuticos o preventivos. El antioxidante propuesto como agente terapéutico en este trabajo es la SAC, debido a que ya se ha demostrado que tiene buenas propiedades antioxidantes preventivas, tiene una alta biodisponibilidad, es soluble en agua, es estable y tiene una baja toxicidad.

## 5. Hipótesis

Si el estrés oxidativo es un evento importante en la inducción de muerte tras la administración de 120 nmol de QUIN, entonces la administración posterior de la SAC por un periodo de 6 días disminuirá los efectos tóxicos causados por esta toxina.

## **6. Objetivo general.**

Evaluar el efecto terapéutico de la SAC en un modelo animal, sobre las alteraciones conductuales y el daño cerebral que se induce en un modelo excitotóxico-prooxidante.

### **6.1 Objetivos particulares.**

- a. Evaluar el efecto de la SAC en una prueba conductual.
- b. Evaluar el efecto de la SAC sobre el daño histológico en la zona estriatal.
- c. Evaluar el efecto de la SAC sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD.
- d. Evaluar el efecto de la SAC sobre la actividad de la enzima de fase II: GST.
- e. Evaluar el efecto de la SAC sobre los niveles de estrés oxidante.

## 7. Materiales y métodos.

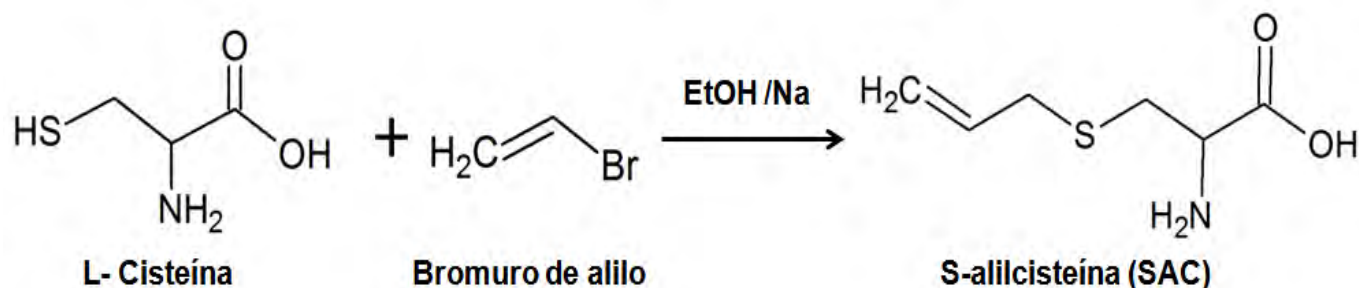
### 7.1 Reactivos.

El clorhidrato de L-cisteína, el bromuro de alilo, el sodio metálico ( $\text{Na}^\circ$ ), la albúmina bovina sérica (ABS), el ácido tricloroacético (TCA), el QUIN, la xantina, la xantina oxidasa, la apomorfina, el sulfato de estreptomycin,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), glutatión reducido (GSH), Nitroazul de tetrazolio (NBT), el 5,5'-ditio-bis(ácido-2-nitrobenzoico) y el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EE.UU.). El etanol, acetato de etilo, ácido acético se obtuvo de Reactivos Química Meyer (Pampano, Ciudad de México, México). El xilol se obtuvo de Golden Bell Reactivos (Cuenca, Ciudad de México, México). La solución salina isotónica (SSI) y el pentobarbital se obtuvieron de Grupo PISA (Guadalajara, Jalisco, México). El formaldehído, EDTA, tritratato de sodio y el  $\text{CuCl}_2$  se obtuvo de J.T Baker (Xalostoc, Edo. de México, México). Los demás reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

### 7.2 Síntesis de SAC.

En un matraz bola con 90mL de etanol absoluto anhidro se adicionaron 30 mol de clorhidrato de L-cisteína monohidratada. Se puso en agitación constante y después de 5 min, se fue adicionando poco a poco pequeñas hojuelas de sodio metálico previamente secos. Al término de la adición se dejó en agitación constante durante 30 min. Se adicionaron 30 nmol de bromuro de alilo (**Figura 12**) y se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente y posterior a eso se añadió agua destilada fría para obtener una solución incolora que se dejó en agitación durante 1h. Se evaporó el etanol por destilación y se agregaron 2.5ml de ácido acético (pH= 5.6). El precipitado formado se filtró al vacío y se dejó secar. Al compuesto obtenido se le determinó el punto de fusión en un aparato

Fisher-Johns y se comparó con el estándar. Se obtuvieron 2.98g de SAC que fue un polvo cristalino amarillo, de olor característico, el rendimiento de la reacción fue de 61.8% y el punto de fusión fue de 223.3°C-223.7°C.



**Figura 12.** Reacción química llevada a cabo para sintetizar la SAC.

### 7.3 Animales.

Se emplearon ratas Wistar macho con un peso entre 280-320 g, provistas por el bioterio de la Facultad de Medicina. Se colocaron 5 animales por caja con alimento y agua *ad libitum*. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ( $25\pm 10^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $50\pm 10\%$ ) y luz (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad). Durante los experimentos se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y utilizar el menor número posible de los mismos.

### 7.4 Grupos experimentales y esquema de administración.

Los animales fueron seleccionados aleatoriamente y se formaron cuatro grupos, cada grupo tuvo un número total de ratas diferente, como se menciona a continuación:

#### **Grupo 1. Control (SSI):**

Administrado con SSI (solución salina isotónica) en el estriado y SSI oral; (11 individuos totales: 7 ratas para pruebas bioquímicas y 4 para cortes histológicos).

## Grupo 2. S-alilcisteína (SAC):

Administrado con SSI en el estriado y SAC oral; (12 individuos totales: 8 ratas para pruebas bioquímicas y 4 para cortes histológicos).

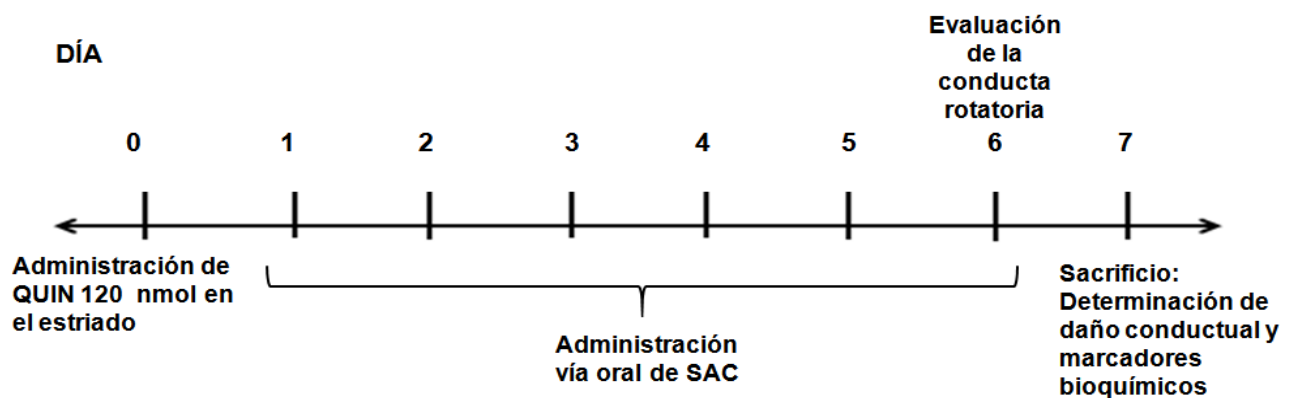
## Grupo 3. Ácido quinolínico (QUIN):

Administrado con QUIN 120 nmol en el estriado y SSI oral; (13 individuos totales: 8 ratas para pruebas bioquímicas y 5 para cortes histológicos).

## Grupo 4. QUIN + SAC:

Administrado con QUIN en el estriado y SAC oral; (11 individuos totales: 6 ratas para pruebas bioquímicas y 5 para cortes histológicos).

El procedimiento experimental se llevó a cabo durante un periodo de 7 días donde el día cero corresponde a la administración intraestriatal de 1  $\mu$ L de QUIN 120 nmol o bien 1  $\mu$ L de SSI según el grupo al que pertenecía cada animal. Veinticuatro horas después a la inyección en el estriado se administró durante 6 días cada 24 h por vía oral, una dosis de 100 mg/kg de SAC o bien SSI (como vehículo) según el grupo. Las ratas se pesaron los días 0, 4 y 6. En el sexto día, el último día de administración de SAC, se llevó a cabo la prueba de conducta rotatoria. Finalmente, el séptimo día se sacrificaron los animales para obtener de algunos animales el estriado fresco y de otros animales el cerebro completo obtenidos por perfusión (**Figura 13**).



**Figura 13.** Esquema del procedimiento experimental.

### **7.5 Cirugía estereotáxica.**

Esta cirugía se lleva a cabo con el fin de realizar la administración intraestriatal de QUIN en los animales. Para esto, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg *i.p.*) y 20 min después se infundió 1  $\mu$ L de QUIN o SSI según el grupo (empleando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ L) en las siguientes coordenadas estereotáxicas en relación con el Bregma: +0.5 mm anterior, -2.6 mm lateral y -4.5 mm ventral a la dura madre.

### **7.6 Conducta rotatoria.**

Se evaluó 6 días después de la inyección intraestriatal. Los animales se inyectaron con apomorfina (1mg/Kg/s.c. en SSI) y cada uno se colocó en una caja de acrílico para su observación. Cinco minutos después de la inyección con apomorfina; en cada animal, se registró el número de giros ipsilaterales a la lesión durante 1 h. Se consideró un giro cuando el animal dio una vuelta completa de 360°.

### **7.7 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E).**

El séptimo día, algunos de los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (100mg/Kg *i.p.*) y el cerebro se perfundió por vía cardiaca con SSI fría, seguida de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS). Posteriormente, los tejidos se incluyeron en bloques de parafina para obtener cortes coronales de 5 micras de espesor, que se colocaron en portaobjetos.

Los cortes se sometieron al siguiente procedimiento:

Xilol (30 min) » Alcohol-Xilol (3 min) » Alcohol I 100% (3 min) » Alcohol II 100% (3 min) » Alcohol I 96% (3 min) » Alcohol II 96% (3 min) » H<sub>2</sub>O destilada (3 min) » Hematoxilina (20 seg) » Enjuagar con agua » Amoniaco (10 seg) » Eosina (20

seg) » Alcohol I 96% (3 min) » Alcohol II 96% (3 min) » Alcohol I 100% (3 min) » Alcohol II 100% (3 min) » Alcohol-Xilol (3 min) » Xilol (30 min) . Una vez llevado a cabo este procedimiento, los cortes se cubrieron con resina para mantenerse y ser vistos al microscopio a 10X y 40X.

### **7.8 Preparación del homogenado.**

El séptimo día algunos de los animales se sacrificaron por decapitación (previa desensibilización con pentobarbital) extrayendo rápidamente el cerebro y preservándolo en hielo mientras se extraía el estriado. Posterior a eso se preparó el homogenado de la siguiente manera:

Procedimiento: 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis, 0.5  $\mu$ L de aprotinina, 0.5  $\mu$ L de leupeptina, 0.5  $\mu$ L de pepstatina y 2.5  $\mu$ L de fluoruro fenilmetilsulfonilo por cada muestra. Se adicionó la solución anterior al estriado (misma cantidad por estriado) y se sonicó con el equipo SonicsVibraCell™ durante 10-15 seg. Se centrifugó y el sobrenadante se utilizó para: a) Cuantificar la cantidad de proteína en las muestras por método de Lowry; b) Cuantificar la cantidad de proteínas oxidadas (marcador de daño oxidativo); y c) Medir la actividad de las enzimas antioxidantes. Las muestras se preservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **7.9 Método de Lowry.**

Este método se utilizó para calcular la cantidad de proteínas totales por muestra con ayuda de una curva con ABS 0.05% (5-50  $\mu$ g) y posterior a eso, se midió las absorbancia de cada una de las muestras.

### **7.10 Marcador de daño oxidativo.**

Se añadieron 150  $\mu$ L de una solución de sulfato de estreptomycin al 10% al homogenado y se incubó durante 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posterior a las 24h, las muestras



se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocaron en tubos. A cada tubo se le añadió DNPH 10 mM y se incubó 1 h en la oscuridad. Posteriormente se añadió ácido tricloroacético al 20%, se agitó e incubó durante 10 min a 4°C, se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el botón con ácido tricloroacético al 10%, se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces con etanol-acetato de etilo, en cada lavado se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4°C; al final se evaporó el etanol-acetato de etilo.

Se resuspendió el precipitado en guanidina 6 M y se preparó una curva de calibración con ABS 4mg/mL (0.26-2mg/mL). Se leyó la absorbancia a 370 y 280 nm. La cantidad de grupos carbonilo se expresó como nmol/mg de proteína.

## **7.11 Actividad de las enzimas antioxidantes.**

### **7.11.1 Cuantificación de SOD**

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 mM, albúmina 0.006% y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 49 mM. A 408 µL de la mezcla de reacción se añadieron 85 µL de homogenado, la reacción inicio con la adición de 7 µL de xantina oxidasa 168 U/L. Se preparó un blanco para cada muestra sin xantina oxidasa y un tubo de 100% de reducción del NBT sin homogenado. Los tubos se incubaron a 27°C durante 15 min y la reacción se detuvo con 165 µL de cloruro de cobre 0.8 mM, se leyó la absorbancia a 560 nm. La actividad se expresó en U/mg de proteína.

### **7.11.2 Cuantificación de CAT.**

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0. A 750 µL de la mezcla de reacción se añadieron 25 µL del homogenado e inmediatamente se registraron los cambios de absorbancia a 240 nm a temperatura ambiente durante 2.5 min cada 30 s. La actividad se expresó en k/mg de proteína.

### **7.11.3 Cuantificación de GST.**

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.0, GSH 10 mM y EDTA 1 mM. A 850 µL de la mezcla de reacción se añadieron 100 µL de homogenado y 50 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 10 mM para dar inicio a la reacción. La aparición del complejo GSH-dinitrobenzeno fue medido por espectrofotometría a 340 nm (durante 3 min cada 30 s). La actividad se expresó en U/mg de proteína.

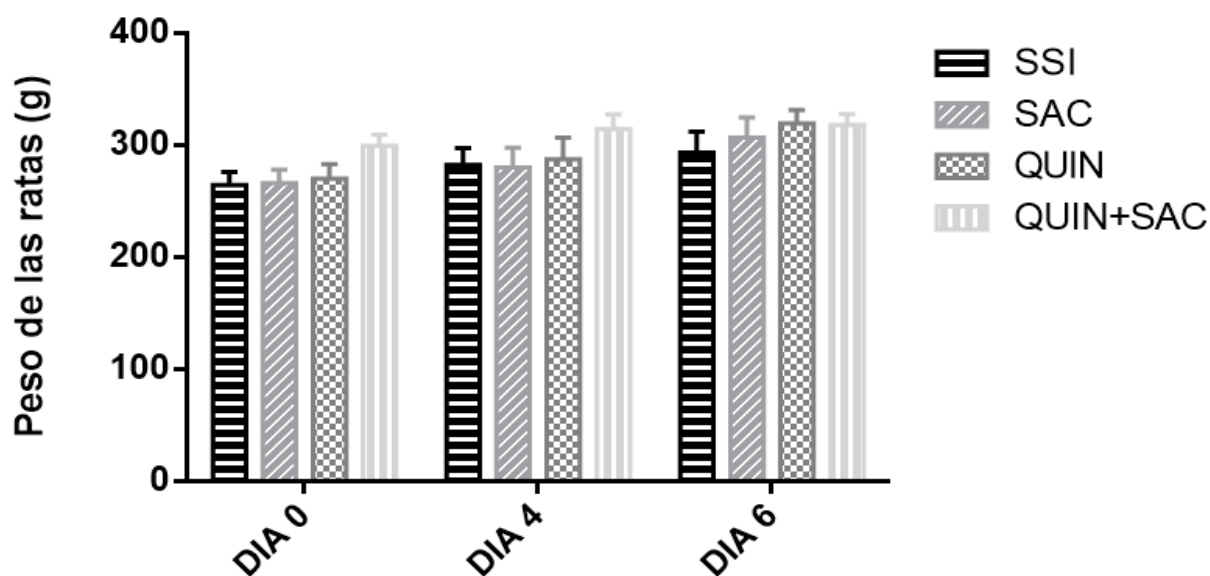
## **7.12 Análisis estadístico.**

Todos los resultados se expresaron como valores promedio ± el error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (GraphPad Prism 6.0). Los niveles de significancia considerados fueron de  $p < 0.05$  para todas las pruebas.

## 8. Resultados.

### 8.1 Peso de las ratas.

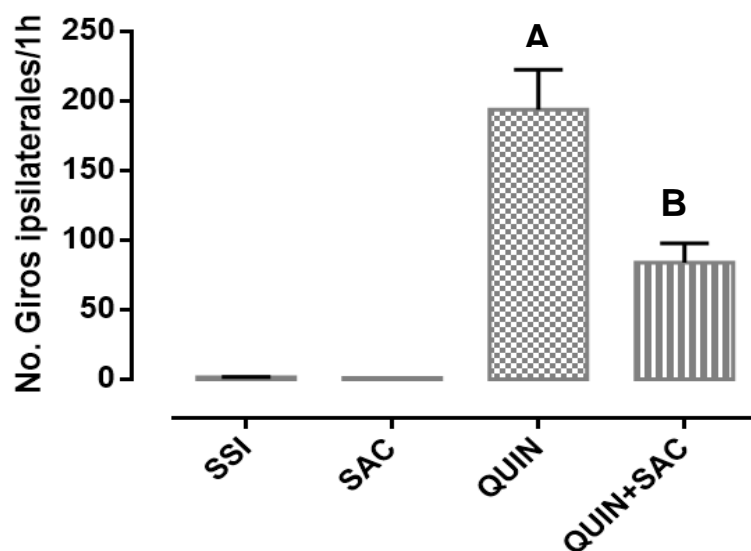
El peso de las ratas de los cuatro grupos experimentales fue medido el día 0, 4 y 6 (**Figura 14**). No hubo cambios significativos en el peso de las ratas ni en el índice de mortalidad.



**Figura 14.** Efecto de la s-allicisteína (SAC) sobre el peso de los animales tratados con ácido quinolínico 120nmol (QUIN). La SAC se administró en una dosis de 100 mg/Kg de peso, iniciando 24 h después de la administración de QUIN y durante 6 días cada 24 h. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. El número de animales empleados fue de 11-13 animales por grupo.

### 8.2 Conducta rotatoria.

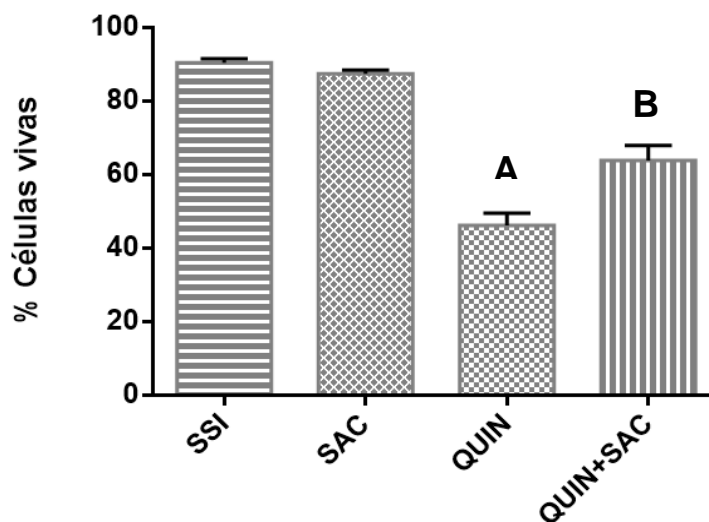
Los grupos SSI y SAC no presentaron ningún tipo de conducta rotatoria después de la administración con apomorfina. El tratamiento con QUIN aumentó el número de giros a 206, los cuales disminuyeron significativamente por el tratamiento con SAC a 104 en el grupo QUIN+SAC (**Figura 15**).



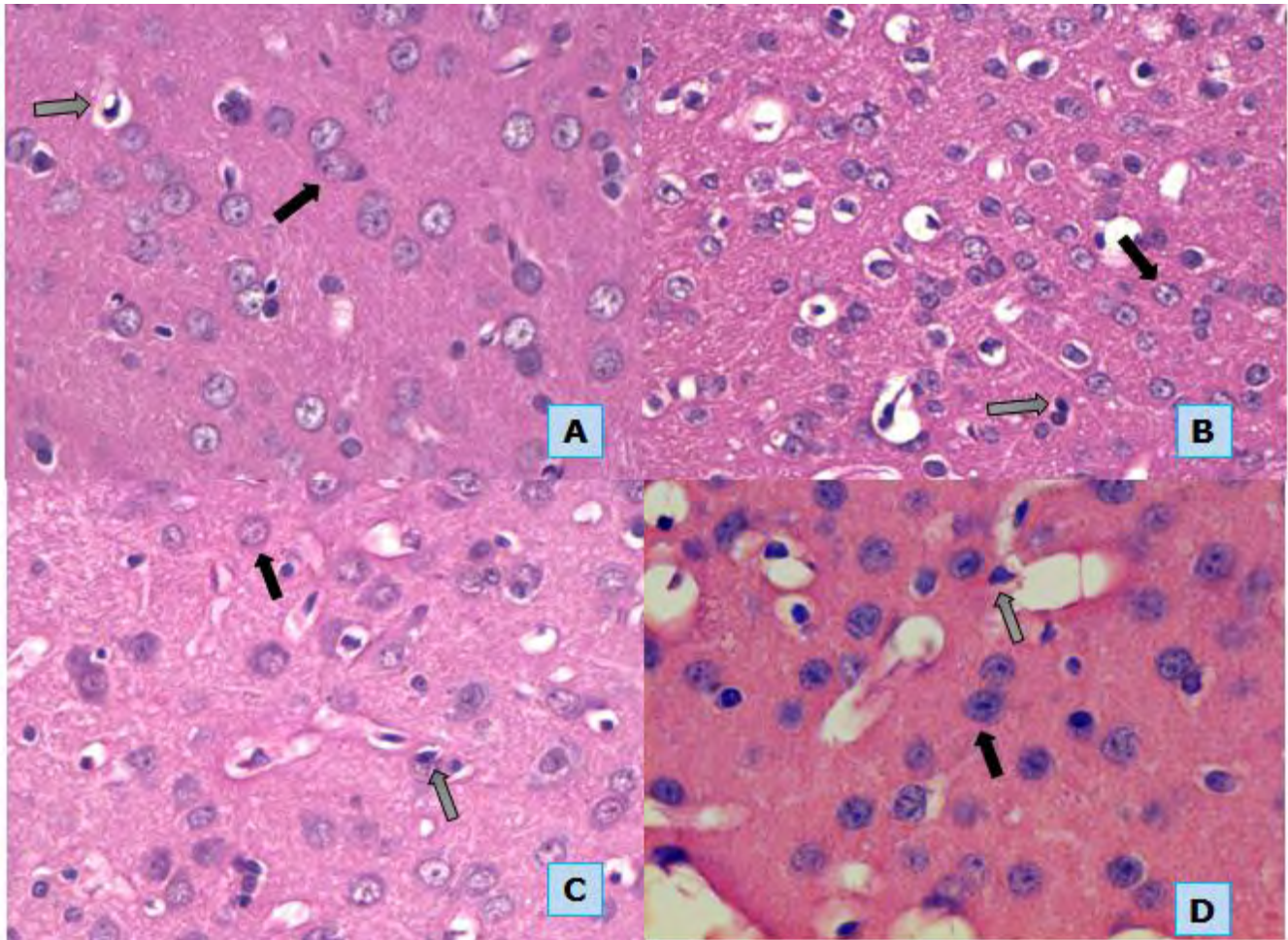
**Figura 15.** Efecto de la S-allicisteína (SAC) sobre la conducta rotatoria inducida con ácido quinolínico 120 nmol (QUIN). La SAC se administró en una dosis de 100 mg/Kg de peso, iniciando 24 h después de la administración de QUIN y durante 6 días cada 24 h. El sexto día se administró apomorfina 1 mg/Kg. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. El número de animales empleados fue de 11-13. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) A vs el grupo SSI, B vs el grupo QUIN.

### 8.3 Tinción de H&E.

La administración de QUIN disminuyó significativamente el porcentaje de células vivas mientras que el tratamiento con SAC bloqueó la muerte celular (**Figura 16**).



**Figura 16.** Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre el porcentaje de células vivas inducido con ácido quinolínico 120 nmol (QUIN) en el estriado. La SAC se administró en una dosis de 100 mg/Kg de peso, iniciando 24 h después de la administración de QUIN y durante 6 días cada 24 h. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. El número de animales empleados fue de 4-5 animales. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) A vs el grupo SSI, B vs el grupo QUIN.

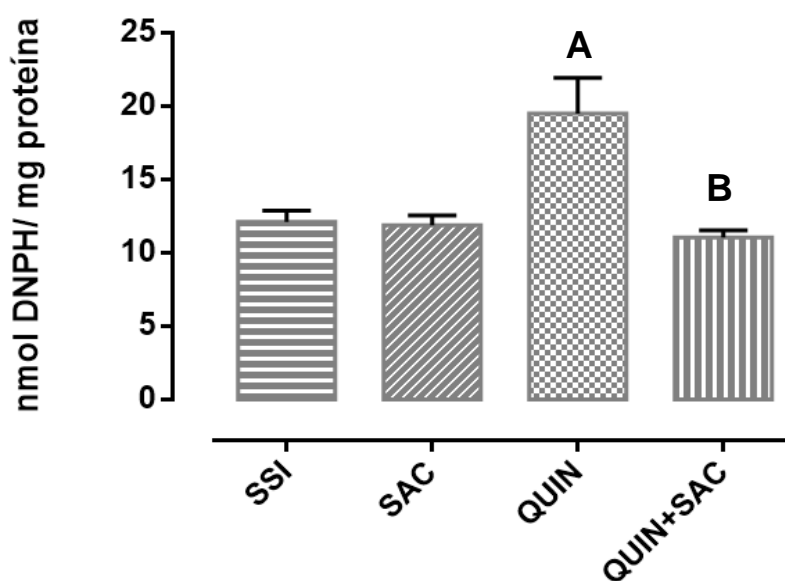


**Imagen 1.** Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre las alteraciones morfológicas inducidas con ácido quinolínico 120 nmol (QUIN) en el estriado. La SAC se administró en una dosis de 100 mg/Kg de peso, iniciando 24 h después de la administración de QUIN y durante 6 días cada 24h. Se presentan micrografías de campo claro representativas de cada grupo teñido con H&E (40x). A: SSI, B: SAC, C: QUIN, D: QUIN + SAC. Las flechas negras muestran células vivas y las flechas grises representan células muertas.

Se emplearon tres cortes coronales de cada estriado de rata de cada grupo. Se contabilizó el número total de células morfológicamente normales y el número total de células degeneradas por campo (40X). Se eligieron como células sanas aquéllas cuyo núcleo y citoplasma permanecieron íntegros y bien definidos. Se tomaron como células dañadas aquéllas cuyo núcleo no fueron visualmente distinguibles o sí presentaban algún tipo de muerte celular, además de presentar un citoplasma destruido (**Imagen 1**).

#### 8.4 Marcador de daño oxidativo.

El tratamiento con QUIN incrementó el nivel de proteínas oxidadas, el cual disminuyó a niveles basales con la administración de SAC (**Figura 17**).

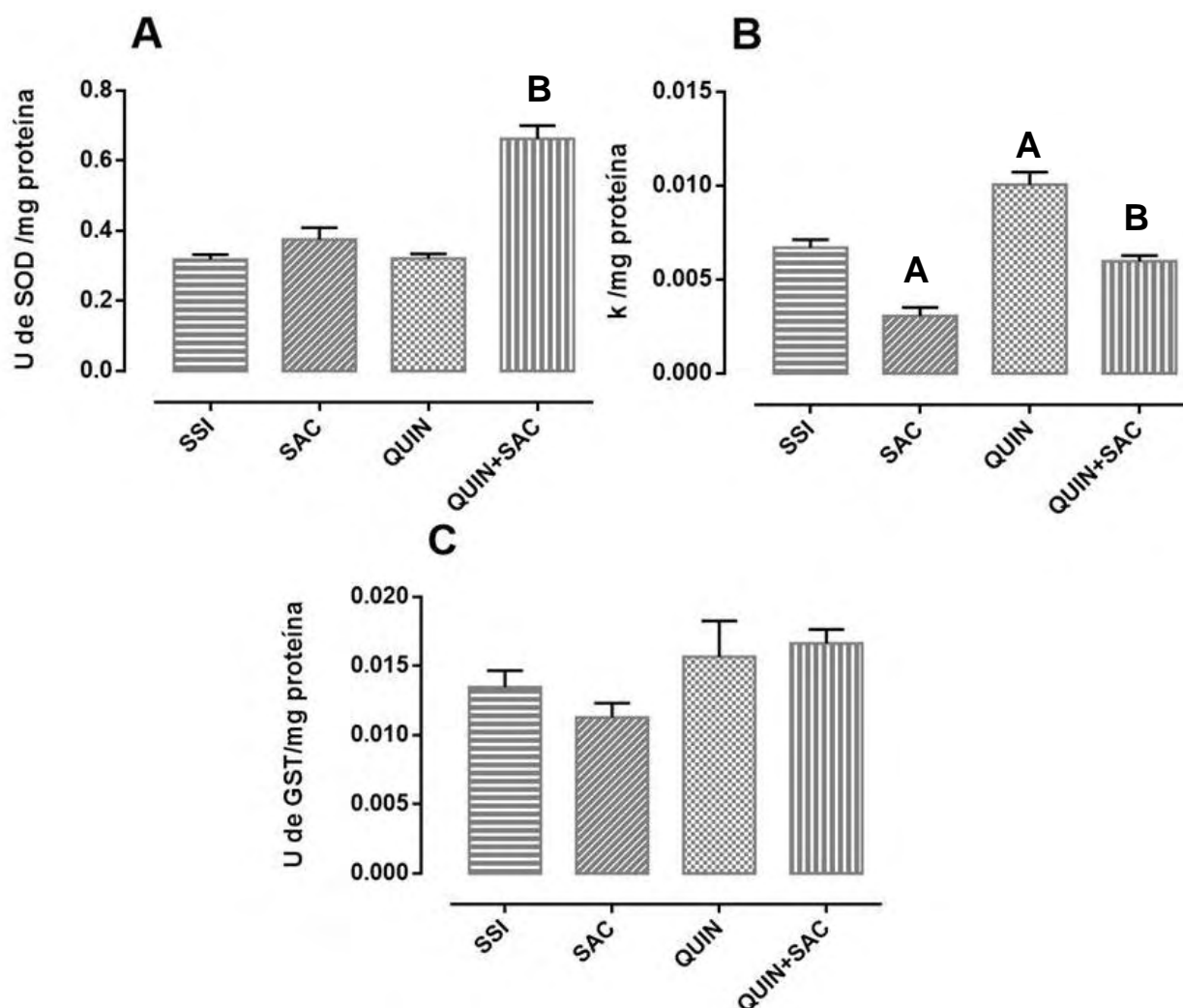


**Figura 17.** Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre los niveles de proteínas oxidadas inducidas con ácido quinolínico 120 nmol (QUIN) en estriado. La SAC se administró en una dosis de 100 mg/Kg de peso, iniciando 24 h después de la administración de QUIN y durante 6 días cada 24 h. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. El número de animales empleados fue de 5-6. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) A vs el grupo SSI, B vs el grupo QUIN.



### 8.5 Actividad de las enzimas antioxidantes.

No se observaron cambios en la actividad de SOD con el tratamiento con QUIN, solo se observó un incremento en la actividad de SOD en el grupo QUIN+ SAC (**Figura 18 A**). Por otro lado, el tratamiento sólo con SAC disminuyó la actividad de CAT respecto al grupo SSI; mientras que el tratamiento con QUIN incrementó la actividad de esta enzima y la administración de SAC (grupo QUIN+ SAC) la disminuyó (**Figura 18 B**). Finalmente, no se observaron cambios significativos en la actividad de la GST (**Figura 18 C**).



**Figura 18.** Efecto de la S-alicisteína (SAC) y el ácido quinolínico 120 nmol (QUIN) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: A: superóxido dismutasa (SOD); B: catalasa (CAT); C: glutatión-S-transferasa (GST). La SAC se administró en una dosis de 100 mg/Kg de peso,

iniciando 24h después de la administración de QUIN y durante 6 días cada 24 h. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$ SEM. El número de animales empleados fue de 4-8. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) A vs el grupo SSI, B vs el grupo QUIN.



## 9. Discusión.

Se sabe que la excitotoxicidad inducida por la administración del QUIN está relacionada con un incremento de calcio, muerte neuronal y daño oxidativo, entre otros (Pérez-Severiano et al., 2004). Dado que el daño oxidativo es un mecanismo secundario a la excitotoxicidad (Colín-González et al., 2015b; Pavlov et al., 2010) el tratamiento con un antioxidante podría llegar a disminuir los efectos producidos.

En este estudio se examinó el efecto terapéutico de la administración de la SAC, sobre las alteraciones conductuales y diferentes actividades antioxidantes en el estriado inducido por el QUIN.

Se encontró que el QUIN induce daño celular de aproximadamente un 60% (**Imagen1; Figura 16**) determinado por la tinción de H&E, la cual se basa en las propiedades ácidas o básicas que tienen los componentes celulares. Las membranas se tiñen de color azul violáceo, mientras que casi todas las estructuras citoplasmáticas adquieren un color rosado (Geneser, 2000). La cantidad de células vivas se redujo significativamente en el grupo tratado con QUIN, ya que las células muertas presentaban la membrana del núcleo o la membrana celular destruida (**Imagen 1, c**) indicando muerte celular. Esta tinción no puede asegurar el tipo de muerte celular ni el tipo de célula que se están muriendo pero varios estudios sugieren que la muerte celular es de tipo apoptótica y necrótica (Javed et al., 2011; Lawal y Ellis, 2011; Lee, 2016; Oommen et al., 2004). Además, se observa una recuperación del tejido al aumentar significativamente el número de células vivas en el grupo QUIN+SAC (**Figura 16**) sin ser igual que los controles lo que indican que hubo un efecto protector por parte de la SAC y evitó la muerte neuronal en el estriado. Por otro

lado, el QUIN induce alteraciones conductuales. Este estudio se llevó a cabo con la administración de apomorfina que es un compuesto excitador de los receptores dopaminérgicos. Cuando una rata tiene sus 2 hemisferios en condiciones normales o “sanas” existen las mismas cantidades de receptores en ambos hemisferios, por lo que la rata no presenta una conducta de rotación. Pero si uno de los hemisferios está dañado y contiene un menor número de receptores, al administrar apomorfina la rata tiende a girar al lado donde se encuentra el daño (giros ipsilaterales). El grupo QUIN fue el que presentó un mayor número de giros ipsilaterales lo cual indica que este grupo tiene algún tipo de daño neuronal mientras que en el grupo administrado con QUIN+SAC, esta conducta se observa significativamente reducida, lo que indica una mejoría parcial en el daño ocasionado por QUIN.

Debido a que se observó un efecto de la SAC sobre las alteraciones conductuales e histológicas inducidas por el QUIN, se estudió el posible mecanismo involucrado en dicho efecto. En este sentido se exploró la participación de las propiedades antioxidantes de la SAC. Por ello, se cuantificó el nivel de proteínas oxidadas observando que el QUIN incrementó el nivel de este tipo de proteínas y que el tratamiento con SAC disminuyó este incremento **(Figura 17)**. Estos resultados sugieren que la SAC podría ser una buena alternativa para la recuperación del tejido sometido a estrés con QUIN.

Finalmente se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa para saber si ésta es la forma en la que la SAC actuó para evitar el estrés a los 7 días del daño excitotóxico inducido por QUIN.

En algunos estudios (b-González et al., 2015b; Javed et al., 2011; Pérez-Severiano et al., 2004) se ha demostrado cambio en la actividad de las enzimas antioxidantes.

En general podemos observar que las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GST no están participando en el efecto protector de la SAC en las condiciones empleadas; sin embargo el efecto como antioxidante directo (atrapador de especies antioxidantes) de la SAC si se puede inferir, ya que los niveles de proteínas oxidadas disminuyeron. Esto sugiere que otros mecanismos podría estar participando en el efecto protector observado de la SAC en este modelo sin embargo, esto aún deberá ser estudiado.

## **10. Conclusiones.**

La SAC disminuyó las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por el QUIN.

El efecto protector de la SAC podría estar asociado con su capacidad para disminuir el estrés antioxidante, ya que los niveles de proteínas oxidadas disminuyeron.

## **11. Perspectivas.**

Evaluar la capacidad antioxidante de la SAC sobre el efecto de diversas dosis de QUIN para comparar el efecto sobre un cerebro que tiene poco daño (dosis bajas de QUIN); a uno que está muy dañado (dosis altas de QUIN). Además, permitiría concluir la mejor forma de usar SAC de forma previa (para aquellas personas propensas a desarrollar la enfermedad) o durante la enfermedad y para determinar hasta qué grado de la enfermedad podría tener efecto benéfico.

Realizar ensayos con diferentes períodos de duración del tratamiento: ¿Durante cuánto tiempo se puede administrar SAC y seguir teniendo un efecto antioxidante? Se podría dar respuesta a esta pregunta si se realizaran experimentos a diferentes periodos del tratamiento.

Evaluar otras zonas del cerebro. Debido a que las enfermedades neurodegenerativas ocurren en diferentes regiones del Sistema Nervioso.

## 12. Referencias bibliográficas.

- Andersen, J. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*, 10 Suppl, S18–S25.
- Arimon, M., Takeda, S., Post, K., Svirsky, S., Hyman, B., Berezovska, O. (2015). Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. *Neurobiology of Disease*, 84, 109–119.
- Ashafaq, M., Khan, M., Raza, S., Ahmad, A., Khuwaja, G., Javed, H., ..., Islam, F. (2012). S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutrition Research*, 32, 133–143.
- Bayir, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33 (12 Suppl), S498-S501.
- Bhat, A., Dar, K., Anees, S., Zargar, M., Masood, A., Sofi, M., Ganie, S. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 74, 101-110.
- Bossy-Wetzell, E., Schwarzenbacher, R., Lipton, S., (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10 Supply, S2–S9.
- Brown, T., LeMay, H., Bursten, B., Burdge, J. (2004) p.855. México: Educación Pearson
- Charron, CS., Milner, JA., Novotny, JA. (2016). Garlic. *Encyclopedia of food and health*, Pages 184–190.
- Cobb, C., Cole, M. (2015). Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 84, 4–21.

- Colín-González, A., Ali, S., Túnez, I., Santamaría, A. (2015a). On the antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory properties of S-allyl cysteine: An update. *Neurochemistry International*, 89, 83–91.
- Colín-González, A., Becerril, H., Flores-Reyes, B., Torres, I., Pinzón, E., Santamaría, A.,..., Maldonado, P. (2015b). Acute restraint stress reduces hippocampal oxidative damage and behavior in rats: Effect of S-allyl cysteine. *Life Sciences*, 135, 165–172.
- Colín-González, A., Santana, R., Silva-Islas, C., Chánez, M., Santamaría, A., Maldonado, P. (2012). The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012(1).
- De la Cruz, V., Mora, P., Santamaría, A. (2013). Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *International Journal of Tryptophan Research*, 5, 1–8.
- Denzer, I., Münch, G., Friedland, K. (2016). Modulation of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases via activation of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 by food-derived compounds. *Pharmacological Research*, 103, 80–94.
- Dorado, C., Rugerio, C., Arancibia, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista Facultad Medicina UNAM*, 46(6), 229–235.
- Dunning, S., Rehman, A., Tiebosch, M., Hannivoort, R., Haijer, F., Woudenberg, J.,..., Moshage, H. (2013). Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2027–2034.

- Ellah, M., Okada, K., Goryo, M., Oishi, A., Yasuda, J. (2009). Superoxide dismutase activity as a measure of hepatic oxidative stress in cattle following ethionine administration. *The Veterinary Journal*, 182, 336-341.
- Forman, H., Davies, K., Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic Tone and Para-Hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol. Med*, 8, 66-93.
- Fuentes-Bello, A., Pérez, D., De la Cruz, V., Santamaria, A., Carrillo, P. (2013). Efectos a largo plazo de la coadministración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico en el estriado de rata. *Investigación En Discapacidad*, 2(1), 3–11.
- Gagliardi, R. (2000). Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Archivos de Neuro-Psiquiatria*, 58(2B), 583–588.
- Galea, E., Launay, N., Otin, M., Ruiz, M., Pamplona, R., Aubourg, P.,..., Pujol, A. (2012). Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822 (9), 1475–1488.
- Gan, L., Johnson, J. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 1208-1218.
- García, E., Limón, D., De La Cruz, V., Giordano, M., Muñoz, M., Maldonado, P.,..., Santamaria, A. (2008). Lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and neurochemical and behavioural deficits in different neurotoxic models: protective role of S-allylcysteine. *Free Radical Research*, 42(10), 892–902.
- García, E., Santana, R., Silva-Islas, C., Colín-González, A., Galván, S., Heras, Y., ..., Santamaría, A. (2014). S-allyl cysteine protects against MPTP-



induced striatal and nigral oxidative neurotoxicity in mice: Participation of Nrf2. *Free Radical Research*, 48(2), 159–167.

Geneser, F. (2000). *Histología*. Pp.29-40. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Gutowski, M., Kowalczyk, S. (2013). A study of free radical chemistry: Their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 60(1), 1–16.

Harrison, D. (2014). Pathophysiology: oxidative stress. *Journal of the American Society of Hypertension*, 8(8), 601–603.

Hatono, S., Jimenez, A., Wargovich, M. (1996). Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis*, 17(5), 1041–1044.

Hsu, C., Huang, C., Hung, Y., Yin, M. (2004). Five Cysteine-Containing Compounds Have Antioxidative Activity in Balb/cA Mice<sup>1</sup>. *The Journal of Nutrition*, 134(1), 149–152.

Javed, H., Khan, M., Khan, A., Vaibhav, K., Ahmad, A., Khuwaja, ..., Islam, F. (2011). S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research*, 1389, 133–142.

Juránek, I., Nikitovic, D., Kouretas, D., Hayes, A., Tsatsakis, A. (2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 240–247.

Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and

graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, 1, 244–257.

Kodera, Y., Suzuki, A., Imada, O., Kasuga, S., Sumioka, I., Kanezawa, A.,..., Ono, K. (2002). Physical, Chemical, and Biological Properties of S-Allylcysteine, an Amino Acid Derived from Garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 622–632.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650.

Lawal, A., Ellis, E. (2011). The chemopreventive effects of aged garlic extract against cadmium-induced toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 266–274.

Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., ..., Diao, X. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144, 234-240.

Lee, J. (2016). Mitochondrial drug targets in neurodegenerative diseases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(3), 714–720.

López, T. (2007). El ajo. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 26(1), 78–81.

Huitrón, R., Muñiz, P., Pineda, B., Chaverrí, J., Ríos, C., De La Cruz, V. (2013). Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1-14.

Maddison, D., Giorgini, F. (2015). The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40,

134–41.

Maldonado, P., Idaboy, J., González, A., Lira-Rocha, A., Jung-Cook, H., Campos, O.,....., Galano, A. (2011). Role of allyl group in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of S-allylcysteine. *Journal of Physical Chemistry B*, 115, 13408–13417.

Oommen, S., Anto, R., Srinivas, G., Karunagaran, D. (2004). Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 485, 97–103.

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*, 224(1–2), 128–137.

Pavlov, E., Gutiérrez, R., Zhang, Y., Kertesz, A., Hung, J., Espina, F., Colicos, M. A. (2010). Development of an in vitro model of neuronal activity induced excitotoxicity using photoconductive stimulation. *Cell Calcium*, 47(5), 441–448.

Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Pérez, M., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P. D., Medina-Campos, O. N., Ortiz-Plata, A., Santamaría, A. (2004). S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International*, 45(8), 1175–1183.

Pisoschi, A., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.

Rashid, K., Sinha, K., Sil, P. (2013). An update on oxidative stress-mediated

organ pathophysiology. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 584–600.

Rueda, C., Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Sanchez, P., Contreras, L., ...

Satrustegui, J. (2016). Glutamate excitotoxicity and Ca<sup>2+</sup>-regulation of respiration: Role of the Ca<sup>2+</sup> activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(8), 1158–1166.

Santana, R., Arzate, S., Pando, R., Cháñez, M., Avila, E., Acosta, G., Maldonado, P. (2014) Sulforaphane reduces the alterations induced by quinolinic acid: Modulation of glutathione levels. *Neuroscience*, 272, 188-198.

Siti, H., Kamisah, Y., Kamsiah, J. (2015). The role of antioxidant stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, 71, 41-46.

Veskoukis, A., Tsatsakis, A., Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 11–21.

Weiss, N., Papatheodorou, L., Morihara, N., Hilge, R., Ide, N. (2013). Aged garlic extract restores nitric oxide bioavailability in cultured human endothelial cells even under conditions of homocysteine elevation. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 162–167.

Yun, H., Ban, J., Park, K., Lee, C., Jeong, H., Han, S., Hong, J. (2014). Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 183–195.