Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: FITOFARMACOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE MATERIAL FRESCO DE *Allium sativum* L. COMO AGENTES PROTECTORES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL EN RATA

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACEUTICAS

P R E S E N T A

MARÍA ISABEL CERVANTES DÍAZ DE LEÓN

MATRÍCULA: 209383017

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

ASESORA INTERNA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

ASESORA EXTERNA: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2012.

EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE MATERIAL FRESCO DE *Allium sativum* L. COMO AGENTES PROTECTORES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL EN RATA

Vo.Bo. DEL COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

ASESORA INTERNA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

ASESORA EXTERNA: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ

MARÍA ISABEL CERVANTES DÍAZ DE LEÓN

MATRÍCULA: 209383017

EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE MATERIAL FRESCO DE *Allium sativum* L. COMO AGENTES PROTECTORES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL EN RATA

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DR. PAVEL MONTES DE OCA BALDERAS.

VOCAL: DR. NORMAND GARCÍA HERNÁNDEZ.

SECRETARIA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA.

RESUMEN: La isquemia cerebral transitoria (ICT), se caracteriza por la interrupción temporal del flujo sanguíneo cerebral debido a la obstrucción de un vaso sanguíneo, ocasionando la activación de mecanismos de daño (*e.g.* estrés oxidativo). Se ha demostrado que compuestos derivados del ajo tienen un efecto protector contra el daño isquémico pero los mecanismos de protección y el principio activo se desconocen. El objetivo de este estudio fue comparar el efecto protector y el mecanismo de acción del extracto de ajo envejecido (EAE) y los extractos hidroalcohólicos de endocarpo (ASD) y exocarpo (ASC) de ajo fresco, en la ICT inducida por la oclusión de la arteria cerebral media (OACM). El EAE fue adquirido con Wakunaga, el ASD y ASC se procesaron mediante maceración de ajo fresco en etanol acuoso al 20% durante 7 días. El ASD se fraccionó mediante cromatografía en columna obteniendo 3 fracciones primarias que se analizaron para determinar su efecto neuroprotector. Ratas Wistar macho adultas (n= 6-8) fueron sujetas a 2 h de OACM y 2 h de recuperación del flujo sanguíneo (reperfusión). Los extractos (dosis 360 mg/kg, i.p.) y las fracciones (120mg/kg, i.p.) se administraron al inicio de la reperfusión. El efecto protector fue evaluado por inmunofluorescencia para detectar la proteína neuronal NeuN. El efecto de los extractos en la regulación de genes implicados en la ICT, fue analizado mediante el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR-1 y NR-2B de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDARs) de la subunidad glutamato cisteína ligasa catalítica (GCLC) y del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) se evaluaron mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que el EAE, ASD y ASC previenen la disminución en la inmunorreactividad de NeuN inducida por la ICT en la corteza somatosensorial secundaria. Lo que demuestra que los extractos frescos tienen compuestos que confieren un efecto protector contra el daño isquémico, pero se desconoce si son diferentes a los que se forman en el período de envejecimiento (20 meses). Todos los extractos indujeron una disminución en la expresión del ARNm de NR-1 y NR-2B que puede traducirse en la disminución de NMDAr sobre-activados. Se ha demostrado que los antioxidantes pueden inducir sobre-expresión del gen GCLC pero el EAE, ASD y ASC lo disminuyeron. Por último, las tres fracciones de ASD no generaron diferencias significativas en la expresión de GCLC, NR1 y NR2-B por lo que no se pudo determinar el principio activo presente en ASD. Los resultados sugieren que diferentes preparaciones de ajo tienen compuestos con capacidad protectora pero es necesario realizar otros estudios para determinar la identidad de los compuestos con actividad biológica.

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS FUE **FINANCIADO** Y **REALIZADO** EN EL **LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL** DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUÁREZ" Y EN EL **LABORATORIO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS NATURALES** DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ESTE TRABAJO SE LLEVO A CABO CON EL APOYO DE LA BECA OTORGADA POR EL **CONACYT** (REGISTRO: 233144).

CON LA BECA OTORGADA POR EL **IMSS** AL AUTOR DE LA TESIS (MATRÍCULA: 99095926) DESDE ENERO DE 2011 A ENERO DE 2012.

CON EL FINANCIAMIENTO POR PARTE DE LA **COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS** PARA LA DIFUSIÓN DEL PRESENTE TRABAJO EN CONGRESOS DE CARÁCTER NACIONAL E INTERNACIONAL.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Metropolitana,** institución educativa a quien le debo mi carrera profesional, la maestría y todo lo que soy; *tantas veces criticada, otras tantas vanagloriada, sin embargo, sigue adelante...no son los golpes ni las caídas las que hacen fracasar al hombre; sino su falta de voluntad para levantarse y seguir adelante.*

A todas las personas que conforman la **Coordinación de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas** por su apoyo incondicional tanto en mi capacitación como en la difusión de mi proyecto, porque sabe que *las personas con éxito, son aprendices de por vida, buscan nuevas habilidades, ideas e inventos; camino que conduce al aprendizaje y finalmente a la excelencia.*

A la **Dra. Penélope Aguilera Hernández**, mi sincero agradecimiento por compartir conmigo parte de su proyecto, por todo el tiempo que me ha dedicado, por sus enseñanzas y sugerencias que tanto provecho he obtenido, *sin llegar a un juicio, solo comprendió la evolución de mi aprendizaje y estimuló con sinceridad la aceptación de mis equivocaciones.*

A **Dr. Fernando Calzada Bermejo**, por su apoyo para la realización de este proyecto y sus invaluables enseñanzas. *Ideas que reflejan resultados y objetividad.* Mi gratitud y respeto.

A la **Dra. Aída Solís Oba**, por sus exhortaciones positivas que permiten valorar lo que hacemos o dejamos de hacer: *cada cosa que obtenemos en la vida no llega como un regalo...llega como recompensa al esfuerzo por alcanzarla.*

Al **Dr. Pável Montes de Oca Balderas**, por sus valiosas sugerencias al contenido del trabajo. Siempre tomaré en cuenta que *en cuestiones del saber, se pierde lo que se guarda; solo se gana lo que se da.*

Al **Dr. Normand García Hernández**, por sus recomendaciones para enriquecer el contenido de la tesis. Agradezco infinitamente su ayuda.

DEDICATORIAS

Reconozco y agradezco primeramente a **Dios**, quien ha estado a mi lado en todo momento dándome vida, fortaleza y salud, necesarias para continuar luchando día tras día.

En memoria y admiración, para mis queridos padres **Alejandro**† e **Isabel**†, quienes me dieron todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, perseverancia y mi empeño, todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio, estoy segura que en este día en especial, han bajado del cielo para estar conmigo. Los amo profundamente.

A mi hermano **Alejandro**, a quien quiero entrañablemente, les agradezco su compañía, porque a su lado he experimentado los altibajos de la vida.

A **Irán**, por su paciencia, por su empeño, por su fortaleza, por su amor y porque es la persona que directamente ha sufrido las consecuencias del trabajo realizado.

A la **Sra. Lourdes** y al **Sr. Alberto** que con el tiempo y experiencias compartidas se han convertido en mi segunda familia. Gracias por su presencia en mi vida. Son sin duda un gran ejemplo a seguir.

A mis **tíos Armando**†, **Jesús**†, **Salvador**†, **Ángela**, **Josefina**, **Carlos** y **Esther**, a mis primas **Miriam**, **Gina**, **Nancy** y **Moni** que gracias a su cariño, apoyo y motivación, logré ver la luz en momentos de obscuridad.

A mis queridas amigas **Angélica**, **Tana** y **Ángeles** con las cuales he compartido alegrías, tristezas e incontables experiencias. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme.

Para todos ¡Muchas Gracias!

ÍNDICE **PÁG.**

1. INTRODUCCIÓN 11

2. ANTEDECENTES 12

3. MARCO TEÓRICO 14

3.1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL 14

3.2. EPIDEMIOLOGÍA 16

3.3. FACTORES DE RIESGO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN 17

3.4. FISIOPATOLOGÍA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITORIA (ICT) 18

3.4.1. Mecanismos bioquímicos y moleculares durante la ICT 20

3.4.2. Importancia del receptor de glutamato tipo NMDA en la ICT 21

3.4.2.1. Clasificación de los receptores de glutamato 21

3.4.2.2. Regulación de la transcripción de NR1, NR2 y NR3 24

3.4.3. Daño celular mediado por radicales libres producidos en la ICT 25

3.4.4. Mecanismos de defensa contra las ERO y la importancia de glutatión en la ICT 27

3.4.5. Papel de la enzima ligasa de glutamato y cisteína en la síntesis de glutatión 28

3.4.5.1. Regulación genética de la subunidad GCLC por antioxidantes y estrés oxidativo 29

3.5. NEUROPROTECCIÓN COMO TRATAMIENTO EN LA ICT 30

3.6. *Allium sativum* L. 32

3.6.1. Contenido alimenticio y composición química 33

3.6.2. Preparados de ajo y su función antioxidante 36

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 40

5. HIPÓTESIS 40

6. OBJETIVO GENERAL 41

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES 41

7. MATERIALES Y MÉTODOS 41
7.1. MATERIAL VEGETAL 41
7.2. ANIMALES 42
7.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DEL BULBO DE Allium sativum L 42
7.4. GRUPOS EXPERIMENTALES 43
7.5. ADMINISTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS 43
7.6. INDUCCIÓN DE LA ICT 43
7.7. PRUEBAS CONDUCTUALES PARA DETERMINAR EL DÉFICIT NEUROLÓGICO 45
7.8. INCLUSIÓN EN FRIO DE LOS TEJIDOS CEREBRALES 45
7.9. INMUNOFLUORESCENCIA 46
7.10. FRACCIONAMIENTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA 49
7.11. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL 49
7.12. TRANSCRIPCIÓN REVERSA 50
7.13. PCR EN TIEMPO REAL 50
7.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 50
8. RESULTADOS
8.1. RENDIMIENTO Y CARACTERISTICAS FISICAS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DEL BULBO DE *Allium sativum* L. 51
8.2. INMUNOFLUORESCENCIA: INMUNOREACTIVIDAD POSITIVA PARA NeuN 51
8.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO 54
8.4. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE AJO EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL GEN DE GCLC 61
8.5. INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS DE AJO EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR NMDA 63
8.5.1. Expresión de NR1 y NR2-B 63

8.6. INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS DE AJO EN LA EXPRESION RELATIVA DEL ARNm DEL GEN DE PAI-1 66

9. CONCLUSIONES 74

10. REFERENCIAS 75

11. ANEXO I: DIFUSIÓN 95

12. ANEXO II: ABREVIATURAS 98

1. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad vascular isquémica cerebral transitoria (ICT), es la principal causa de discapacidad en adultos y la segunda causa de mortalidad en el mundo (OMS, 2011). En México, en el periodo de 2000 a 2004, la ICT fue la tercera causa de muerte y a partir del año de 2008, se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública (Sistema Nacional de Salud (SNS), 2008). La ICT se caracteriza por un déficit neurológico focal, secundario a una disminución o interrupción temporal del flujo sanguíneo cerebral en un territorio vascular arterial específico (generado principalmente por el desprendimiento de un trombo plaquetario, embolismo en áreas arterioescleróticas, estenosis arterial severa e hipotensión arterial sostenida), lo que produce la pérdida del aporte de oxígeno, nutrientes y factores provenientes de la sangre que activan diversos mecanismos de daño celular entre los que destacan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), inflamación y muerte neuronal (NINDS, 1990; Cabrera y cols., 2008). El conocimiento de la fisiopatología de la isquemia cerebral (ó *ictus* isquémico) ha avanzado sustancialmente durante las últimas dos décadas y como consecuencia de ello, se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas con dos objetivos fundamentales: 1) restablecer el flujo sanguíneo lo antes posible mediante el uso de anticoagulantes e intervenciones quirúrgicas y 2) minimizar el daño neuronal mediante terapias neuroprotectoras que limiten la progresión de la cascada isquémica en el tejido cerebral una vez que ésta se ha iniciado (Fernandez y cols., 2008). Hasta el momento, no existen fármacos neuroprotectores aprobados para su uso en la clínica, pero a nivel experimental, se han probado varios compuestos que han mostrado resultados prometedores (Martinez y cols., 2005; Fernandez y cols., 2008; Tymianski y cols., 2011), tal es el caso de diversos compuestos azufrados obtenidos a partir de extractos de ajo (*Allium sativum* L.) (Akopov y cols., 1996; Ichikawa y cols., 2006; Corzo y cols., 2007; Brunetti y cols., 2009; Alkeathy y cols., 2010; Aguilera y cols., 2010 entre otros). Sin embargo, aún falta información contundente que permita explicar y validar su empleo. Además, aunque se ha descrito que el efecto neuroprotector de los compuestos azufrados radica en su poder antioxidante (Imai y cols., 1994; Borek, 2001; Amagase y cols., 2001; Ichikawa y cols., 2006, entre otros), aún existen interrogantes sobre sus mecanismos de acción y su posible participación en la regulación de genes implicados en la respuesta adaptativa ante la ICT.

2. ANTECEDENTES.

Desde hace algunos años, el EAE ha sido empleado como agente preventivo para retrasar los procesos innatos del envejecimiento y disminuir la incidencia de diversas enfermedades (Efnedy y cols., 1997; Amagase y cols., 2001; Ichikawa y cols., 2006; Alkreathy y cols., 2010). En estudios realizados sobre modelos de superficies arteriales simuladas, el EAE ha demostrado poseer propiedades inhibitorias de la agregación plaquetaria inducida por agentes adherentes como el colágeno, ácido araquidónico o adrenalina (McRae, 2005). Se ha demostrado que los compuestos sulfurosos de ajo solubles en agua como la S-alil-cisteina (SAC) y S-alil-mercaptocisteina (SAMC), actúan inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las células endoteliales, disminuyendo los niveles de tromboxano (McRae, 2005). Además, se ha reportado que el EAE tiene un efecto neuroprotector que puede estar asociado con el control de los radicales libres generados en la ICT (Akopov y cols., 1996; Ichikawa y cols., 2006; Corzo y cols., 2007; Brunetti y cols., 2009; Alkeathy y cols., 2010; Aguilera y cols., 2010 entre otros). Sin embargo, aunque existe información que respalda dichos beneficios, poco se sabe sobre la necesidad de que el extracto de ajo fresco requiera del largo proceso de añejamiento de hasta 20 meses para adquirir las propiedades farmacológicas. De hecho, después de varios días de maceración del ajo fresco, en una disolución hidroalcohólica, se logra extraer diversos compuestos azufrados a los que se les ha atribuido el efecto antioxidante como; alicina, ajoeno, *S*-propenil-*S*-cisteína, γ-glutamil-*S*-alilcisteina y SAC en diferente concentración dependiendo del número de días de maceración (Amagase y cols., 2006; Borek y cols., 2001; Lawson y cols., 2005; Greenblatt y cols., 2006; Rasul y cols., 2011).

Con esta evidencia, en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, CORCE, Centro Médico Nacional Siglo XXI se analizaron los extractos hidroalcohólicos de endocarpo o diente (ASD) y exocarpo o cáscara (ASC) de ajo fresco así como del envejecido (EAE), mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Al comparar los cromatogramas de los tres extractos se observó que los compuestos mayoritarios son los mismos (Figura 1). Este hecho nos llevó a cuestionarnos sobre si los extractos hidroalcohólicos de ajo fresco poseen un efecto protector similar al reportado para el

EAE en la ICT (Aguilera y cols., 2010). De esta manera, decidimos evaluar si el proceso de añejamiento es necesario para observar el efecto. Por otro lado, se ha reportado que el extracto de exocarpo (cáscara) de ajo también posee actividad antioxidante debido a la presencia de diferentes compuestos como fenilpropanoides particularmente 1,1-difenil-2-picrilidacil, N-trans-cumaroiloctopamina y ácido ferúlico, sin embargo, no existe ningún informe sobre los beneficios en la salud (Ichikawa y cols., 2003). Con base en lo anterior, fue de nuestro interés conocer el efecto del extracto de ASC y comparar sus efectos con ASD y EAE, así como dilucidar el posible mecanismo por el cual el extracto con actividad biológica, induce neuroprotección en la ICT.

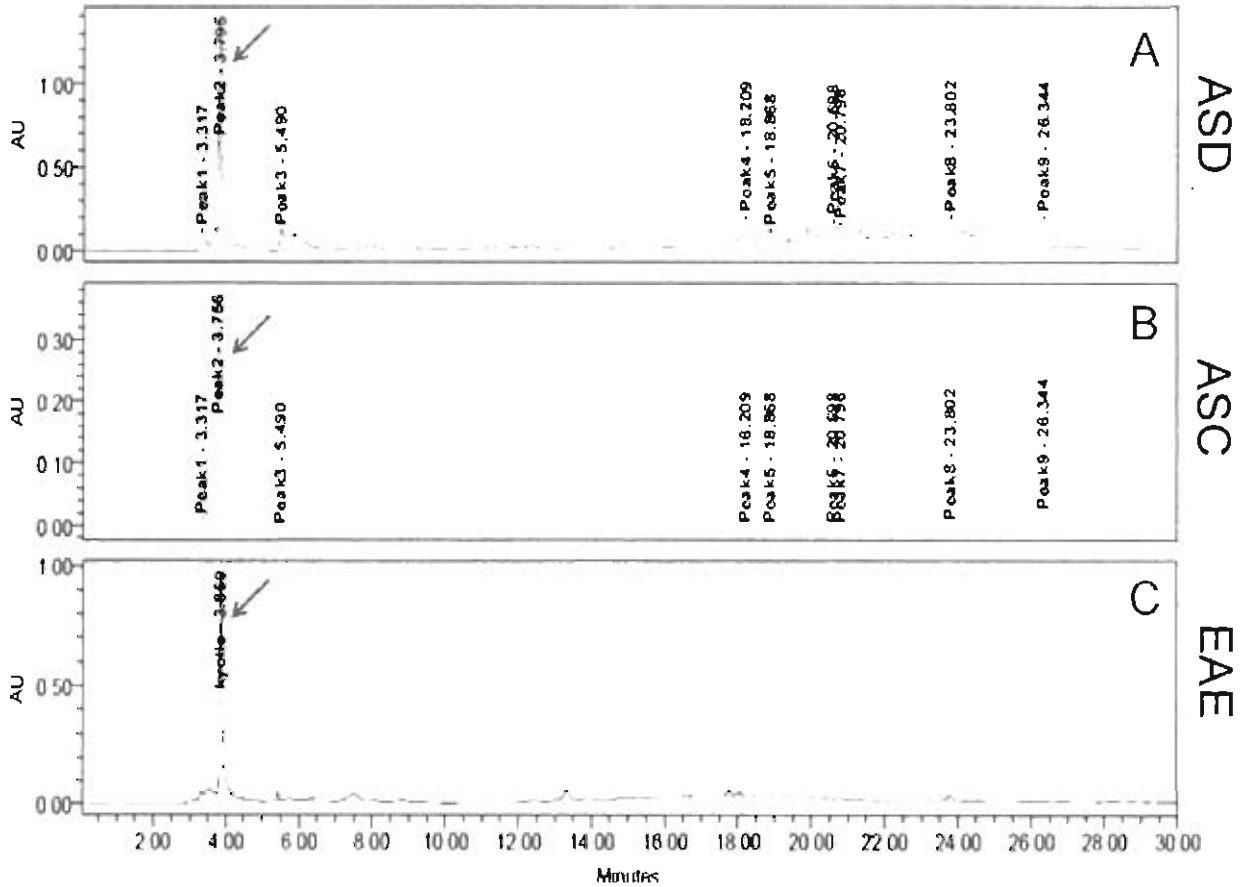


Figura 1. Cromatograma obtenido mediante análisis en CLAR. A) extracto hidroalcohólico de material fresco de endocarpo (ASD) de *Allium sativum* L macerado durante una semana, B) extracto hidroalcohólico de material fresco de exocarpo (ASC) de *Allium sativum* L con 7 días de maceración y **C)** extracto de ajo envejecido (EAE) elaborado por Wakunaga of America Co. Ltd. bajo el nombre de Kyolic. Las flechas muestran los tiempos de retención similares en los tres extractos.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL.

El término enfermedad vascular cerebral (EVC) engloba un conjunto de trastornos neurológicos, en los cuales se daña una región del cerebro de manera permanente o transitoria, debido a la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) y a la alteración primaria de los vasos sanguíneos generada por un proceso patológico (NINDS, 1990). Según su naturaleza, la EVC se puede presentar de dos formas: de tipo hemorrágico y de tipo isquémico con una proporción entre el 15% y 85%, respectivamente (Cabrera y cols., 2008).

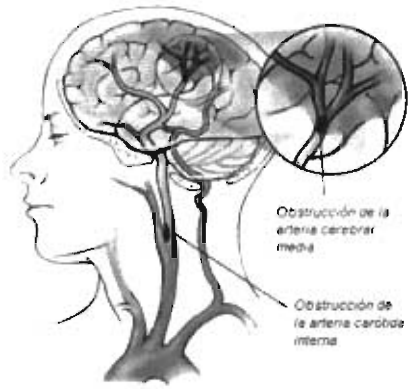


Figura 2. Territorio arterial afectado en la ICT. Imagen adaptada de www.ecured.cu/index.php

La hemorragia cerebral se define como el vertido hemático que es secundario a una rotura vascular y que se produce en el interior del cerebro. Según la localización del sangrado, puede ser parenquimatosa o ventricular (NINDS, 1990).

La ICT se define como la reducción del aporte sanguíneo hasta un nivel insuficiente para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales debido al déficit de oxígeno y glucosa. Se clasifica como isquemia global cuando la disminución del aporte del FSC es de forma total (*e.g.* tras un infarto al miocardio) e ICT cuando la reducción del FSC es de tipo parcial y se circunscribe al territorio irrigado por una arteria cerebral con una duración inferior a 24 h (NINDS, 1990).

Las causas más frecuentes que inducen un proceso isquémico son: estrechamiento gradual (ateroesclerosis) y oclusión súbita (trombosis o embolia) de alguna de las grandes arterias cerebrales, así como microembolia en vasos de pequeño calibre, paro cardíaco,

shock e hipotensión sistémica (Diez-Tejedor y cols., 2001). La sintomatología atribuida a esta patología es resultado exclusivo del territorio arterial afectado (Figura 2 y 3). En México, en el año de 2005, el 84.3% de las personas que sufrieron de un evento cerebral isquémico presentaron una mayor afectación en el territorio de la arteria cerebral media (ACM) (Cabrera y cols., 2008). En el humano, la manifestación de síntomas del déficit neurológico focal consisten en una disfunción sensitiva y motora de las extremidades contralaterales a la lesión, seguidas de ceguera monocular transitoria y trastornos de lenguaje (disfasia o afasia aislada) (Zemke y cols., 2004).

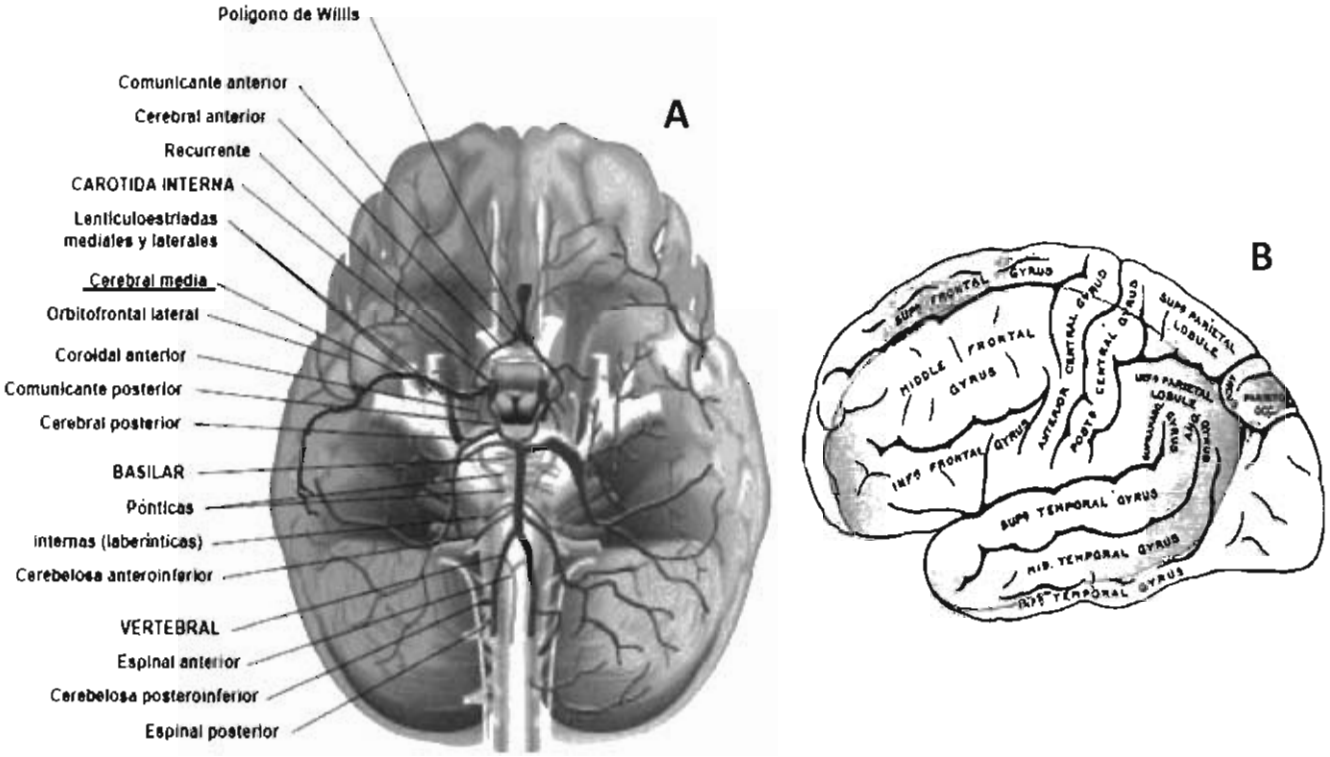


Figura 3. Sistema arterial cerebral. A) Localización de la ACM: La ACM es una ramificación de la arteria carótida interna e irriga la parte medial de estructuras subcorticales (ganglios basales, tálamo y cápsula interna), mediante ramas perforantes; también suministra sangre a los lóbulos frontales, circunvoluciones superior y media del lóbulo temporal y zonas laterales de los lóbulos parietal y occipital; B) Superficie del Hemisferio Cerebral, mostrando el área irrigada por la ACM (color rosa). Imágenes tomadas de "Guías de práctica clínica basadas en la evidencia: enfermedad cerebrovascular, 2009

3.2. EPIDEMIOLOGÍA.

La EVC es una enfermedad que puede causar incapacidad física y/o mental con un alto riesgo de muerte, siendo un grave problema de salud pública mundial. Representa la tercera causa de muerte en países industrializados, sólo precedida por las enfermedades cardiacas y los tumores malignos (Tegos y cols., 2000). En el 2008, su incidencia mundial fue de 1.5 a 4 casos por cada 1,000 habitantes, con una prevalencia del 8-20 por cada 1,000 habitantes (Cabrera y cols., 2008). La Organización Mundial de la Salud, calcula que para el año 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas a nivel mundial a causa de una EVC, previendo que podría ser la principal causa de muerte para esa fecha (OMS, 2011). En México, en el año de 1970 la EVC se reportó como la séptima causa de muerte, con una tasa de 24.7 defunciones por cada 100,000 habitantes. En el periodo de 1990-2000 estuvo entre las primeras cinco causas de muerte, superada por padecimientos cardiacos, tumores, diabetes mellitus, enfermedades hepáticas y accidentes automovilísticos. Para el período de 2000-2004 la EVC se colocó como la tercera causa de muerte, con una tasa de 25.6/100,000 habitantes y más de 25,000 muertes (SNS, 2008).

En el año 2008 la EVC fue la tercera causa de muerte después de la diabetes mellitus y las enfermedades isquémicas del corazón (Tabla 1) (SNS, 2008). Es evidente que, la EVC ha adquirido gran importancia por su alta incidencia, su elevada mortalidad y por constituir la primera causa de incapacidad permanente en el adulto. Por lo anterior, es indispensable el desarrollo de estudios encaminados a identificar los factores de riesgo así como la búsqueda de tratamientos farmacológicos enfocados a proteger contra el daño generado en un evento cerebrovascular.

TABLA 1. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN MÉXICO EN 2008.

Orden	Descripción	Defunciones	Tasa	%
1	Diabetes mellitus	75 572	70.8	14
2	Enfermedades isquémicas del corazón	59 579	55.8	11.1
3	Enfermedad cerebrovascular	30 212	28.3	5.6
4	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	28 422	26.6	5.3
5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	20 565	19.3	3.8

Datos del Sistema Nacional de Información de Salud: http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/

3.3. FACTORES DE RIESGO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.

Los factores de riesgo asociados a la EVC se han clasificado en tres tipos: 1) no modificables: son los factores que vienen determinados en la propia persona; entre ellos destacan la edad, el género, la raza y la herencia (Ruíz-Giménez y cols., 2002); 2) modificables bien establecidos: aquellos que se han demostrado claramente que tienen un grado de asociación y riesgo relativo con respecto a la EVC; se refiere a padecimientos crónicos como la hipertensión arterial y la diabetes mellitus (Ruíz-Giménez y cols., 2002) y 3) modificables potenciales: aquellos con un grado de asociación y riesgo relativo que no está bien establecido; entre ellos destacan el consumo de tabaco, el alcohol y la obesidad (Ruíz-Giménez y cols., 2002).

Para la prevención y el tratamiento del *ictus* se distinguen tres etapas: 1) prevención primaria: incluye el conjunto de medidas, estrategias o intervenciones dirigidas a reducir los factores de riesgo (modificables bien establecidos) que inducen un primer *ictus* en aquellos individuos saludables (Ruíz-Gimenez y cols., 2002); 2) prevención secundaria: tiene como objetivo evitar o disminuir la recurrencia del *ictus* una vez que éste ha tenido lugar mediante la disolución del coágulo que ocasiona el *ictus* isquémico que consiste en el uso de trombolíticos; estos fármacos aumentan la transformación endógena de plasminógeno en plasmina, con la consecuente destrucción de la fibrina y la disolución de los coágulos de sangre que ocluyen los vasos. En el año 1996, se aprobó el empleo del activador del plasminógeno tisular recombinante, siendo este el único trombolítico intravenoso autorizado como tratamiento en pacientes. La segunda alternativa en el tratamiento agudo es la neuroprotección, entendiendo por tal el conjunto de medidas terapéuticas que sirven para prevenir o limitar la lesión del tejido nervioso. Para ello, los fármacos empleados intervienen regulando la cascada de señalización bioquímica que se desencadena tras la isquemia. Esta es la mejor opción para limitar el daño; sin embargo, solo se han encontrado efectos protectores en modelos animales y con la limitante de que la ventana de tratamiento es de 6 horas como máximo, pasando este tiempo, la lesión isquémica es irreversible 3) rehabilitación del paciente: rehabilitación dirigida a recuperar la falta de movilidad de las extremidades

afectadas, recuperación del equilibrio, recuperación del lenguaje, así como el intento de mejorar la sensibilidad y la capacidad visual (Fernández-Gómez y cols., 2008).

3.4. FISIOPATOLOGÍA EN LA ICT.

El sistema nervioso difiere del resto de los tejidos en lo referente a su metabolismo energético. El peso del cerebro en el ser humano es solamente el 2% del peso total del cuerpo pero recibe el 15% del flujo cardíaco y utiliza el 20% del oxígeno que consume todo el organismo. Las células cerebrales obtienen la energía en su totalidad por el metabolismo de la glucosa, excepto en circunstancias especiales como la cetosis (disfunción metabólica originada por el déficit en el aporte de glucosa, induciendo la utilización de las grasas para obtener energía en el ayuno prolongado). La capacidad de depósito de glucosa del cerebro es reducida y sólo puede cubrir los requerimientos energéticos cerebrales durante tiempos cortos. Por tanto, estas características del tejido nervioso, especialmente la utilización exclusiva de glucosa y el escaso margen de almacenamiento, obliga a un estrecho acoplamiento entre perfusión, metabolismo energético y función. De esta forma, el desacoplamiento que se produce entre todos estos elementos durante el *ictus* isquémico explica la fisiopatología de esta enfermedad (Heiss y cols., 1994).

Para comprender la evolución del evento isquémico se debe considerar el FSC. Un FSC normal de 50 a 60 mL/min/100 gr de tejido en el humano garantiza la actividad eléctrica de las neuronas y la preservación de sus funciones biosintéticas. Después de la aparición de un evento isquémico, es posible observar dos regiones morfológicas de importancia fisiológica para el desarrollo del daño debido a que la reducción del FSC no es homogénea en el territorio isquémico (Figura 4) (Lee y cols., 1999). La primera región es el núcleo isquémico donde el FSC disminuye a 10 mL/min/100 gr de tejido que corresponde al ≤ 20% del FSC normal. En esta región el daño neuronal es irreversible sólo con un periodo menor a 30 minutos y las neuronas mueren por procesos necróticos. La segunda región está localizada en la periferia del núcleo isquémico y se conoce como penumbra isquémica; en está, la reducción

del FSC es de 10 a 25 mL/min/100 gr de tejido (≤ 50% del FSC normal) y la evolución del daño es lenta (Figura 5) (Lipton, 1999).

La penumbra isquémica presenta las siguientes características: 1) desacoplamiento entre la tasa metabólica cerebral de oxígeno y el flujo sanguíneo, 2) pese a la reducción de flujo, el consumo de glucosa se mantiene e incluso se incrementa ligeramente (fundamentalmente por vía anaerobia) para tratar de mantener los niveles energéticos de la célula, 3) se presentan despolarizaciones recurrentes, con elevaciones transitorias de la concentración de K^+ extracelular (Heiss y cols., 1994) y 4) ocurre la síntesis de ARNm y proteínas que intervienen en vías de señalización que inducen la muerte celular por apoptosis (*e.g.* la sobreexpresión del gen PAI-1 que contribuye al proceso inflamatorio inducido por la hipoxia) (Zhang y cols., 1999). Todo lo anterior conlleva a que la vida media del tejido localizado en la penumbra sea corta, evolucionando rápidamente hacia la lesión isquémica (Castillo, 2000).

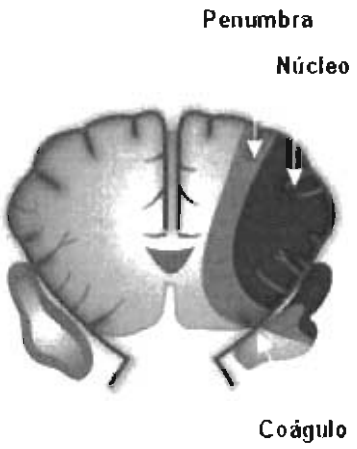


Figura 4. Ilustración de las dos zonas morfológicas secundarias a la privación del FSC. Tomada del cuaderno de infarto cerebral y pre-acondicionamiento isquémico. Navarrete y cols., 2010.

Por las características mencionadas, la penumbra isquémica es la región susceptible de ser rescatada mediante terapias farmacológicas. Se han llevado a cabo investigaciones con la finalidad de entender las vías de señalización activadas durante la isquemia cerebral y encontrar los blancos terapéuticos que permitan implementar terapias efectivas (Dirnagl y cols., 1999; Lee y cols., 1999; Weinberger, 2000; Iadecola, 1999; Lo, 2008; Ginsberg, 2008).

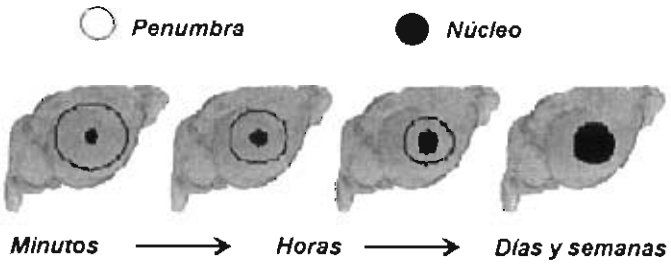


Figura 5. Efectos de la reducción del FSC (Liu y cols., 2009).

3.4.1. Mecanismos bioquímicos y moleculares durante la ICT.

En condiciones de normoxia, en la membrana interna mitocondrial, se lleva a cabo el proceso conocido como respiración que consiste en el transporte de electrones, a través de diferentes complejos enzimáticos que permiten la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). En ese proceso, el oxígeno es pieza fundamental ya que actúa como aceptor final de electrones.

En la isquemia cerebral, debido a la ausencia de oxígeno, el flujo de electrones se detiene, así como la producción de ATP. El ATP almacenado disminuye rápidamente y todos los procesos que requieren energía se ven alterados. Por ejemplo, los sistemas de transporte activo (como las bombas de Ca^{2+}, Na^{+} y K^{+}) que mantienen el potencial de membrana funcionan hasta que se termina la reserva de energía intracelular (Lee y cols., 1999; Lipton, 1999; Sweeney y cols., 1997, White y cols., 2000), con la consecuente pérdida del gradiente iónico y la despolarización permanente de la membrana celular. Este hecho conduce a la liberación presináptica excesiva del neurotransmisor glutamato, el cual se une a sus receptores del tipo Kainato y ácido α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA) (Arauz y cols., 2002). La entrada masiva de Na^{+} debida a la activación de los receptores AMPA se acompaña de la entrada de agua, lo que produce edema celular (Choi, 1988). Adicionalmente, la despolarización de la membrana libera el Mg^{2+} que bloquea los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs), generando su activación y un proceso de daño neuronal conocido como excitotoxicidad por glutamato (Simon y cols., 1984; Amoroso y cols., 1990; Michaelis y cols., 1998; Dirnagl y cols., 1999; Lee y cols., 1999).

La activación de los NMDARs desencadena la entrada masiva de Ca^{2+} y Na^{+}, despolarizando la célula y activando procesos catabólicos mediados por proteasas, lipasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+}, la activación de otras enzimas como la sintasa de óxido nítrico neuronal que libera óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) (Choi, 1988) y la fosfolipasa 2 que produce metabolitos de ácido araquidónico y anión superóxido (O_2^{-}), que también participan en la muerte neuronal (Arnold y cols., 2005, Moskowitz y cols., 2010). Por otro lado, la acumulación excesiva en el espacio extracelular de glutamato también produce toxicidad porque afecta al

sistema de transporte cisteína-glutamato (Murphy y cols., 1990). Este sistema se encarga de transportar glutamato al exterior celular a cambio de cisteína, la cual constituye una fuente importante para la formación del antioxidante más importante de la célula; el glutatión (GSH). Asimismo, el incremento de Ca^{2+} activa otros procesos celulares como la síntesis de citocinas y otros factores que causan inflamación y comprometen la microcirculación (Iadecola, 1999).

3.4.2. Importancia del receptor de glutamato tipo NMDA en la ICT.

El proceso excitotóxico juega un papel importante en muchas otras patologías del Sistema Nervioso Central (Choi, 1988) y los NMDARs son una diana fundamental en la búsqueda de estrategias de neuroprotección (Hartley y cols., 1993). A nivel experimental, se han probado diversos antagonistas competitivos (*e.g.* selfotel) y no competitivos (*e.g.* dextrorfano, aptiganel y eliprodil) de los NMDARs que no han sido efectivos en el tratamiento de la isquemia cerebral debido a su baja tolerancia, eficacia y alta toxicidad (Albers y cols., 2001; Ikonomidou y cols., 2002). En contraste con los efectos adversos generados por la sobreactividad de los NMDARs en la isquemia, su actividad fisiológica es de suma importancia para promover la supervivencia neuronal (Papadia y cols., 2007). En modelos animales, antagonistas selectivos que bloquean totalmente los NMDARs (*e.g.* CGP37849 y CGP43487) provocan apoptosis generalizada y exacerban el daño neuronal tras las isquemia (Gould y cols., 1994). Por ello, un paso crítico en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas es conocer por qué han fracasado los antagonistas de los NMDARs en el tratamiento de estas patologías y estudiar a profundidad las vías de señalización de sobrevivencia desencadenadas por la activación de los NMDARs como señales postrasduccionales de proteínas y expresión de genes involucrados en la respuesta neuroprotectora.

3.4.2.1. Clasificación de los receptores de glutamato.

Entre los receptores para el neurotransmisor excitatorio L-glutamato pueden distinguirse dos familias, según el mecanismo de transmisión de la señal de activación: 1) <u>familia de</u>

receptores metabotrópicos (mGluRs): formados por proteínas con siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G, que transducen la señal de unión del agonista al interior de la célula a través de una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros intracelulares (Schoepp y cols., 1990; Sugiyama y cols., 1987) y 2) familia de receptores ionotrópicos (iGluRs): canales iónicos acoplados a ligando, clasificados en tres subtipos, atendiendo a su afinidad por distintos agonistas sintéticos y sus características electrofisiológicas: a) Receptores de tipo AMPA, b) Receptores de tipo kainato y c) los NMDARs (Michaelis y cols., 1998). Dentro de los tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, los NMDARs participan en la excitabilidad general y en mecanismos de señalización celular gracias a su permeabilidad al Na^+, K^+ y Ca^{2+}. Este último ion puede modular la actividad de segundos mensajeros y enzimas intracelulares de neuronas (Choi., 1992).

Los NMDARs están formados por un complejo de cuatro subunidades. Estas subunidades están clasificadas dentro de tres familias definidas por su secuencia de aminoácidos con un alto grado de conservación: NMDA Receptor 1 (NR1), NR2 y NR3, siendo idénticos en aproximadamente un 20% entre las formas NR1 con NR2 (Kutsuwada y cols., 1992) y NR3 en un 50% al compararla con las distintas subunidades NR2 (Ishii y cols., 1993; Chatterton y cols., 2002). Se requieren dos subunidades NR1 expresadas en la arquitectura del receptor para que sea funcional, las dos subunidades restantes son combinaciones homo- y heterologas entre las familias NR2 (A-D) y NR3 (A y B) lo que le confiere características muy particulares que influyen en las propiedades fisiológicas de los NMDARs (Hollmann y cols., 1994; Cull-Candy y cols., 2001). Así, los NMDARs están formados por heterotetrámeros integrados por dos dímeros conformados por las subunidades NR1-NR2 y que para activarse, necesitan dos moléculas de L-glutamato y dos moléculas de glicina (aunque también el aspartato puede fungir como agonista y la D-serina como coagonista) (Cull-Candy y cols., 2001). Cada subunidad NR1 posee un sitio de unión para glicina y cada subunidad NR2 con un sitio de unión para glutamato, es decir dos sitios de unión para glicina (S1) y dos para glutamato (S2) en cada receptor. Por tanto, el dímero NR1-NR2 se considera la estructura base de organización funcional en cada receptor en donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos

(Cull-Candy y cols., 2001; Shüler y cols., 2008). Cada subunidad de receptores ionotrópicos posee una estructura molecular muy semejante, el cual se organiza en dominios funcionales que son: un dominio extracelular amino (N) terminal (DNT), un dominio de unión para el ligando (DUL) formado por cuatro segmentos hidrofóbicos transmembranales (M1 a M4) con el segmento M2 que ingresa parcialmente a la membrana y que conforma el canal iónico, también está formado por un asa intracelular entre los dominios M1 y M2, un asa extracelular entre los dominios M2 y M3 y finalmente un dominio carboxilo terminal (C) intracelular (DCT) (Kuner y cols., 1996; Bigge y cols., 1999; Shüler y cols., 2008) (Figura 6). Adicionalmente, a los sitios naturales de unión para glicina o para glutamato en el dímero NR1-NR2, particularmente, en la región extracelular de NR2 posee sitios de unión para ligando endógenos como las poliaminas, sitio de redox para protones y para el zinc que pueden ejercer un efecto regulador de la actividad del receptor NMDA al permitir el incremento o la disminución del flujo de Ca^{2+} a través de la actividad del receptor bajo condiciones fisiológicas y/o patológicas. Mientras que, los ligandos exógenos para esteroides, etanol, así como algunas moléculas sintéticas, se han empleado como herramientas experimentales para el estudio de las propiedades del receptor NMDA y facilitar el desarrollo de antagonistas de utilidad terapéutica (Cull-Candy y cols., 2001; Shüler y cols., 2008; Flores y cols., 2011).

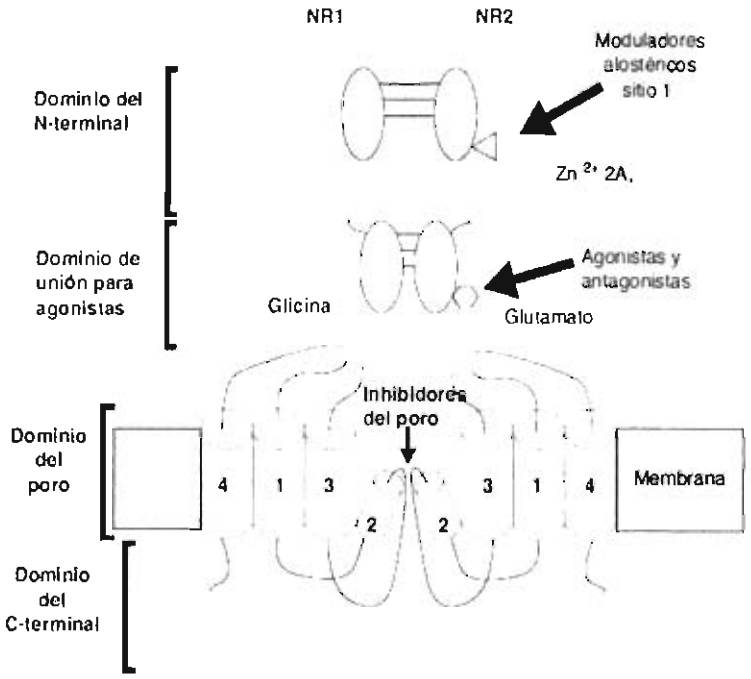


Figura 6. Esquema de las subunidades del receptor NMDA. Las proteínas se localizan en la membrana plasmática mediante 4 regiones transmembranales TM (1-4), donde TM2 sólo la atraviesa parcialmente. El extremo N-terminal de las subunidades queda orientado hacia el exterior celular y el C-terminal hacia el citoplasma constituyendo un dominio de longitud variable. Dentro de las secuencias extracelulares, los 150 aminoácidos anteriores a TM1 (dominio S1) y el bucle entre TM3 y TM4 (dominio S2) constituyen las regiones de interacción con el ligando. También se distingue el dominio N-terminal (NTD). Los cuatro dominios transmembranales forman el canal iónico, permitiendo, tras el desbloqueo del Mg^{2+}, la salida de K^+ y la entrada de Na^+ y Ca^{2+}. El dominio TM2 se dispone hacia el interior del canal, aportando la especificidad iónica Finalmente los dominios C-terminales citoplásmicos son muy variable. Imagen modificada de Flores y cols., 2011

3.4.2.2. Regulación de la transcripción de NR1, NR2 y NR3.

El ARNm de NR1 comienza a detectarse en el cerebro de rata a partir de los 14 días de desarrollo embrionario, aumentando sus niveles gradualmente hasta tres semanas después del nacimiento (Laurie y cols., 1994). La inducción transcripcional durante la diferenciación neuronal ocurre principalmente mediante la des-represión de su promotor, bloqueado inicialmente por la interacción del represor REST/NRSF (*Represor element silencing transcription/neuron-restrictive silencer factor*) con el elemento RE1 (*represor element-1*) y cuyos niveles disminuyen a lo largo de la diferenciación (Bai y cols., 2003). También son necesarios mecanismos positivos para la expresión del gen de NR1. Se ha descrito que los factores de transcripción de la familia Sp1 (Bai y cols., 1995), MAZ (*Myc-associated zinc finger protein*) (Okamoto y cols., 2002), NFκB (*Neuronal κB-Binding Factor*) (Liu y cols., 2004) y factores de crecimiento de la familia NGF (*Nerve Growth Factor*), se unen a elementos NGFI/Egr (*Nerve growth factor-inducible/early growth reaction factor*) (Bai y cols., 1997) del promotor. Además, se ha propuesto que la inhibición de Sp1 es necesaria para el silenciamiento por REST/NRSF (Plaisance y cols., 2005).

En la sinapsis glutamatérgica, las subunidades NR2 son ubicadas selectivamente en la membrana post-sináptica neuronal y aparecen después de 1 o 2 h del contacto axodendrítico inicial, siendo de gran relevancia en las respuestas biológicas (Liu y cols., 2003). Sin embargo, las regiones promotoras de las subunidades NR2 están poco caracterizadas. Se ha observado que de forma similar a NR1, en el promotor de NR2A existen secuencias diana para los factores de transcripción de tipo Sp1 (Liu y cols., 2003).

En las neuronas con daño isquémico se induce la expresión de REST/NRSF (Calderone y cols., 2003) y se disminuye transitoriamente el nivel de expresión de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Sp4. Este fenómeno conlleva al incremento de los niveles de NR1. Además se favorece la interacción entre NR1 y NR2B provocando mayor daño neuronal (Lau y cols., 2007). Por otra parte, la sobre estimulación *in vivo* de los NMDARs inducida por la isquemia disminuye la expresión de la subunidad NR1 en un 41% (Gascón y cols., 2005) y la degradación de las subunidades NR2A y NR2B (Simpkins y cols., 2003; Wu y cols., 2005).

Esta reducción en la expresión del ARNm de NR1 y la degradación de las subunidades de NR2 pueden estar involucradas en el mecanismo de autorregulación del receptor que disminuye la excitotoxicidad por glutamato en aquellas neuronas que han sobrevivido tras el *ictus* (Gascón y cols., 2005; Wu y cols., 2005). Por ello, la búsqueda de compuestos que sean capaces de modular la expresión de dichas subunidades NR1 y NR2 representa un campo experimental interesante que podría ofrecer alternativas en el tratamiento de la isquemia cerebral.

Por otra parte, las subunidades NR3A y NR3B están codificadas cada una por su propio gen. El sub-tipo NR3A presenta dos isoformas y se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro. NR3B no ha mostrado variantes y su expresión predomina en neuronas motoras (Cull-Candy y cols., 2001). Estas subunidades solo son funcionales si están co-expresadas con NR1 y NR2 (receptores NR1/2NR3A/B) han mostrado una función modulatoria negativa en el canal y cuando están unidos con la subunidad NR1 forman receptores ionotrópicos con apertura dependiente solo de glicina, que a pesar de las propiedades inhibitorias de este neurotransmisor, en estos receptores (NR1/NR3A/B) la glicina genera una actividad excitatoria (Dingledine y cols., 1999). Se ha encontrado que la subunidad NR3A se asocia con NR2A y NR2B en el cerebro adulto, sugiriéndose la presencia de receptores NMDA triheterómeros compuestos por combinaciones NR1/NR2A/B /NR3A. La presencia de diferentes combinaciones de subunidades en los NMDARs, en especial de la familia NR2, confiere al canal variabilidad en sus propiedades cinéticas y farmacológicas (Dingledine y cols., 1999; Cull-Candy y cols., 2001; Elenes y cols., 2009).

3.4.3. Daño celular mediado por radicales libres producidos en la ICT.

Durante la excitotoxcicidad por glutamato, el Ca^{2+} juega un papel fundamental, ya que muchas de las reacciones enzimáticas involucradas en la fosforilación de proteínas, son dependientes de este ion (Philip, 2003). Una alteración en la actividad de las fosfatasas y las proteínas kinasas durante la isquemia-reperfusión, provocan cambios en la actividad de los receptores iónicos de membrana y también afectan la transcripción y transducción de genes

(Lipton y cols., 1999). Estos efectos pueden por tanto explicar los efectos a largo plazo de la isquemia sobre la función e integridad de la membrana, facilitando la peroxidación lipídica por parte de los radicales libres y el desencadenamiento de la muerte celular. Otras racciones enzimaticas mediadas por calcio en la ICT que promueven la formación de ERO son la oxidación del ácido araquidónico (por la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa), la oxidación de la xantina e hipoxantina (vía xantina oxidasa) entre otras (Nicholls y cols., 1999). Sin embargo, la mayor concentración de ERO que se producen durante la ICT y la reperfusión, tienen su origen en la cadena respiratoria mitocondrial (Philip, 2003).

La mitocondria contribuye a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular a través de su capatación y liberación por parte del intercambiador uniporte de Na^{+}/ Ca^{2+}, los poros de permeabilidad transitoria (PTP, tanto de los de alta y baja conductancia) y otras vías como la idependiente de Na^{+} para el eflujo de Ca^{2+} y un antiporte de H^{+}/ Ca^{2+} (Lipton y cols 1999; Philip, 2003). El aumento del calcio intracelular en la ICT, aumenta el influjo del mismo a la mitocondria, esto produce una sobrecarga del Ca^{2+} intramitocondrial, generando la producción de ERO y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) (Nicholls y cols., 1999; Chipoulos y cols., 2006). Esta descompensación en la homeostasis del Ca^{2+} intraneuronal es irreversible, mecanismo conocido como desregulación del calcio retardada (DCR) (Chipoulos y cols., 2006). En mitocondrias aisladas sometidas a anoxia (evento que simula parcialmente el periodo isquémico), se ha demostrado que la pérdida del $\Delta\psi m$ es dependiente del incremento del Ca^{2+} mitocondrial durante la reperfusión, periodo en el que se favorece la formación de ERO (Tanaka y cols., 1998), desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, colapso energético y la ruptura del balance redox celular que en conjunto inducen la muerte neuronal (Seppet y cols., 2009).

En condiciones normales, la generación de ERO a partir del oxígeno molecular es un proceso fisiológico que tiene lugar en las células de todos los organismos aeróbicos. El O_2^- y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se presentan en las células en concentraciones basales del orden de nanomolar y micromolar, respectivamente (Dawson y cols., 1996; Nicolls y cols., 1999). Sin embargo, durante la isquemia cerebral, el O_2^- se forma *in vivo* como consecuencia de la reducción incompleta del O_2 en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y por

la acción de enzimas como xantina oxidasa. Además, la enzima superóxido dismutasa genera O_2^- y H_2O_2 a partir del O_2^-. Asimismo, en presencia de cationes metálicos el H_2O_2 y el O_2^- pueden reaccionar entre sí, generando radicales hidroxilo ($OH^{\bullet}$), que son especies altamente reactivas y oxidantes (Halliwell, 1992; Peuchen y cols., 1997). Cuando se incrementa la producción de sustancias oxidantes, se produce una deficiencia en los mecanismos antioxidantes intracelulares y las ERO que resultan dañinas para la célula.

La formación de ERO se induce después de 1.6 h de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) y se mantiene por más de 3 h. Sin embargo, el máximo incremento se observa tras la reperfusión (Peters y cols., 1998). Este incremento de ERO durante los primeros 30 minutos de reperfusión, ocurre como resultado del aporte masivo de O_2, que no puede ser reducido adecuadamente en la cadena respiratoria, que ha sido alterada por la hipoxia y como consecuencia, se forma una gran cantidad de O_2^- como un producto inmediato de la respiración mitocondrial y representa una de las principales causas de daño en la isquemia cerebral. (Peters y cols., 1998).

3.4.4. Mecanismos de defensa contra las ERO y la importancia de glutatión en la ICT.

El término antioxidante incluye a todas las sustancias capaces de retardar o detener los procesos de oxidación mediados por ERO. Los mecanismos de defensa antioxidante son:1) la depuración de ERO mediante reacciones redox que previenen su propagación, 2) la hidrólisis enzimática de los puentes éster que remueve los ácidos grasos peroxidados generados a partir de los lipidos, 3) el secuestro de metales de transición que pueden reaccionar con grupos $OH^{\bullet}$ y ser altamente tóxicos (principalmente hierro), 4) la reducción de H_2O_2 mediada por catálisis enzimática donde intervienen diversas enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y 5) la activación de cascadas de señalización que culminan en la expresión de genes involucrados en la síntesis de moléculas con actividad antioxidante (Thomas, 2000).

Una molécula de protección endógena ante ERO es el glutatión (GSH) (Figura 7). Es el compuesto tiólico presente en mayor concentración en todas las células y participa en distintas funciones como la detoxificación de xenobióticos. En su estado reducido, es cofactor de varias enzimas y constituye la forma de almacenamiento y transporte de la cisteína en la célula, pero la función más importante del GSH es la de antioxidante intracelular, desempeñando un papel crucial en la defensa celular frente al estrés oxidativo y nitrosativo (Meister, 1988).

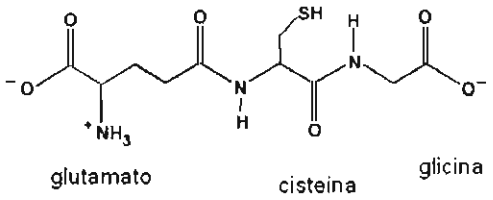


Figura 7. Estructura química del GSH reducido. Tomada de (Katsura y cols., 1993).

En su acción antioxidante, el GSH puede combinarse de forma no enzimática con distintos radicales libres como $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ y $NO^{\cdot}$, actuar como donador de electrones en la reducción de H_2O_2, en una reacción catalizada por glutatión peroxidasa. En ambos casos, el producto final es el GSH oxidado o disulfuro de glutatión (GSSG) (Dringen, 2008).

El H_2O_2, el $NO^{\cdot}$ y el peroxinitrito ($ONOO^-$) reaccionan con el GSH mayoritariamente (>90%) mediante este mecanismo (Radi y cols., 1991). Así, el GSH al ser el antioxidante mayoritario, incluso la oxidación de una pequeña cantidad de GSH a GSSG, puede producir importantes cambios en el estado redox celular para disminuir el estrés oxidativo en la ICT (Cooper y cols., 1980; Mizui y cols., 1992).

3.4.5. Papel de la enzima ligasa de glutamato y cisteína en la síntesis de glutatión.

El glutatión se sintetiza *de novo* en el citosol celular en dos reacciones consecutivas dependientes de ATP, catalizadas por la enzima ligasa de glutamato y cisteína (GCL) y la

glutatión sintetasa (GSHS). La primera es un paso limitante de la reacción y se inhibe por retroalimentación. En ésta, el L-glutamato y L-cisteína forman L-γ-glutamil-L-cisteína (γ-GC). En la segunda reacción, la γ-GC se une a la L-glicina generando GSH (Figura 8) (Dringen, 2008). La GCL es una proteína heterodimérica, compuesta por una subunidad catalítica de 637 aminoácidos aproximadamente (GCLC, PM ~73 kDa) y una subunidad moduladora de 274 aminoácidos (GCLM, PM~31 kDa) (Figura 8). Ésta modula la afinidad de la subunidad catalítica por los sustratos y los inhibidores, reduciendo así la constante de Michaelis de la GCLC por el glutamato, e incrementando la constante de inhibición para el GSH. Ambas subunidades están codificadas por diferentes genes con diferentes localizaciones cromosomales. La expresión de ambas subunidades está poco coordinada, de forma que el control de la transcripción de ambas subunidades es independiente y diferente según los tejidos (Meister, 1988; Griffith y cols., 1999; Yang y cols., 2007).

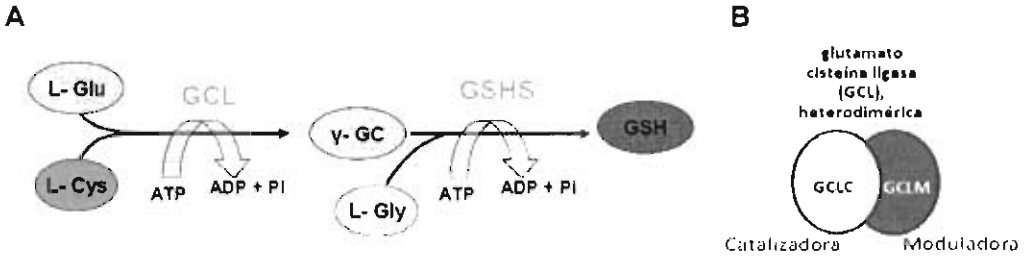


Figura 8. A) Biosíntesis de GSH. Para la síntesis de GSH es necesaria la participación de L-glutamato y L-Cisteína que mediante la acción enzimática de GCL y ATP se forma L-γ-glutamil-L-cisteína (γ-GC). En la segunda reacción, la γ-GC se une a la L-glicina generando GSH. B) Enzima GCL constituida por la subunidad catalizadora y la moduladora. Imagen modificada de Katsura y cols., 1993).

3.4.5.1. Regulación genética de la subunidad GCLC por antioxidantes y estrés oxidativo.

Estudios revelan que la actividad enzimática de GCL implicada en la síntesis de GSH, está frecuentemente acompañada por un aumento en el nivel del ARNm del gen que codifica para la subunidad GCLC (Mulcahy y cols., 1997). También se ha observado que con la exposición a diversos antioxidantes como terbutilhidroquinona (Shih y cols., 2005), extractos de *Ginkgo biloba* L. (Liu y cols., 2008) quercetina (Kang y cols., 2009), resveratrol (Zhang y

cols., 2009) ácido ferúlico (Ma y cols., 2010), N-acetilcisteína (Antolino y cols., 2011) y aceite de naranja (*Citrus sinensis* L.) (Gao y cols., 2011) se induce la transcripción del gen de GCLC.

Uno de los posibles mecanismos de acción de estos antioxidantes a nivel de la membrana celular es promover las cascadas de señales citoplasmáticas mediante la vía de la proteína cinasa B (AkT) y la familia de cinasas ERK. La activación de estas enzimas genera la disociación del complejo Keap1-Nrf2 unión que mantiene retenido al factor de transcripción Nrf2 en el citosol. Nrf2 al ser liberado de Keap1 (*Kelch-like ECH- associated protein 1*) es translocado al núcleo (Kim y cols., 2010). Nrf2 se asocia a otras proteínas Maf para unirse al promotor de la secuencia ARE (*Antioxidant Response Element*), elemento presente en la mayoria de genes que codifican para enzimas destoxificantes y antioxidantes (Kensler y cols., 2007; Königsberg, 2007). Se ha demostrado que Nrf2 induce la expresión de GCLC ante un evento isquémico como parte de la respuesta protectora (Shih y cols., 2005).

3.5. NEUROPROTECCIÓN COMO TRATAMIENTO EN LA ICT.

Los conocimientos adquiridos en los últimos años acerca de la existencia de un área de penumbra isquémica en todo *ictus* y su posible reversibilidad explican porque la farmacología de la neuroprotección ha adquirido una gran importancia en el tratamiento de la isquemia cerebral. Actualmente, el esfuerzo clínico persigue dos objetivos principales: 1) restablecer el flujo sanguíneo y 2) proteger la región de la penumbra mediante farmacoterapia para lograr que los mecanismos fisiológicos naturales o los derivados del tratamiento detengan las vías de señalización que derivan en muerte celular (Jordan y cols., 2007; García y cols., 2008; Segura y cols., 2008). Para ello, han de interferir con uno o más de los componentes de la cascada bioquímica que se desencadena tras la isquemia en alguna de las siguientes etapas:

Activación: En esta primera etapa participan segundos mensajeros como el Ca^{2+}, el Na^{+} y las ERO que de forma concomitante inician el proceso excitotóxico. A nivel experimental se han probado fármacos neuroprotectores que actúan en esta fase incluyendo antagonistas de los NMDARs (Mohr y cols., 1998; Franke y cols., 1996; Leszek y cols., 1997; Davis y cols.,

2000; Shin y cols., 2011; Paquette y cols., 2010). Sin embargo, solo el quelante de Ca^{2+} DPb99 ofrece mejoras significativas en ensayos de fase II (D-Pharm, 2010; Rosenberg y cols., 2011).

Decisión: La segunda etapa se cree que está regulada por la estabilidad de la mitocondria, ya que ciertos cambios en la permeabilidad de las membranas mitocondriales constituyen el punto de no retorno. La mitocondria está considerada como el principal nexo entre las señales de estrés celular y la ejecución de la muerte celular programada en las neuronas (Jordán y cols., 2007).

Ejecución: Se incluyen los fármacos inhibidores de enzimas efectoras apoptóticas, como los inhibidores de las proteasas caspasas y calpaínas. Actualmente existen estudios que confirman que una excesiva activación de calpaína ejerce un papel importante en la fisiopatología de la isquemia cerebral. Hay un gran número de fármacos inhibidores de la calpaína descritos en estudios preclínicos (*e.g.* calpastatina, péptidos adehídos y epoxisuccínicos) pero todos ellos presentan el inconveniente de su escasa permeabilidad celular, lo que los convierte en malos candidatos a futuros fármacos neuroprotectores (Fernández y cols., 2008).

El objetivo del tratamiento neuroprotector es conseguir que las neuronas soporten durante más tiempo el daño derivado de la isquemia, hasta que se restituya el FSC. Se trata de que el tejido cerebral sano no se convierta en isquémico y que éste no se convierta en necrótico. Algunos fármacos (*e.g.* dizocilpina y 2,3-hidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[F]-quinoxalina) han sido eficaces en los estudios experimentales en animales, sin embargo, hasta la fecha no se han obtenido resultados concluyentes en los estudios realizados en seres humanos, aunque hay datos esperanzadores. También, el empleo de altas dosis de fármacos con efecto antioxidante para disminuir las ERO en la ICT en modelos experimentales ha sido contraproducente, ya que se ha demostrado que las ERO en condiciones basales son importantes para inducir señalizaciones bioquímicas que intervienen en procesos de proliferación y diferenciación celular (Hamanaka y cols., 2010). Aún así, existe mucha controversia debido a que algunas sustancias empleadas presentan efectos secundarios que

pueden perjudicar la salud y otras suelen ser poco selectivas (Fernández y cols., 2008). A esta problemática surge como alternativa recurrir a las plantas medicinales como punto de partida para el hallazgo de productos con efecto neuroprotector para la prevención de la ICT.

3.6. *Allium sativum* L.

Allium sativum L. o ajo común, es una especie que pertenece a la familia Liliaceae constituida por alrededor de 600 especies. El ajo está formado por el bulbo subterráneo con un número variable de bulbillos (endocarpo ó dientes), que están insertados sobre un eje (Bradley. Herbal compendium, 1992) (Figura 9).

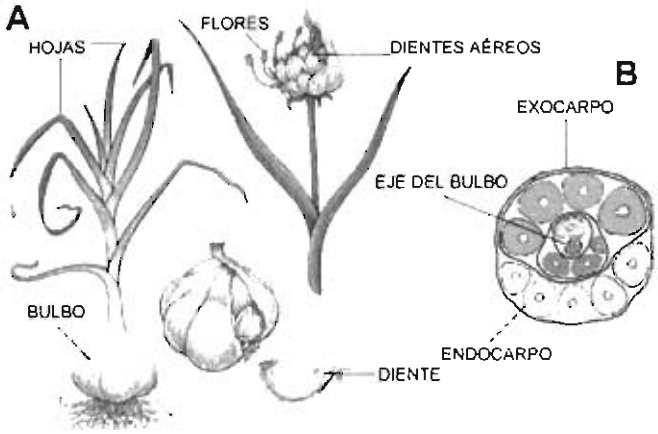


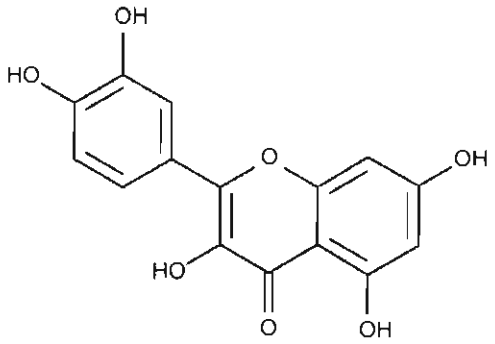
Figura 9. A) Estructuras de la planta de *Allium sativum* L. **B)** Corte transversal del bulbo de *Allium Sativum* L. Imagen modificada de Bradley PR. British herbal compendium, 1992.

Su origen proviene de las estepas de Asia Central, donde se extendió hacia el Este hasta alcanzar China y hacia el Oeste en dirección a Europa (Ross, 1999). Además de su uso culinario, el ajo también se ha empleado desde el inicio de la humanidad como elemento religioso, antimicrobiano y antiinflamatorio. Su utilización en medicina tradicional se remonta al menos a 4.000 años. El extracto de ajo ya era empleado por los sumerios para combatir la parasitosis y prevenir epidemias, los antiguos egipcios lo utilizaban como tónico cardiaco; en la India, se recomendaba para controlar la hipertensión arterial, la debilidad miocárdica y otras alteraciones del sistema cardiovascular. Con el paso de los años se han demostrado sus propiedades antiparasitarias, antihepatotóxicas, hipotensoras arteriales, hipolipemiantes,

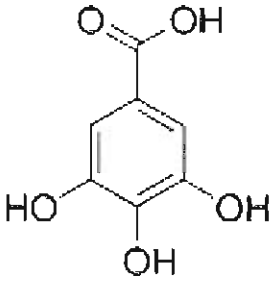
hipoglucemiantes, antitumorales, antimicrobianas y antioxidantes (Block y cols., 1985; Peirce y cols., 1999; Amagase y cols., 2001; Corzo y cols., 2007; Aguilera y cols., 2010).

3.6.1. Contenido alimenticio y composición química.

Cada 100 g de ajo fresco contiene: 128-135 calorías; 6,1 g de proteínas (principalmente aliinasa); 1,2 g de aminoácidos libres (*e.g.* arginina); 27,5 g hidratos de carbono (escencialmente fructosanos); 0,1 g de grasas; 0,7-1,5 g de fibra; 38 mg de calcio; 134 mg de fósforo; 26 mg de magnesio; 80 mg de azufre, 0,004 mg de yodo; trazas de silice; 45 mg de sodio; 1-1,4 mg de hierro; 10 µg de níquel; 20 µg de selenio; 0,1 mg de pro-vitamina A; 0,1-0,2 mg de vitamina B1 ; 0,08-0,10 mg de vitamina B2; 0,6 mg de vitamina B3 y 14-17 mg de vitamina C. (Souci y cols., 1994). Además contiene sales minerales, glucósidos esteroideos (Matsuura y cols., 1988), lectinas (Kaku y cols., 1992), prostaglandinas, pectina, adenosina, biotina, ácido nicotínico, ácidos grasos, glicolípidos, fosfolípidos, mucílago, taninos, terpenos, polifenoles (ácido gálico), flavonoides (quercetina) y compuestos azufrados (Figura 10) (Fenwick y cols., 1985).



Quercetina



Ácido gálico

Figura 10. Algunos compuestos no azufrados y con actividad antioxidante en *Allium sativum* L. Imágenes tomadas de www.chemistry.about.com/od/chemicalstructures/a/structures

La mayoría de los compuestos azufrados en el ajo tienen su origen en la aliina que en condiciones adversas es biodegradada mediante el siguiente proceso:

1) la enzima alinasa es liberada de su compartimiento celular por lisis; 2) la alinasa transforma la aliina en alicina (dialil-tiosulfinato) (Figura 11), 3) la alicina, cuya vida media a temperatura ambiente es de 2-4 días, se descompone rápidamente dando lugar a la formación de mono- di- y trisulfuros, así como de otros derivados azufrados como el ajoeno (4,5,9-tri-tiododeca-1,6,11-trieno-9-óxido), alil-metiltiosulfinato, 1-propenil-alil-tiosulfinato y γ-L-glutamil-*S*-alil-cisteína y 4) la conservación en el tiempo y a temperatura ambiente de estos homogeneizados da lugar a un notable incremento en la concentración de SAC y *S*-alil-mercapto-cisteína que aparentemente son exclusivas del proceso de envejecimiento (Amagase y cols., 2001; Ichikawa y cols., 2006).

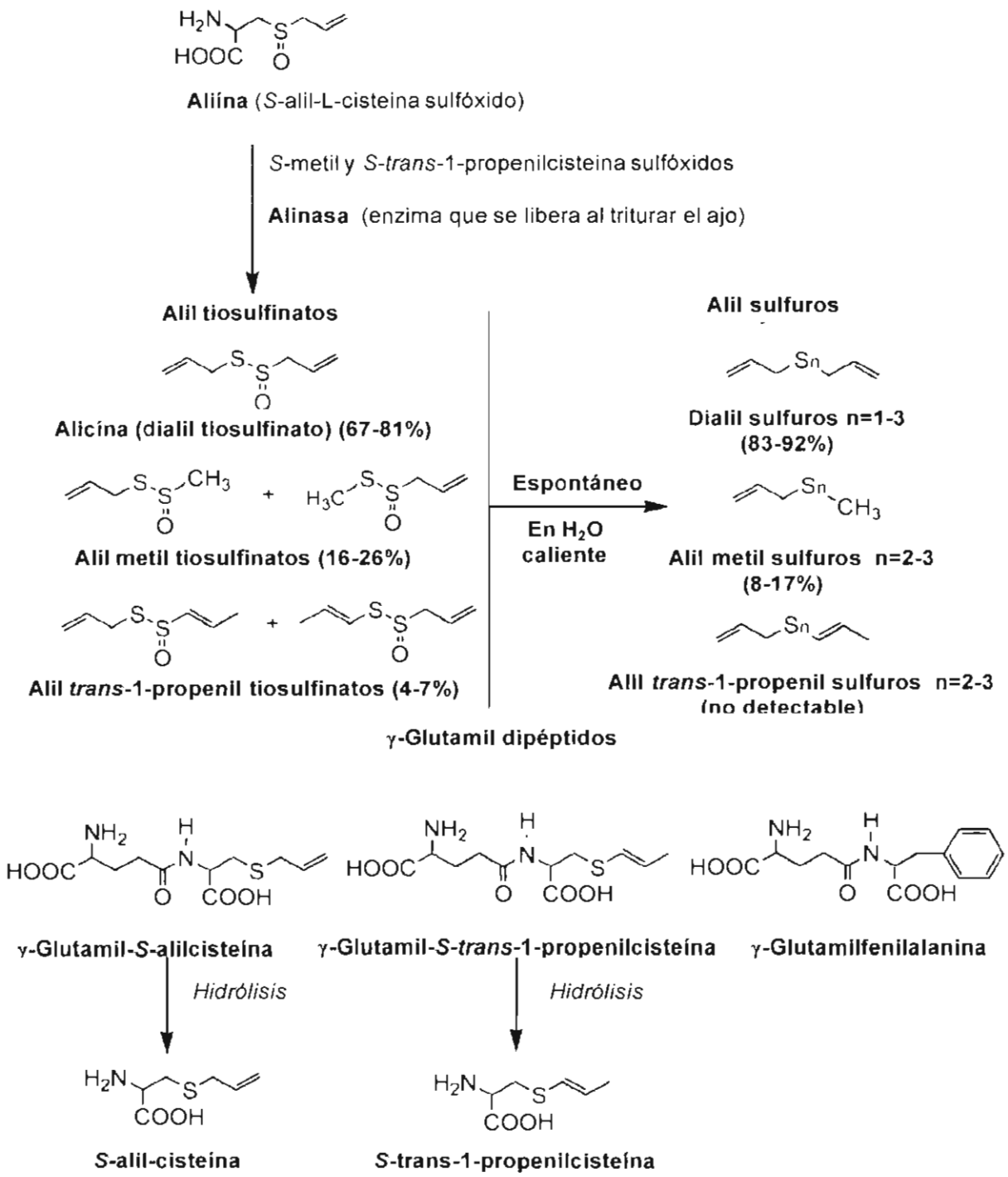


Figura 11. Formación de los compuestos azufrados presentes en extractos de ajo. Porcentaje reportado con respecto a la cantidad de ajo fresco utilizado. Imagen modificada de Lawson y cols., 2005.

3.6.2. Preparados de ajo y su función antioxidante.

Los compuestos azufrados se pueden clasificar con base en el medio de disolución en: 1) hidrosolubles: SAC; S-alil-mercapto-cisteína, S-metil-cisteína y γ-glutamil-S-alil-cisteína. (Block y cols., 1984) y 2) liposolubles: sulfuro dialílico; disulfuro dialílico (dialil-disulfuro), alicina, trisulfuro dialílico (dialil-trisulfuro); trisulfuro alilmetílico; aliina y ajoeno (Figura 12) (Block y cols., 1984).

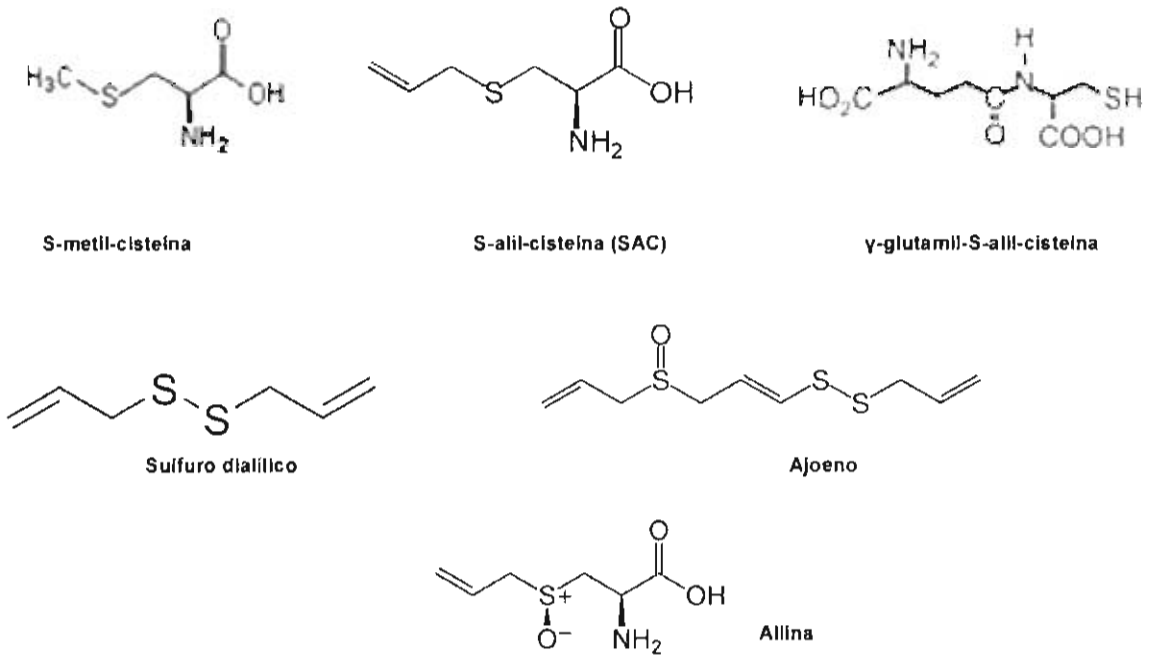


Figura 12. Algunos compuestos azufrados solubles en agua (S-metil-cisteína, Salil-L-cisteina y γ-glutamil-S-alil-cisteina) y en aceite (sulfuro dialílico, ajoeno, aliina) que se encuentran en *Allium sativum* L. Imágenes tomadas de www.chemistry about.com

La presencia de los compuestos azufrados depende en gran medida de la forma de obtención de los diferentes preparados de ajo (aceite esencial, macerado en aceite, deshidratado pulverizado, EAE y extracto hidroalcohólico), del grado de madurez del ajo, prácticas de producción y cultivo, localización de la planta y condiciones de procesamiento (Lawson y cols., 1998). Así, las propiedades biológicas y las características fisicoquímicas pueden variar de acuerdo a condiciones de pH, solventes de extracción y el almacenamiento (Tabla 2 y 3) (García y cols., 2006).

TABLA 2. ELABORACIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS PREPARADOS DE AJO.

PREPARADOS DE AJO	PROCESADO	CONTENIDO	EFECTOS BIOLÓGICOS	REFERENCIAS
ACEITE ESENCIAL	Maceración en solución acuosa por varias horas y destilación.	0.2-0.5% de aceite esencial Presencia de sulfuros, azufre, vitaminas B1 y B2	Antiséptico intestinal y pulmonar, diurético, tónico, antiespasmódico,cardio-tónico y anti-hipertensivo.	Block y cols., 1985; Yan y cols., 1992; Sumiyoshi y cols., 1984; Amagase y cols., 2001.
AJO MACERADO EN ACEITE	Ajo macerado en aceite vegetal durante 24 horas.	Aliina, Alicina, ditiina, ajoeno y alil-sulfuros.	No determinado.	Amagase y cols., 2001; Corzo y cols , 2007.
AJO DESHIDRATADO Y PULVERIZADO	Ajo seco y triturado para usarlo como condimento.	1% de aliina. Alicina y SAC son prácticamente indetectables.	Eficaz en el proceso de desintoxicación por acetaldehído.	Lawson y cols , 1992; Simons y cols., 1995; Kasuga y cols., 2001; Amagase y cols., 2001.
EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO (EAE)	Maceración de láminas de ajo en solución hidroalcohólica (15-20% de etanol) durante 20 meses a temperatura ambiente.	Aliina, ajoeno, SAC, S-metil-*L*-cisteína, S-propenil-S-cisteína, γ-glutamil-S-alilcisteína, SAMC, S-metil-mercapto-cisteína, sulfuros de alilo, Nα-(1-Deoxi-D-fructos-1-il)-L-Arginina, tetrahidro-β-Carbolinas y polifenoles	Cardioprotector, antiteratogénico, antiagregante plaquetario, neuroprotector, antioxidante, aumenta la concentración celular de glutatión, previene la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes. Inhibe la transcripción de NF-kB	Weinberg y cols., 1993; Amagase y cols., 1993. 2001; Brunetti y cols., 2009; Aguilera y cols., 2010; Rahman y cols., 2000; Steiner y cols., 2001). Amorati y cols , 2008; Morihara y cols., 2011; Jeong y cols., 2012; Alkreathy y cols., 2010; Nagatoshi y cols., 2001; Ichikawa y cols., 2006.
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE AJO FRESCO	Maceración de ajo en solución hidroalcohólica. El tiempo de reposo va de horas a semanas	Aliina, ajoeno, SAC, S-metil-L-cisteína, S-propenil-S-cisteína, γ-glutamil-S-alilcisteína, sulfuros de alilo y polifenoles.	Antioxidante, antiagregante plaquetario, antibacteriano y antiinflamatorio	Imai y cols., 1994, Das y cols , 1998; Bheakuni y cols., 1971; Borek, 2001.

TABLA 3. PRINCIPALES COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA PRESENTES EN LOS DIFERENTES PREPARADOS DE AJO.

COMPUESTOS	ACEITE ESENCIAL	AJO MACERADO EN ACEITE	AJO DESHIDRATADO PULVERIZADO	EAE	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE AJO FRESCO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS
Alicína	X	X	✓ [0.002 mg/g]	X	✓ [2.5-4.5 µg/g]	Antitrombótico Hipocolesterolemiante Anticancerígeno Antibacteriano Antiagregante plaquetario	Amagase y cols., 2001, The Longwood Herbal Task Force; Linus Pauling Institute.
Aliina	✓ [1.34 mg/g]	✓ [0.56 mg/g]	✓ [1-2.5 mg/g]	✓ [0.034 mg/g]	✓ [6-14 mg/g]	Antitrombótico Hipocolesterolemiante Anticancerigeno	Soto y cols., 2007, Amagase y cols , 2001; Lawson y cols., 2005; Linus Pauling Institute
Ajoeno	✓ [0.168 mg/g]	✓ [0.232 mg/g]	✓*	✓*	✓*	Antiagregante plaquetano Hipocolesterolemiante Anticancerigeno	Soto y cols , 2007, Amagase y cols , 2001; Borek, 2001
S-metil-L-cisteína	X	X	✓*	✓*	✓*	Antioxidante Antimicrobiano Hipocolesterolemiante	Amagase y cols., 2001; Borek, 2001.
S-alil-L-cisteína (SAC)	X	X	✓ [0 0002 mg/g]	✓ [1.81 mg/g]	✓*	Anticancerígeno Antioxidante Antihepatotóxico Cardioprotector Hipocolesterolemiante Neuroprotector Antiinflamatorio	The Longwood Herbal Task Force, Lawson y cols., 2005;
S-propenil-S-Cisteína	X	X	✓*	✓ [0.76 mg/g]	✓*	Antimicrobiano Antifúngico Hipocolesterolemiante Antioxidante	Amagase y cols., 2001; Lawson y cols., 2005.

γ-glutamil-S-alilcisteína	X	X	✓ [1 0 mg/g]	✓ [2.3 mg/g]	✓ [2-6 mg/g]	Hipocolesterolemiante	Linus Pauling Institute; Lawson y cols., 2005.
S-alil-mercapto-cisteína (SAMC)	X	X	X	✓*	X	Antioxidante	Amagase y cols., 2001; Borek, 2001.
S-metil-mercapto-cisteína	X	X	X	✓*	X	Antioxidante	Borek, 2001.
Sulfuros de alilo	✓*	✓*	✓ [1 1 mg/g]	✓* Alixina	✓ [1 20 mg/g]	Antitrombóticos Hipocolesterolemiante Anticancerígenos	Amagase y cols., 2001; Borek, 2001.
Nα-(1-Deoxi-D-fructos-1-il)-L-Arginina	X	X	X	✓*	X	Antioxidante	Ryu y cols., 2001.
Derivados de tetrahidro-β-Carbolinas	X	X	X	✓ [0.40 mg/g]	X	Antioxidantes	Ichikawa y cols., 2006.
Polifenoles	✓*	✓*	●	●	✓*	Antioxidantes	Soto y cols., 2007; Garcia y cols., 2006
Flavonoides	✓*	✓*	●	●	✓*	Antioxidantes	Soto y cols., 2007; Garcia y cols., 2006.

Presencia del compuesto (✓), concentración [mg/g de ajo], ausencia del compuesto (X); presencia del compuesto pero no se sabe su concentración (✓*); no existe información sobre su presencia o ausencia (●)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El EAE ha sido comercializado y utilizado para la prevención de diversas enfermedades cardiovasculares, en la reducción del nivel de homocisteina, colesterol y triglicéridos (McRae, 2005). Dichas propiedades se le atribuyen al largo proceso de añejamiento (de hasta 20 meses) donde los componentes químicos presentes en el ajo fresco se transforman dando origen a compuestos diferentes con gran poder antioxidante (Imai y cols., 1994; Ide y cols., 1998). A nivel experimental se ha demostrado que el EAE es capaz de disminuir el daño cerebral isquémico (Numagami y cols., 1995; Borek, 2001; Aguilera y cols., 2010) y aunque se desconoce el mecanismo de acción del extracto, se ha sugerido que su efecto neuroprotector se debe a la presencia de compuestos azufrados resultantes del proceso de añejamiento como la SAC (Borek, 2001; Aguilera y cols., 2010). Sin embargo, diversos extractos de ajo fresco y aceites comerciales de ajo también poseen propiedades antioxidantes involucradas en la neuroprotección (Saleem y cols., 2006). Debido a ello, fue de nuestro interés comparar el efecto protector del extracto de ajo envejecido, con los extractos hidroalcohólicos de endocarpo y exocarpo de ajo fresco, en el modelo de OACM en rata, para determinar su potencial terapéutico en la ICT. También, determinamos el efecto que ejercieron los tres extractos de ajo, en el nivel de expresión de diversos genes (NR1, NR2-B, GCLC y PAI-1) involucrados en la respuesta adaptativa ante el *ictus* isquémico. Cabe mencionar que la información obtenida mediante está investigación científica permitirá el desarrollo de neurofármacos de origen natural, para su uso en la prevención y control de la ICT en el futuro.

5. HIPÓTESIS.

Debido a la similitud en la composición química del EAE y de los extractos hidroalcohólicos de material fresco de diente y cáscara de *Allium sativum* L., ambos mostrarán actividad neuroprotectora contra la ICT en rata.

6. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el potencial neuroprotector de los extractos y fracciones obtenidos de material fresco de *Allium sativum* L. en la ICT en rata y compararlos con el efecto del EAE.

6.1. Objetivos particulares.

1. Obtención de extractos hidroalcohólicos a partir de material fresco del endocarpo y del exocarpo de *Allium sativum* L.

2. Determinar el efecto neuroprotector de los extractos obtenidos en un modelo de ICT en ratas Wistar.

3. Comparar el efecto neuroprotector de los dos extractos hidroalcohólicos de material fresco de *Allium sativum* L. con el efecto observado para el EAE.

4. Realizar el fraccionamiento del extracto con presunta actividad biológica neuroprotectora.

5. Determinar la actividad biológica de cada extracto y de las fracciones obtenidas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Material Vegetal.

El material vegetal (bulbo de *Allium sativum* L.) utilizado en este estudio fue adquirido en la tienda de autoservicio Soriana-Parque Delta de origen Mexicano proveniente del estado de

Sonora. La identificación botánica fue elaborada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras y un ejemplar de referencia se depositó en el herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro social.

7.2. Animales.

Se utilizaron ratas Wistar macho adultos de 280-350g de peso corporal. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico, a temperatura ambiente y con ciclos de 12 h luz/obscuridad. Se les proporcionó libre acceso al alimento (LAB DIET). Este alimento es exclusivo para roedores de laboratorio en etapa de mantenimiento, libre de drogas, antibióticos y estrógenos sintéticos, con formulación y nutrición constante lo que elimina las variables nutricionales (norma de calidad ISO-9001:2000). El agua que se les proporcionó fue ozonificada y *ad libitum*. Durante el procedimiento experimental se siguieron las reglas de uso y manejo de animales establecido en la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a los principios éticos para las investigaciones médicas descritos por Helsinki (Asociación Médica Mundial).

7.3. Preparación de los extractos vegetales del bulbo de *Allium sativum* L.

Los extractos hidroalcohólicos de ASD y de ASC de *Allium sativum* L. se prepararon a partir de 260 g de material vegetal. Se sometieron a maceración por separado 229 g de material fresco de endocarpo en láminas delgadas y 31.4 g de exocarpo en fragmentos pequeños que fueron sumergidos en 500 mL de etanol acuoso al 20% a temperatura ambiente durante 7 días por dos ocasiones. Transcurrido el tiempo de maceración, se realizó la filtración de los extractos que fueron concentrados con ayuda de un rotaevaporador hasta sequedad y peso constante para ambos extractos. Obteniendo 51.6 g de ASD y 1.5 g ASC.

7.4. Grupos experimentales.

Grupo control: ratas con administración intraperitoneal de 500 µl de etanol al 20% (vehículo). 2 h después de la administración, los animales fueron sacrificados; **Grupo con isquemia y reperfusión (I/R):** ratas sometidas a 2 h de isquemia por OACM y 2 h de reperfusión. Al inicio de la reperfusión, se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) 500 µl de etanol al 20% y las ratas fueron sacrificadas después de 2 h; **Grupo con isquemia y reperfusión (I/R) + tratamiento (ASD, ASC, EAE, F1 F2 y F3):** ratas sometidas a 2 h de OACM y 2 h de reperfusión. Al inicio de la reperfusión, se les administró por vía i.p. los extractos correspondientes.

7.5. Administración de los compuestos.

Los extractos y fracciones se administraron por vía i.p. al inicio de la reperfusión, 2 h después los animales fueron sacrificados. Los extractos ASD, ASC y EAE se administraron a una dosis de 360 mg/kg en 500 µl de etanol al 20% como vehículo. Las tres fracciones (F1, F2 y F3) obtenidas a partir del fraccionamiento de ASD se administraron a una dosis de 120 mg/Kg en 500 µl de etanol al 20%.

7.6. Inducción de la ICT.

La inducción de la ICT se llevó a cabo mediante la técnica del filamento intraluminal descrito por Zea Longa y cols., 1989 (Figura 14). Los animales se anestesiaron en una cámara de isoflurano al 2%. Enseguida, la bifurcación de la carótida cervical izquierda fue expuesta a través de una incisión en el cuello del animal. Posteriormente, un monofilamento de nylon 3/0 se introdujo a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm). En este punto, el filamento indujo la OACM. Después de 2 h de obstrucción, los animales fueron anestesiados y se les administró los extractos por vía intraperitoneal. A continuación, el filamento se retiró cuidadosamente para

permitir la reperfusión sanguínea. Las ratas se sacrificaron después de 2 h de reperfusión conforme a las técnicas empleadas en los análisis posteriores.

La OACM fue realizada por la **Dra. Alma Ortiz Plata**, investigadora del laboratorio de Neuropatolgía Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

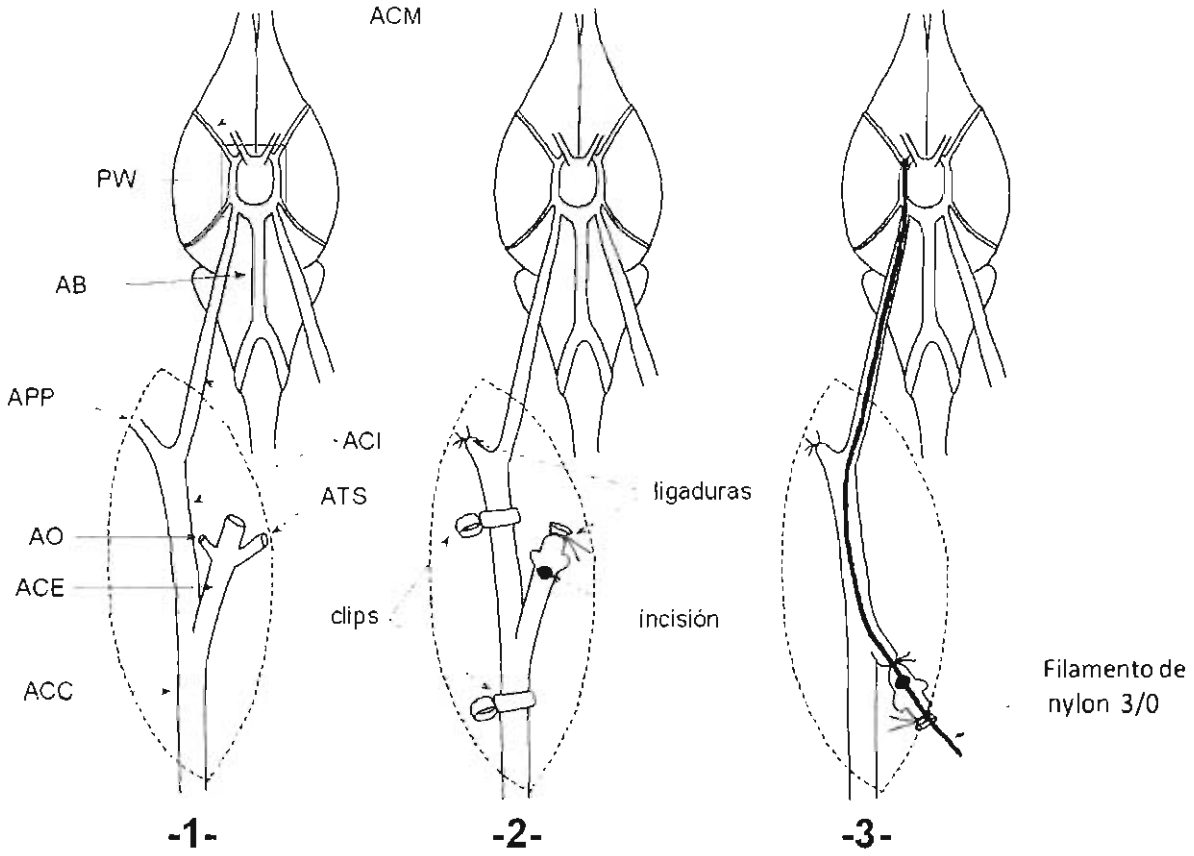


Figura 14. Anatomía vascular de la zona ventral derecha del cuello y de la base del encéfalo de la rata, mostrando la secuencia quirúrgica para la introducción de la sutura intraluminal. La línea discontinua delimita el campo quirúrgico. 1- Arteria basilar (AB); arteria carótida común (ACC); arteria carótida externa (ACE); arteria carótida interna (ACI); arteria cerebral media (ACM); arteria occipital (AO), arteria pteriogopalatina (APP); arteria tiroidea superior (ATS); polígono de Willis (PW). 2- Termocoagulación y sección de las ramas de la ACE; ligadura y sección de la ACE; colocación de clips microvasculares para impedir el aporte sanguíneo y realización de una incisión (incisión) en la ACE. 3- Retirada de los clips microvasculares e introducción de la sutura de nilón con la cabeza redondeada hasta la base de la ACM en el polígono de Willis. Imagen modificada de (Pérez y cols , 2005)

7.7. Pruebas conductuales para la determinación del déficit neurológico.

Previo a la reperfusión (al término de 2 h de la OACM) se realizó un test para evaluar el estado neurológico de las ratas mediante dos pruebas conductuales: 1) Flexión de la pata contralateral a la lesión: las ratas fueron suspendidas por la base de la cola. Se observó la flexión de la extremidad delantera contralateral a la lesión (Hunter y cols., 2000) y 2) Conducta de giro: las ratas fueron sostenidas por la base de la cola, permitiéndoles moverse libremente al apoyar las patas delanteras. Los animales con lesión giraron en sentido contralateral a la lesión (Menzies y cols., 1992; Hunter y cols., 2000). Las ratas con OACM fueron evaluadas durante 30 segundos, se contó la cantidad de giros dados en el sentido de las manecillas del reloj y se consideró presencia de daño cerebral cuando realizaron más de 5 giros. De acuerdo con este test, los animales con déficit neurológico fueron aquellos que salieron positivos a ambas pruebas.

7.8. Inclusión en frio de los tejidos cerebrales.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Sedal phorte) a una dosis de 63 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal y perfundidos a través del ventrículo derecho del corazón con 100 mL de solución salina conteniendo 0.5% de heparina (5 000 U/mL). Posteriormente, los animales se perfundieron con 100 mL de paraformaldehido al 4% (p/v) en amortiguador de fosfatos (PBS) (NaCl, 137mM; KCl, 2.7mM; NaHPO, 10mM; KH_2PO, 2mM, pH 7.4) a temperatura ambiente. Los cerebros fueron disecados y se post-fijaron en paraformaldehido al 2% (p/v) durante 24 h a 4°C.

Los cerebros fijados se sometieron a soluciones crioprotectoras de sacarosa en PBS (10%, 20% y 30% p/v) a temperatura ambiente. Cada cerebro fue sumergido con 50 mL de la solución de sacarosa al 10% hasta alcanzar el equilibrio (momento en que se hundió en el fondo del recipiente). Lo mismo se realizó para cada uno de las siguientes soluciones. En seguida, los cerebros fueron incluidos (coordenada interaural 9.36 mm y Bregma 0.36 mm) en frío por congelación empleando Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature (OCT) y se

colocaron en el ultracongelador durante 24 h. Posteriormente se realizaron cortes coronales y seriales de 10 µm de la parte frontal de cada cerebro incluido mediante el empleo de un criostato (*Microm HM 520*). Dichos cortes se montaron en portaobjetos de xilano recubiertos con gelatina al 5% (p/v) en H_2O.

7.9. Inmunofluorescencia.

Los cortes coronales de cerebro fueron bloqueados y permeabilizados, incubándolos durante 45 min a temperatura ambiente con 50 µL de albúmina de suero de bobino (BSA) al 3% (p/v) en PBS con tween 20 al 0.5% (p/v). Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno por sumersión en PBS (solución de lavado). Después, cada tejido se incubó con 50 µL de la solución de BSA al 3%+ anticuerpo primario que reconoce a la proteína nuclear neuronal específica en los vertebrados NeuN (anti-NeuN monoclonal de ratón 5 µg/mL, *Chemicon International*; MAB-357) diluido en BSA al 3% (p/v) en PBS y mantenido en obscuridad, durante 24 h a 4°C y en cámara húmeda. Posteriormente, las preparaciones se lavaron 3 veces y enseguida se incubaron con 50 µL del anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (anti-IgG de ratón DyLight-488, 3 µg/ml; *Jackson ImnunoResearch*; MAB-715-485-150) en BSA al 3% (p/v) en PBS, durante 90 min en una cámara húmeda, en obscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, las laminillas fueron lavadas por inmersión en 50 mL de PBS en 3 ocasiones.

Para la identificación de núcleos, a cada tejido se le incubó con 50 µl de 6-diamino-2-fenilindol (DAPI), (10 µg/mL de DAPI en PBS) e inmediatamente se incubaron durante 10 min, en obscuridad a temperatura ambiente. Después, las preparaciones fueron lavadas 2 veces en PBS. Finalmente, para el montaje de las laminillas se utilizaron 50 µL de glicerol al 10% (v/v) en PBS (Técnica modificada de Liu y cols., 2009).

Los cerebros se evaluaron empleando un microscopio de epifluorescencia Leica IM1000 versión 1.20 conectado a una cámara Leica DFC-300FX y usando el objetivo de 40x. Se adquirieron 20 imágenes seriadas (campos) en 2 canales del filtro de emisión del

microscopio; 500-520 nm (verde); para la identificación de NeuN y 422-430 nm (azul); para identificación de DAPI en dos regiones del cerebro; a) región anterior de la corteza somatosensorial primaria y b) corteza somatosensorial secundaria y cuerpo estriado, de ambos hemisferios (contralateral e ipsilateral a la lesión) (Figura 15-A).

Las imágenes fueron adquiridas usando el mismo tiempo de exposición con el software LEICA IM1000. La composición seriada de las 20 imágenes y el empalme de los dos canales que corresponden al filtro verde y azul de emisión de la fluorescencia, se elaboró usando el programa Adobe Photoshop cs5 (Figura 15-B). Para determinar que células eran positivas para la marca de NeuN y DAPI, se realizó el preprocesamiento de las composiciones de las imágenes empleando el programa Image J. La etapa de preprocesamiento consistió en la substracción del sombrado y del fondo para eliminar el ruido de la imagen y la segmentación por intensidades de cada pixel, lo que permitió la generación de dos máscaras en escala de grises; una correspondiente al canal verde (marca que pertenece a la presencia de la proteína NeuN en las neuronas) y otra al canal azul (marca nuclear realizada con DAPI). Después de designar los valores en pixeles que corresponden a la marca, se procedió a hacer el conteo de núcleos y neuronas mediante selección automática (en regiones de la imagen donde las marcas estaban traslapadas se procedió a hacer el conteo de manera manual). El número de neuronas positivas a NeuN fue normalizado entre el número de núcleos marcados y multiplicado por 100.

A

VISTA LATERAL DEL CEREBRO DE RATA

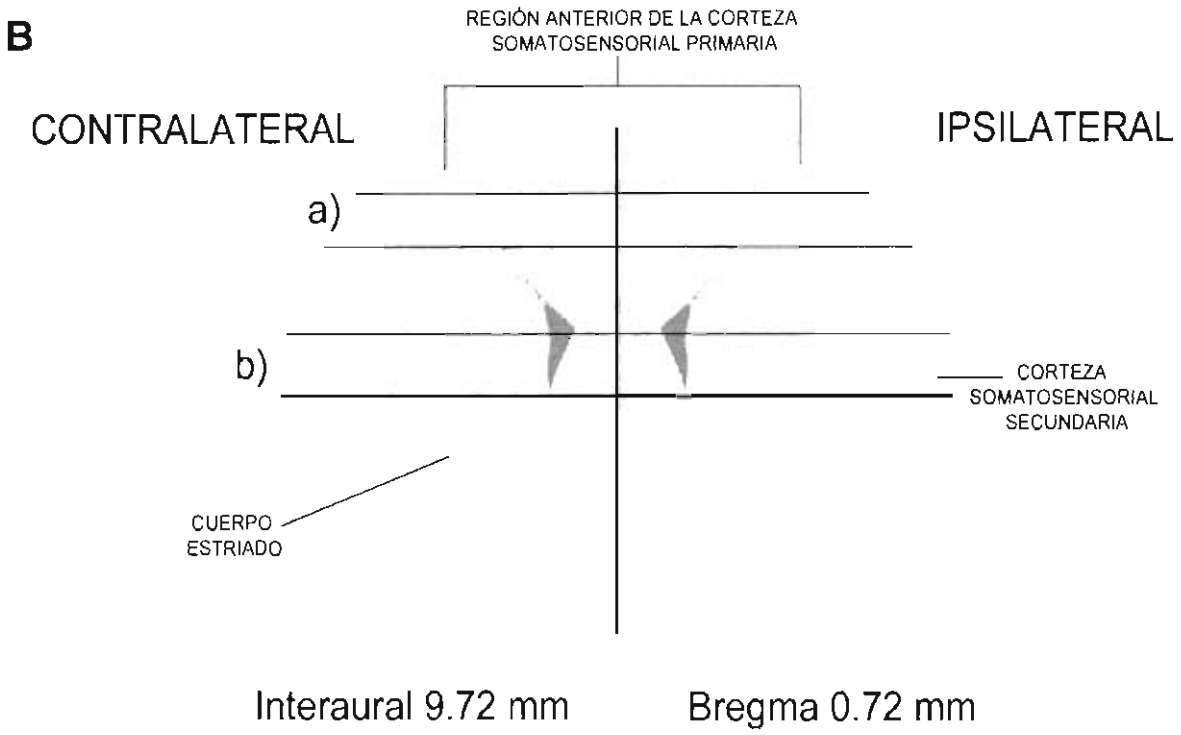


Figura 16. Esquematización del cerebro de rata. A) Vista lateral del cerebro de rata donde se señala en rojo la región donde se realizaron los cortes coronales para la evaluación del efecto neuroprotector de los tres extractos. B) Corte coronal de cerebro de rata (coordenada interaural 9.72 mm y Bregma 0.72 mm) que muestra las zonas de captura de 20 imágenes seriadas; a) región anterior de la corteza somatosensorial primaria y b) corteza somatosensorial secundaria incluyendo el cuerpo estriado Imagen modificada y tomada de Rat Brain Atlas, Elseiver 2004.

7.10. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta.

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre 150 g de gel de sílice, Kieselgel 60 Merk (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm) a la que se le agregó una mezcla de 20 g de gel de sílice con 10 g del extracto de ASD. Como resultado de este proceso se obtuvieron 45 fracciones secundarias de 30 mL c/u que fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCF); para ello se utilizó placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (20 x 20 cm, Silica gel 60 F254, Merck) y eluyente compuesto por etanol, acetona y agua

(proporción 3:3:1 respectivamente). Para el revelado de la placa se empleó una disolución elaborada con ninhidrina al 0.3% (p/v) en etanol/ácido acético al 3% (v/v) (útil para la determinación de la presencia de aminoácidos). De acuerdo con su similitud cromatográfica, las 45 fracciones secundarias se agruparon en 3 fracciones primarias (F1/F3) que fueron almacenadas a 4° C.

7.11. Extracción y cuantificación del ARN total.

En todo el procedimiento se utilizó material nuevo y libre de RNasas. El ARN total se extrajo de la corteza frontoparietal del cerebro (50 mg de tejido) en 1 mL de reactivo Tripure (*Boehringer Mannheim*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 200 µL cloroformo y la mezcla se mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 12,000xg durante 15 min a 4° C. Se tomó la fase superior (que contiene el ARN), se agregaron 0.5 mL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. La muestra se centrifugó nuevamente a 12,000xg durante 10 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 75% (v/v) en agua tratada con el inhibidor de RNasas dietilpolicarbonato (DEPC). Posteriormente, la pastilla con etanol se centrifugó a 7500xg durante 5 min a 4° C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante 10 min. Ulteriormente, la pastilla se resuspendió con 50 µL de agua DEPC. El ARN total se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Beckman Du 530) utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mL.

7.12. Transcripción Reversa.

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 5 µg de ARN total empleando 2.5 µM de hexámeros al azar, amortiguador de reacción (25 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM de KCl y 3nM de $MgCl_2$), 1 mM de dNTPs, 20 U de ARNsin y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV-RT. La reacción se incubó durante 1 hora a 37° C. El ADNc se almacenó en congelación a -20° C hasta su uso.

7.13. PCR en tiempo real.

La cuantificación de ARNm se realizó por PCR en tiempo real utilizando ensayos prediseñados que contienen oligonucleótidos sentido y antisentido y una sonda TaqMan MGB 6-FAM específicos (Applied Biosystems). Se cuantificó la expresión de los siguientes ARNm: ***GCLC*** (Rn00563101 m1), ***NR-1*** (Rn01436035 m1), ***NR2-B*** (Rn00680480 m1) y (***PAI-1,*** inhibidor del activador de plasminógeno-1) (Rn01481341 m1). Como control interno del ensayo se utilizó al ARN ribosomal de la subunidad 18S (sonda TaqMan VIC). Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo sin ADNc. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el proveedor: 1 ciclo de 10 min a 95° C y 40 ciclos de: 15 segundos a 92° C y 1 minuto a 60° C. En este procedimiento se utilizó un termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems. El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo ΔCT (Livak y cols., 2001).

7.14. Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba post-hoc de Tukey, usando el software GraphPad Prism versión 4.02.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. RENDIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DEL BULBO DE *Allium sativum* L.

Por extracción hidroalcohólica se obtuvieron 21 g de ASD por cada 100 g de material fresco de endocarpo y 3 g por cada 100 g de material fresco de exocarpo. Tanto ASD como ASC son de color café, con consistencia viscosa y olor característico a ajo.

8.2. INMUNOFLUORESCENCIA; INMUNOREACTIVIDAD POSITIVA PARA NeuN.

En diversos trabajos experimentales se ha demostrado que tras el *ictus* isquémico, las neuronas que han sobrevivido a la hipoxia, son capaces de expresar la proteína neuronal específica NeuN. El anticuerpo contra la porteína NeuN ha sido ampliamente utilizado como un marcador específico para neuronas en modelos experimentales de isquemia y una disminución en la inmunorreactividad de esta proteína se asocia con la lesión y muerte neuronal (Wolf y cols., 1996; Preusser y cols., 2007; Liu y cols., 2009). Por lo tanto, tomando en cuenta lo anterior, decidimos utilizar la expresión de la proteína NeuN para determinar el efecto de la ICT y la actividad neuroprotectora de los extractos frescos y del envejecido de ajo (ASD, ASC y EAE), en cortes coronales de cerebro de ratas, en dos regiones; 1) en la región anterior de la corteza somatosensorial primaria y 2) en la corteza somatosensorial secundaria.

A nivel de la región anterior de la corteza somatosensorial primaria, se observó inmunorreactividad para NeuN tanto del lado ipsilateral (Figura 16) como del lado contralateral a la lesión (Figura 17). En el caso del lado ipsilateral a la lesión, se demostró que la imnunorreactividad para NeuN fue similar tanto en el grupo CT como en los grupos tratados con los extractos de ajo. Es decir, la imnunorreactividad para NeuN es intensa y homogénea en el núcleo de las neuronas y un poco menos intensa en el citoplasma pero igualmente homogénea. Las imágenes con fluorescencia en azul, que corresponden a la tinción con DAPI para identificar núcleos celulares se empalmaron con las de NeuN (MERGE) y al realizar la comparación entre ellas, se observa que la señal de NeuN esta asociada a células (Figura 16).

Por otro lado, al realizar el conteo de neuronas positivas a NeuN en la región anterior de la corteza somatosensorial primaria, en el lado ipsilateral a la lesión se obtuvieron los siguientes porcentajes: CT, (77.50±12.24); I/R, (84.33±9.33); I/R+EAE, (77.17±10.46); I/R+ASD, (87.67±2.58) e I/R+ASC, (89.67±6.77) (Figura 20-A). Al comparar estos valores, se observó que no hay diferencia significativa, es decir; que el porcentaje de células positivas a NeuN es similar en todos los grupos, lo que demuestra que a nivel de la región anterior de la corteza somatosensorial primaria, la lesión generada durante 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión no

es lo suficientemente grande como para abarcar esta zona cerebral. Esto resultados coinciden con diversos estudios donde se ha demostrado que durante 1.5-2 h de isquemia y 2-6 h de reperfusión (Zea-Longa y cols., 1989; Liu y cols., 2009; Aguilera y cols., 2010), las zonas infartadas son; el cuerpo estriado que es visible como un núcleo isquémico denso cuyo volumen se extiende hacia la parte proximal de la corteza incluyendo el labio superior de la corteza somatosensorial primaria, corteza somatosensorial secundaria y la región granular insular proximal sin llegar a la región anterior de la corteza somatosensorial primaria. Es por ello, que en esta región a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión no se observo un efecto generado por la ICT ni el etecto neuroprotector de los extractos.

Así mismo, en la región anterior de la corteza somatosensorial primaria, en el lado contralateral a la lesión (hemisferio no isquémico) no se observó disminución en la imnunorreactividad a NeuN en el grupo de ratas sometido a la OACM (I/R) ni en ningún grupo tratado con los extractos de ajo como se esperaba (Figura 17). Comparando los resultados, de los porcentajes obtenidos en el conteo de neuronas; CT, (82.33±7.27); I/R, (77.67±6.94); I/R+EAE, (81.17±6.23); I/R+ASD, (83.00±5.00) e I/R+ASC, (84.45±7.30) (Figura 20-B), es evidente que el grupo control (CT) es similar al grupo I/R y a los grupos tratados con ASD, ASC y EAE. Entonces, en nuestro modelo experimental, el *ictus* generado a 2 h de isquemia/ 2 h de reperfusión aparentemente no generó muerte neuronal en el hemisferio contralateral a la lesión. Es importante mencionar que con la técnica empleada en este trabajo, es dificil afirmar que no hubo una alteración neuronal inducida por el *ictus* en el lado contralateral. De hecho, existen evidencias que demuestran que después de una lesión isquémica focal experimental ocurren adaptaciones morfofuncionales y moleculares en la corteza contralateral, debido a que existe una estrecha relación y una amplia conectividad entre las células cerebrales. Estas adaptaciones involucran hiperexcitabilidad, cambios en la conformación de las espinas dendríticas y sobre-regulación en la expresión de varios genes, la mayoría de ellos asociados con plasticidad, señalización neuronal y factores de crecimiento (Angeleri y cols., 1993; Arango-Dávila y cols., 2004; Medina y cols., 2008). Sin embargo, al parecer estas alteraciones no son evidentes al evaluar la muerte neuronal con NeuN.

Por otro lado, en la corteza somatosensorial secundaria, del lado ipsilateral a la lesión, la inmunorectividad positiva a NeuN mostró menor número de células marcadas para el grupo I/R que el resto de los tratamientos (Figura 19). En el conteo de neuronas positivas a NeuN se observaron los siguientes valores: CT, (67.55±3.79); I/R, (27.65±15.39); I/R+EAE, (44.98±7.04); I/R+ASD, (45.38±7.60) e I/R+ASC, (50.08±3.95) (Figura 21-A). Estos resultados muestran que la lesión cerebral inducida a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión (grupo I/R) disminuye la cantidad de neuronas viables de manera significativa ($P<0.05$). Esta disminución en el número de neuronas positivas a NeuN fue prevenida en los grupos tratados con ASD, ASC y EAE. Sin embargo, es necesario realizar otros ensayos experimentales (como la evaluación de la expresión de la proteína NeuN en tiempos prolongados de isquemia/ reperfusión) para determinar si el efecto neuroprotector es parcial o permanente, ya que existen evidencias de que el EAE posee un efecto transitorio que posterga el daño neuronal en las primeras horas de reperfusión (Aguilera y cols., 2010).

En la corteza somatosensorial secundaria del lado contralateral a la lesión, la inmunoreactividad para NeuN en los grupos CT, I/R+ASD, I/R+ASC e I/R+EAE, se observó que la fluorescencia fue intensa y homogénea en el núcleo, sin embargo en el grupo I/R se encontró que la intensidad de la fluorescencia en el núcleo está disminuida y fragmentada; y en el citoplasma se encuentra aumentada con respecto al núcleo (Figura 19). En general, aunque la pérdida de marcaje con NeuN se considera como una evidencia de muerte neuronal, esta también puede ser resultado de la disminución en la presencia de la proteína o la perdida de antigenicidad (particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo) y no precisamente provocada por la muerte neuronal (Unal-Cevik y cols., 2004). Debido a ello, la disminución de la fluorescencia observada en el grupo I/R en la corteza somatosensorial secundaria en el lado contralateral a la lesión, puede ser el resultado de perturbaciones metabólicas y no de pérdida neuronal (Lind y cols., 2005; Swartz y cols., 2006). Algunos autores afirman que la pérdida de inmunoreactividad es un evento transitorio, que refleja sólo un cambio en el estado de fosforilación de la proteína NeuN y por tanto el proceso podría ser reversible (Lind y cols., 2005). También, se ha demostrado mediante un modelo de toxcicidad con órganofosforados en ratones que la pérdida de la inmunoreactividad de NeuN se puede correlacionar con muerte celular si se evalúa en

tiempos prolongados de sobrevivencia (72 h posterior al *ictus*) (Collombet y cols., 2006). Tomando en cuenta esta premisa, es necesario realizar más ensayos en donde se postergen los tiempos de reperfusión (6, 12, 24 y 72 h) para poder afirmar que la perdida de inmunorreactividad a NeuN no representa muerte neuronal en la corteza somatosensorial secundaria en el lado contralateral a la lesión.

Con respecto al conteo de neuronas en la corteza somatosensorial secundaria, del lado contralateral a la lesión, los porcentajes muestran que no existe diferencia significativa entre ningún grupo; CT, (78.88±6.12); I/R, (69.83±5.21); I/R+EAE, (72.33±8.05); I/R+ASD, (76.67±10.27) e I/R+ASC, (71.01±6.21) (Figura 21-B). Este dato sustenta que en el lado cotralateral a la lesión no existe muerte neuronal en el grupo I/R, y que el fenómeno observado de la disminución en la imnunorreactividad a NeuN, puede deberse a la pérdida de antigenicidad ocasionada por alteraciones metabolicas transitorias inducidas por la OACM.

8.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

De la separación de 10 g de ASD mediante columna abierta se obtuvieron 45 fracciones secundarias de 30 mL cada una. Aquellas que presentaron características cromatográficas similares se juntaron, dando como resultado 3 fracciones primarias identificadas como F1-F3 (Figura 22). En los primeros tres carriles (de izquierda a derecha), las flechas muestran la posición de los tres compuestos separados que presentan carácter aminoácido (siendo el más polar el que se encuentra en la primera posición, seguido del compuesto presente en F2 y F3 el menos polar). En el cuarto carril se observa el perfil de separación cromatográfico del extracto total de ASD, donde se perciben las huellas correspondientes de las tres facciones obtenidas. Es importante mencionar que las cromatoplacas obtenidas en todo el proceso de separación fueron sometidas a observación con radiación UV para la identificación de compuestos fluorescentes pero no se detectó ningún compuesto con está característica.

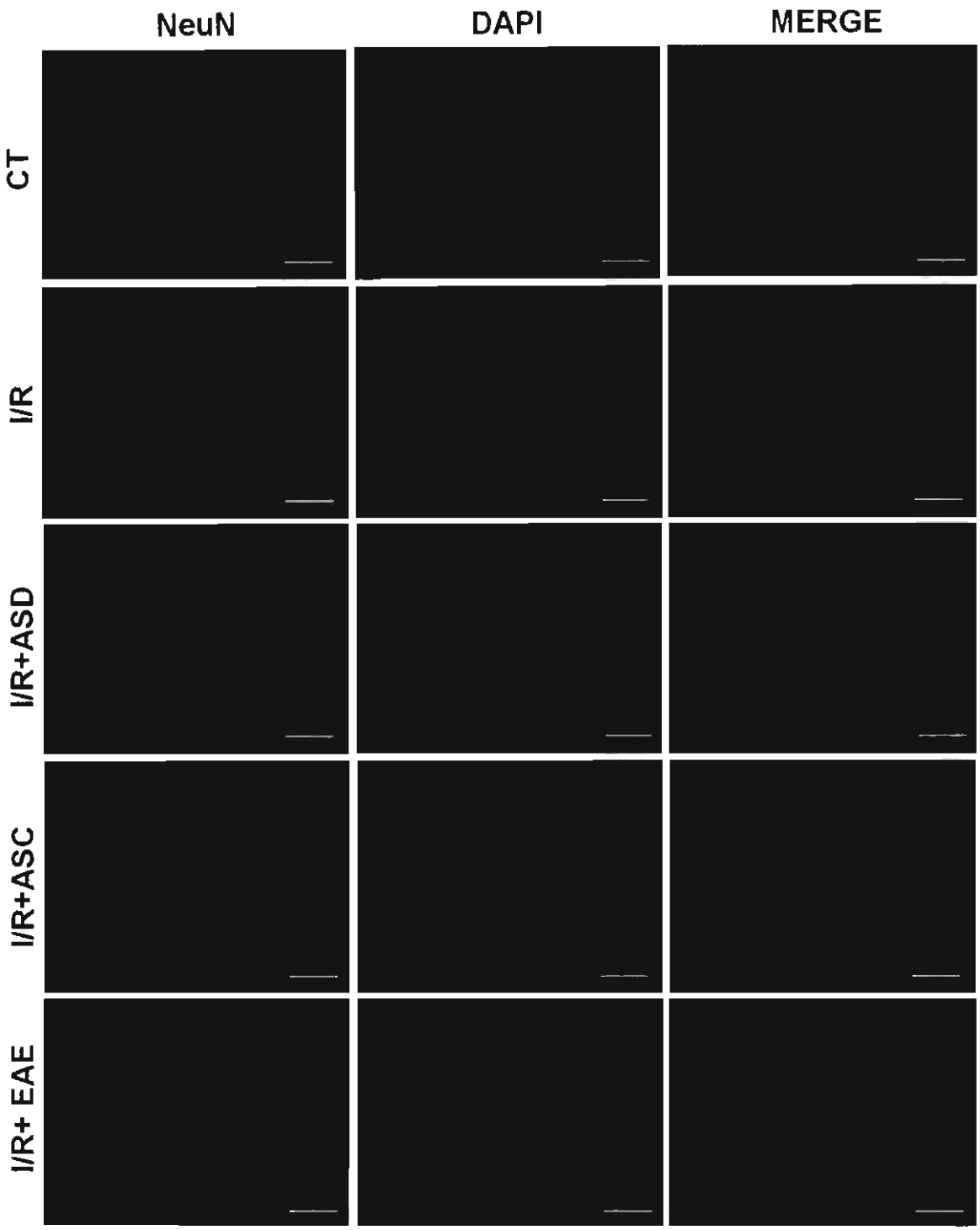


Figura 16. Región anterior de la corteza somatosensorial primaria (lado ipsilateral). Tinción nuclear neuronal con NeuN de cortes coronales de cerebros procedentes de ratas sin isquemia (CT), sometidas a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión (I/R) y ratas con 2h isquemia/ 2h reperfusión tratadas con: I/R+ ASD; extracto de endocarpo, I/R+ASC; extracto de exocarpo, I/R+EAE; extracto de ajo envejecido. DAPI aparece como inmunoreactividad azul, mientras que el marcador celular de neuronas (NeuN) aparece en verde. Las imágenes clasificadas en MERGE corresponden al empalme de los dos marcajes realizados (DAPI y NeuN). Escala 50 µm.

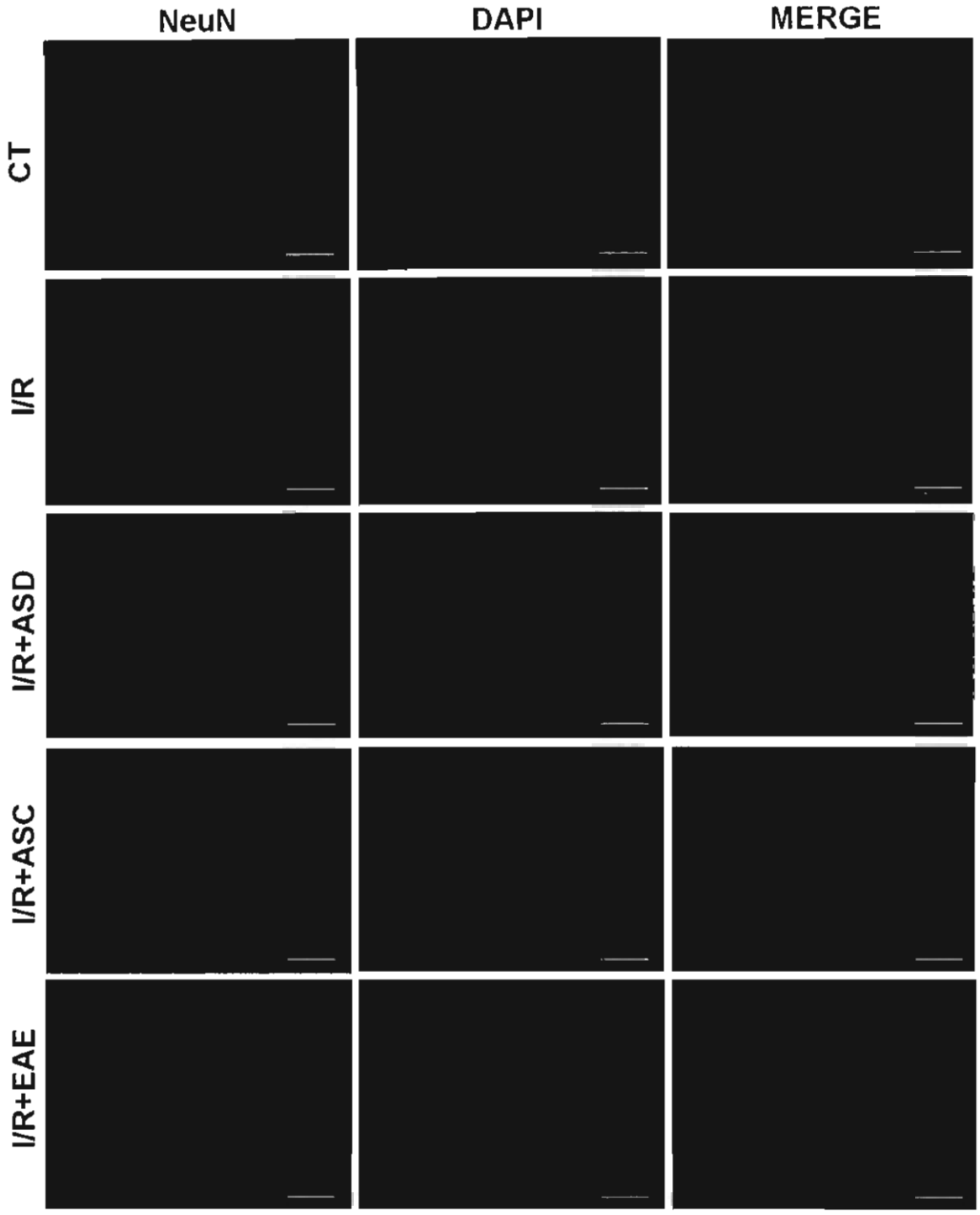


Figura 17. Región anterior de la corteza somatosensorial primaria (lado contralateral). Tinción nuclear neuronal con NeuN de cortes coronales de cerebros procedentes de ratas sin isquemia (CT), sometidas a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión (I/R) y ratas con 2h isquemia/ 2h reperfusión tratadas con I/R+ ASD; extracto de endocarpo, I/R+ASC; extracto de exocarpo, I/R+EAE; extracto de ajo envejecido. DAPI aparece como inmunoreactividad azul, mientras que el marcador celular de neuronas (NeuN) aparece en verde. Las imágenes clasificadas en MERGE corresponden al empalme de los dos marcajes realizados (DAPI y NeuN). Escala 50 µm.

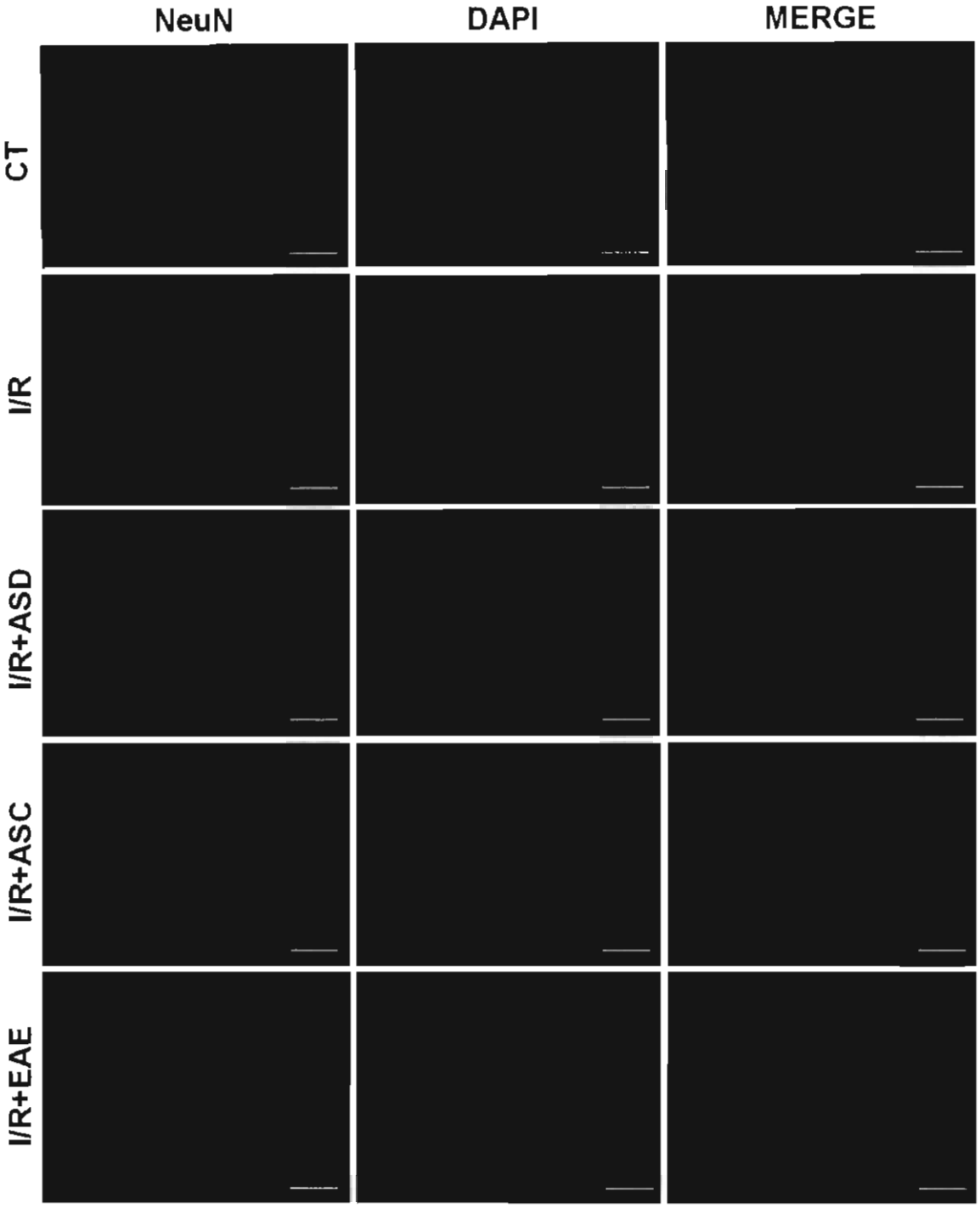


Figura 18. Región de la corteza somatosensorial secundaria y cuerpo estriado (lado ipsilateral). Tinción con NeuN de cortes coronales de cerebros de ratas sin isquemia (CT), sometidas a 2 h isquemia/ 2 h reperfusión (I/R) y ratas con 2h isquemia/ 2h reperfusión tratadas con: I/R+ASD; extracto de endocarpo, I/R+ASC; extracto de exocarpo, I/R+EAE; extracto de ajo envejecido. DAPI aparece como inmunoreactividad azul, mientras que el marcador celular de neuronas (NeuN) aparece en verde. MERGE corresponde al empalme de los dos marcajes realizados (DAPI y NeuN). Escala 50 µm

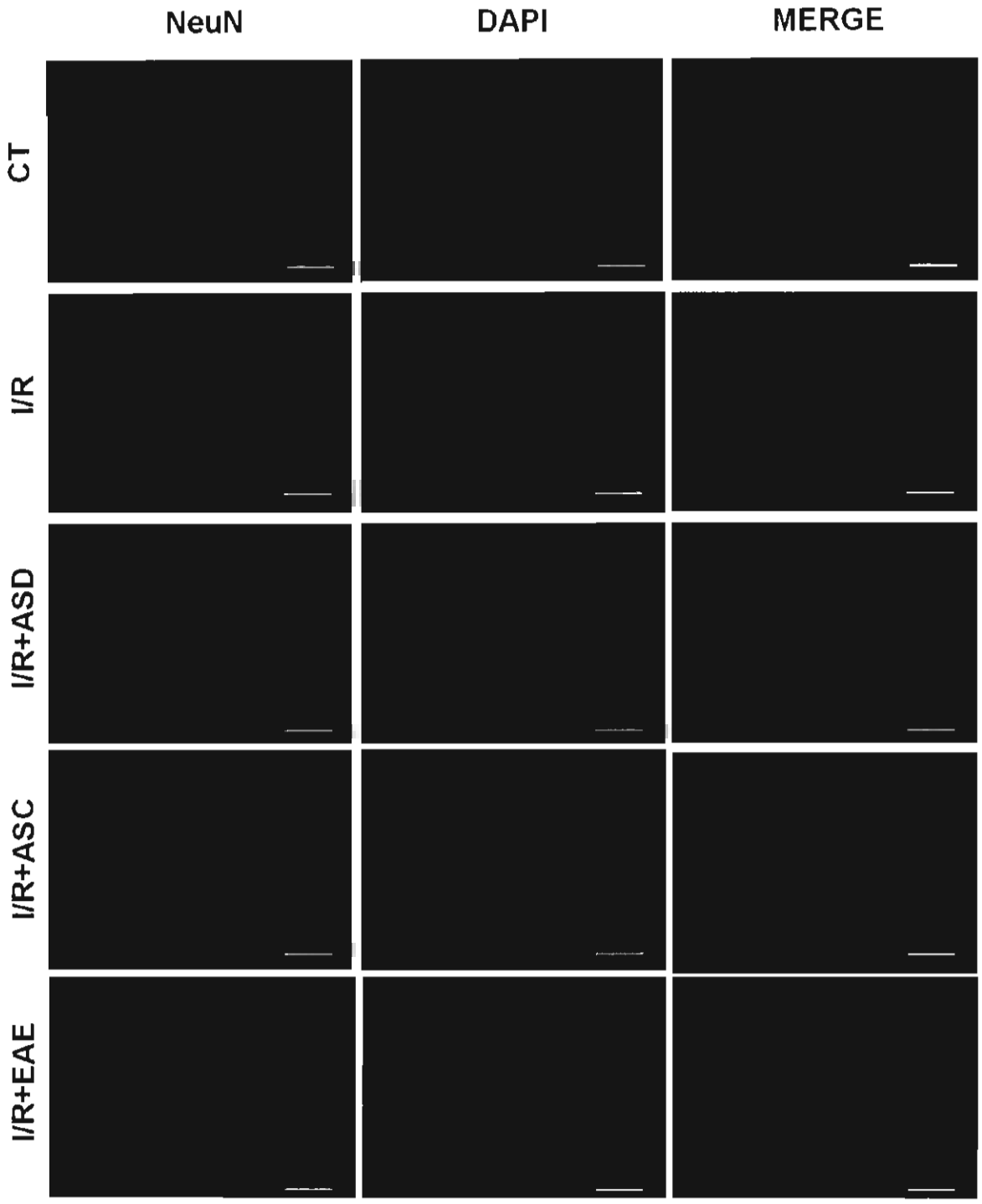


Figura 19. Región de la corteza somatosensorial secundaria y cuerpo estriado (contralateral). Tinción con NeuN de cortes coronales de cerebros de ratas sin isquemia (CT), sometidas a 2 h isquemia/ 2 h reperfusión (I/R) y ratas con 2h isquemia/ 2h reperfusión tratadas con: I/R+ASD; extracto de endocarpo, I/R+ASC; extracto de exocarpo, I/R+EAE; extracto de ajo envejecido. DAPI aparece como inmunoreactividad azul, mientras que el marcador celular de neuronas (NeuN) aparece en verde. MERGE corresponde al empalme de los dos marcajes realizados (DAPI y NeuN). Escala 50 µm.

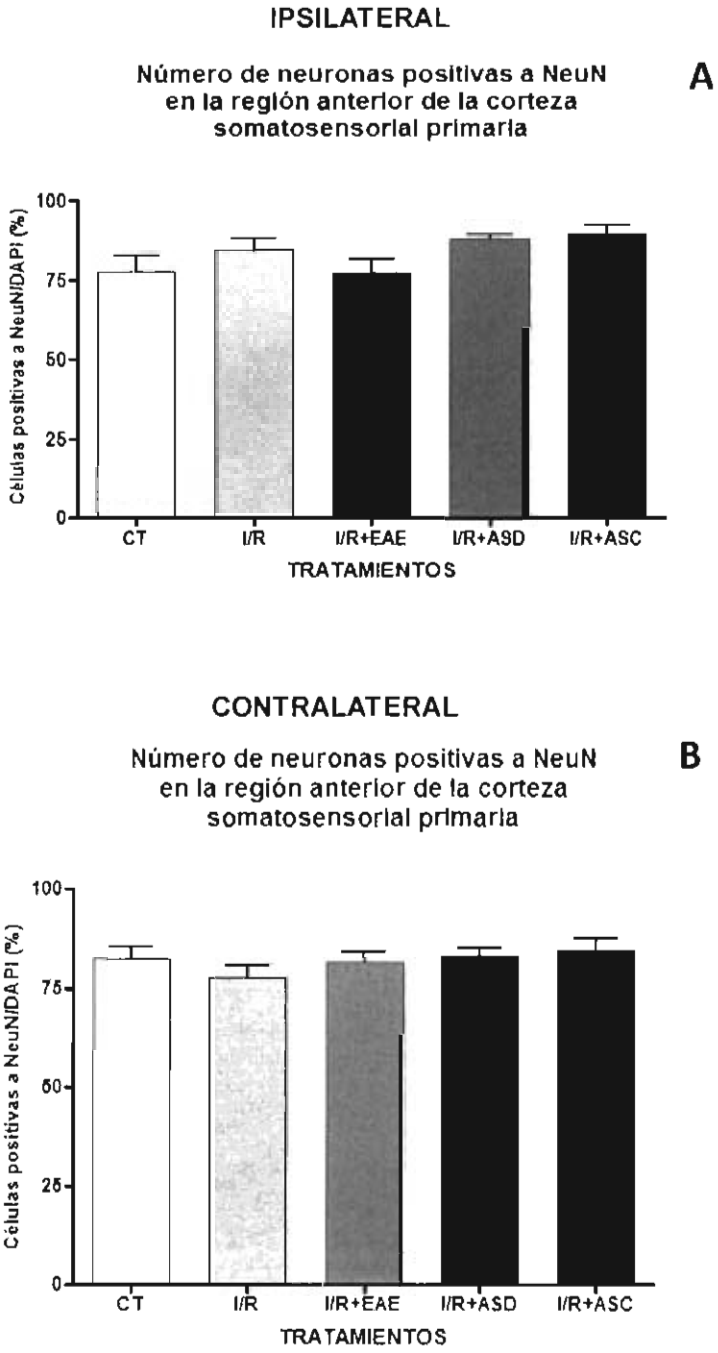


Figura 20. Cuantificación del número de neuronas positivas a NeuN en la región anterior de la corteza somatosensorial primaria. Número de neuronas positivas a NeuN normalizadas entre el número de núcleos positivos a DAPI de cortes coronales de cerebro de ratas sin isquemia (CT), sometidas a 2 h isquemia/ 2 h reperfusión (I/R) y ratas con 2h isquemia/ 2h reperfusión con tratamientos I/R+ ASD; extracto de endocarpo, I/R+ ASC; extracto de exocarpo, I/R+ EAE, extracto de ajo envejecido. **A)** Porcentaje de neuronas positivas a NeuN/DAPI en en el lado ipsilateral a la lesión. **B)** Porcentaje de neuronas positivas a NeuN/DAPI en el lado contralateral a la lesión. Las barras muestran la media ± desviación estándar (ANOVA de una vía, post prueba de Tukey, sin diferencia estadística para $P<0.05$ con respecto al CT).

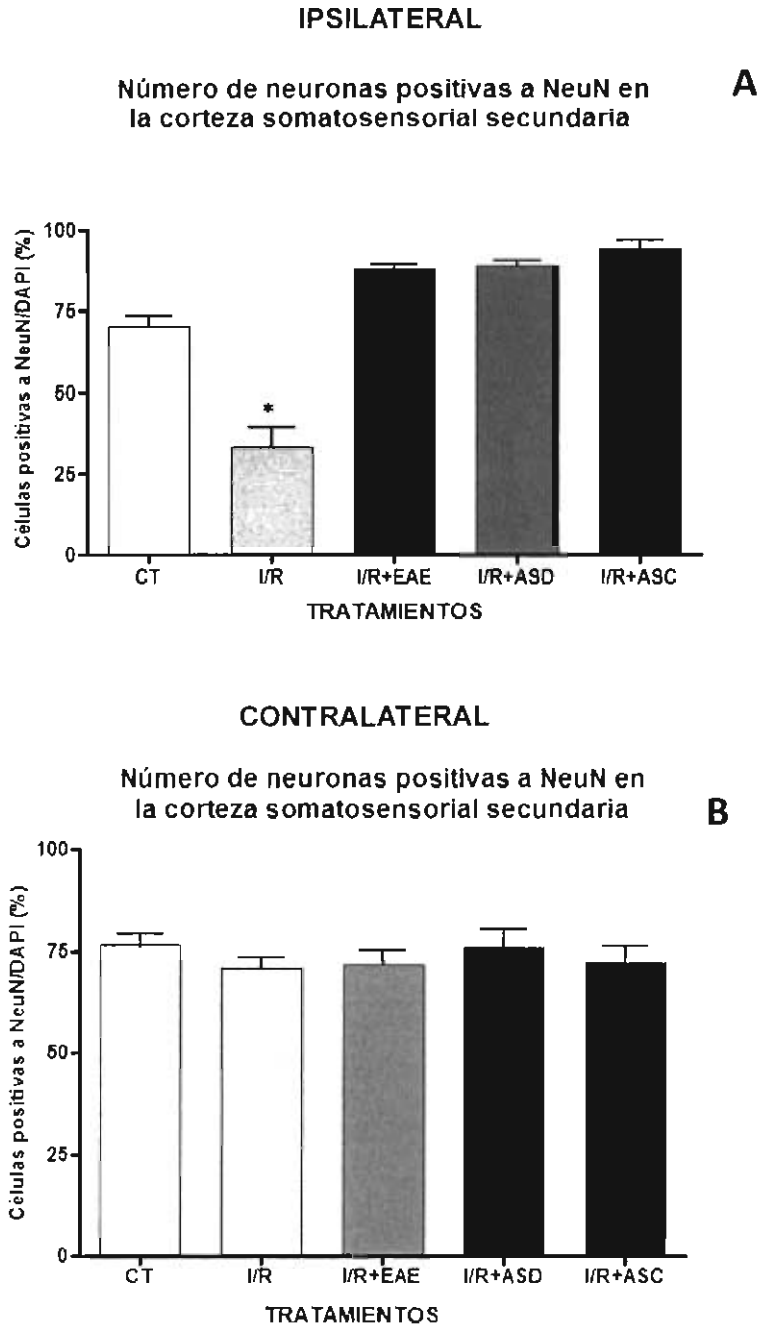


Figura 21. Cuantificación del número de neuronas positivas a NeuN en la región de la corteza somatosensorial secundaria. Número de neuronas positivas a NeuN normalizadas entre el número de núcleos positivos a DAPI de cortes coronales de cerebro de ratas sin isquemia (CT), sometidas a 2 h isquemia/ 2 h reperfusión (I/R) y ratas con 2h isquemia/ 2h reperfusión con tratamientos I/R+ ASD; extracto de endocarpo, I/R+ ASC; extracto de exocarpo, I/R+ EAE; extracto de ajo envejecido. **A)** Porcentaje de neuronas positivas a NeuN/DAPI en el lado ipsilateral de la lesión, **B)** Porcentaje de neuronas positivas a NeuN/DAPI en el lado contralateral a la lesión. Las barras muestran la media ± desviación estándar (ANOVA de una vía, post prueba de Tukey, los asteriscos muestran los grupos con diferencia estadística de $P<0.05$ con respecto al CT).

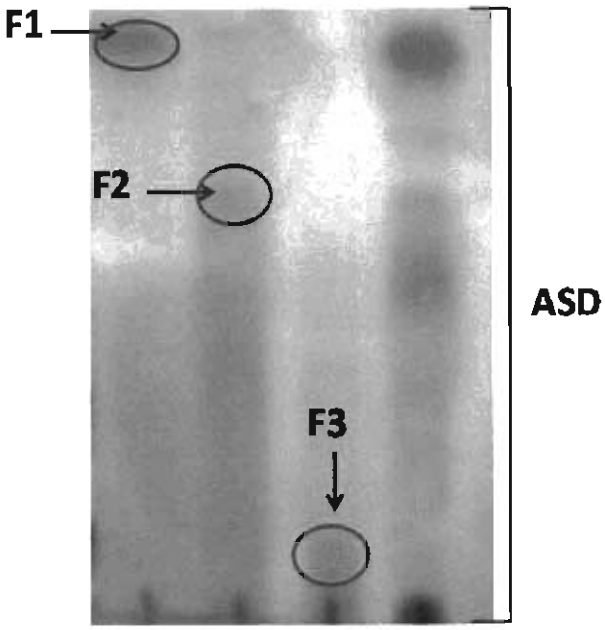


Figura 22. Cromatografía en capa fina donde se observan las tres fracciones primarias (**F1, F2, F3**) obtenidas del fraccionamiento en columna abierta del extracto hidroalcohólico de endocarpo de *Allium sativum* L. (**ASD**) (revelador nihidrina para identificación de aminoácidos).

8.4. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE AJO EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL GEN DE GCLC.

Como se ha mencionado anteriormente, el ajo posee diversos compuestos azufrados con efecto antioxidante (Amorati y cols., 2008; Brunetti y cols., 2009; Morihara y cols., 2011; Jeong y cols., 2012) que le confieren actividad neuroprotectora ante el *ictus* isquémico inducido (Aguilera y cols., 2010). Sin embargo, aún existen interrogantes sobre su posible mecanismo de acción y su participación en la regulación de genes implicados en la respuesta adaptativa ante la ICT. Por tal motivo, decidimos analizar el efecto de los extractos hidroalcohólicos de material fresco de ajo (ASD y ASC), del EAE y de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de ASD (F1-F3), en el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR-1 y NR-2B de los NMDARs, de la subunidad GCLC y de PAI-1, genes implicados en la respuesta adaptativa ante el *ictus* isquémico.

Los resultados obtenidos en el porcentaje de expresión del gen GCLC ante los diferentes tratamientos fueron: I/R (123.01±21.4), I/R+EAE (98.8±22.3); I/R+ASD (89.3±21.7); I/R+ASC

(55.5±14.5); I/R+F1 (95.0±14.5); I/R+F2 (116.0±31.6) e I/R+F3 (92.1±52.01) (Figura 23). Al comparar el grupo CT con los grupos I/R, I/R+EAE, I/R+ASD, I/R+F1, I/R+F2 e I/R+F3 no se observó ningún cambio significativo en el nivel del ARNm, por lo que a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión, el EAE, el extracto de ASD y sus fracciones (F1-F3) no generaron ningún efecto en la expresión del gen de GCLC. En el grupo I/R+ASC hubo una reducción en la expresión del ARNm con diferencia estadística al compararlo con los grupos I/R ($P<0.01$) e I/R+F2 ($P<0.05$) (Figura 23). Cabe mencionar que la reducción en la expresión del gen de GCLC inducida por el extracto de ASC, no favorece la respuesta adaptativa ante el *ictus* isquémico. Es decir, las evidencias experimentales sustentan que los compuestos con actividad antioxidante son capaces de inducir la sobreexpresión del gen de GCLC, favoreciendo la biosíntesis del antioxidante endógeno glutatión (Shih y cols., 2005; Liu y cols., 2008; Kang y cols., 2009; Zhang y cols., 2009; Ma y cols., 2010; Antolino y cols., 2011; Gao y cols., 2011) y que ante la ICT, el glutatión es capaz de reducir la concentración de radicales libres y ERO que se encuentran exacerbados en la hipoxia ocasionada por la isquemia.

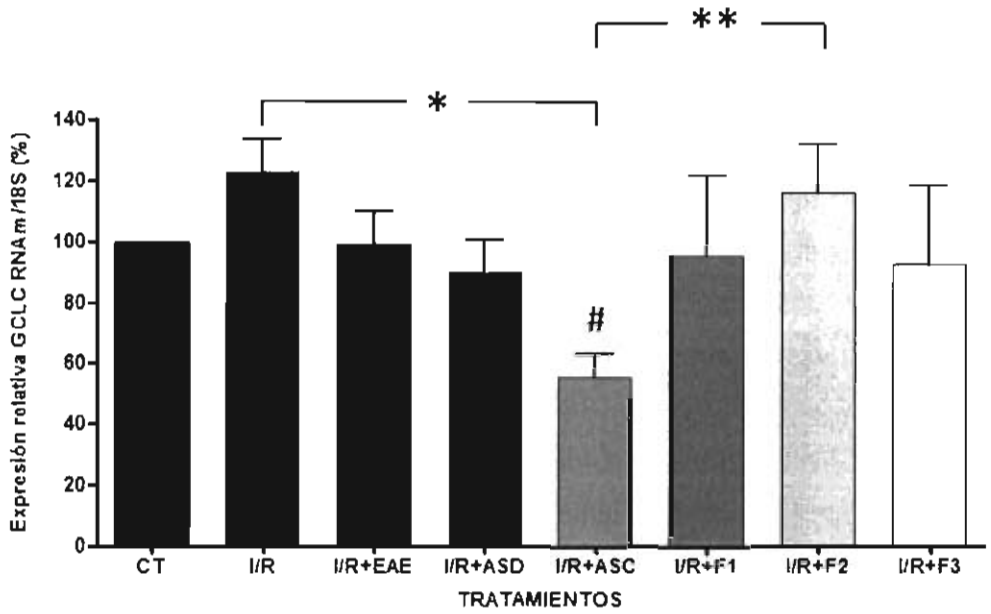


Figura 23. Gráfica que muestra el porcentaje de expresión del ARNm del gen GCLC evaluado en muestras de corteza cerebral del lado ipsilateral a la lesión de ratas sin isquemia (CT) sometidas a 2 h isquemia/ 2 h reperfusión (I/R) y ratas con 2 h isquemia/ 2 h reperfusión con los tratamientos I/R+ EAE; extracto de ajo envejecido, I/R+ ASD; extracto de endocarpo, I/R+ ASC; extracto de exocarpo, y fracciones de ASD (I/R+F1, I/R+F2, I/R+F3). Las barras muestran la media ± desviación estándar (ANOVA de una via, post prueba de Tukey, los asteriscos muestran diferencia estadística a *$P<0.01$ y **$P<0.05$ entre los tratamientos señalados; # representa diferencia estadística a $P<0.05$ con respecto al CT).

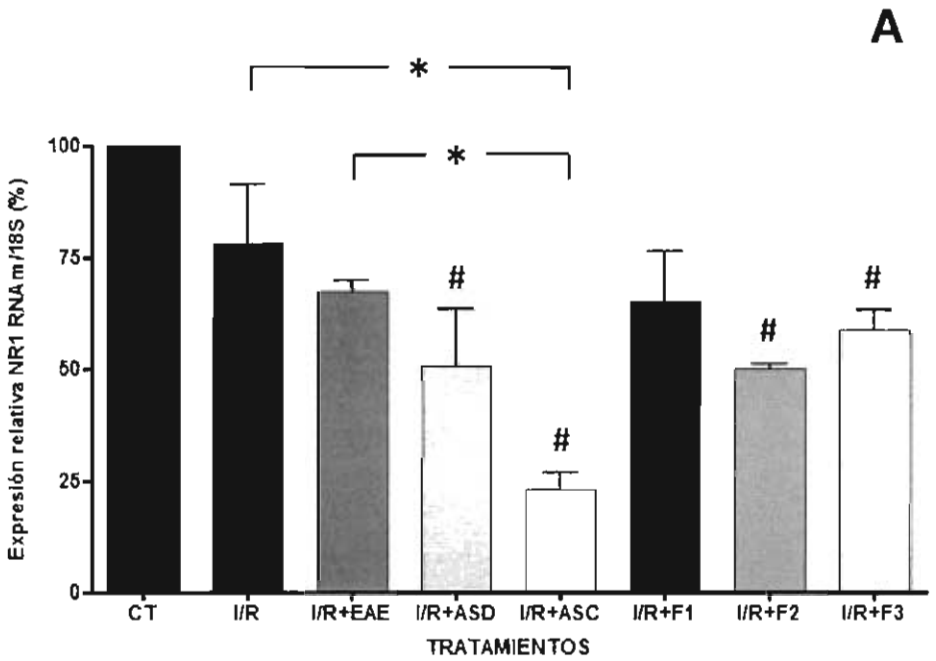
8.5. INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS DE AJO EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE NMDA.

8.5.1. Expresión de NR1 y NR2-B.

Durante la excitotoxcicidad por glutamato en la hipoxia, el aumento de Ca_2^+ intracelular induce diversos mecanismos de daño celular como el incremento en la producción de ERO y la ruptura del balance redox, la pérdida del potencial de membrana celular y mitocondrial, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y colapso energético que en conjunto, inducen la muerte neuronal (Seppet y cols., 2009). Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que como respuesta adaptativa ante la entrada masiva de Ca_2^+, en las primeras horas de isquemia, las células son capaces de disminuir la expresión genética de las subunidades NR1 y NR2 de los NMDARs, logrando así controlar los mecanismos de daño que inducen la muerte celular (Gascón y cols., 2005; Wu y cols., 2005). Por ello, para determinar el mecanismo de acción de los extractos de ajo evaluamos el porcentaje del ARNm de NR1 y NR2-B en ratas tratadas con los diferentes extractos y fracciones de ASD.

En el caso de NR1, la inducción de la isquemia (I/R; 78.3±18.6), no generó cambios significativos en el porcentaje del ARNm de NR1. En el caso de los tratamientos I/R+EAE (67.5±3.27); I/R+ASD (50.6±18.4); I/R+F1 (65.1±16.1); I/R+F2 (50.7±1.65) e I/R+F3 (58.7±6.44) tampoco se observó algún cambio significativo en el porcentaje de expresión. Sin embargo, en el grupo I/R+ASC el nivel de expresión del ARNm disminuyó significativamente (22.8±5.59) comparándolo con el grupo I/R ($P<0.05$) y con I/R+EAE ($P<0.05$) (Figura 24-A).

Para NR2-B, en el grupo I/R (58.3±0.810) se observó una disminución en el nivel del ARNm comparándolo con el grupo CT (98.9±0.156) ($P<0.05$) (Figura 24-B). Los tratamientos I/R+EAE (45.3±20.2); I/R+ASD (28.5±10.4); I/R+ASC (17.9±0.124); I/R+F1 (45.6±11.7); I/R+F2 (32.3±2.24) e I/R+F3 (49.14±1.98) mostraron un nivel de expresión menor que el grupo CT, pero solo en el grupo I/R+ASC se obtuvo una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo I/R ($P<0.05$) e I/R+F3 ($P<0.05$).



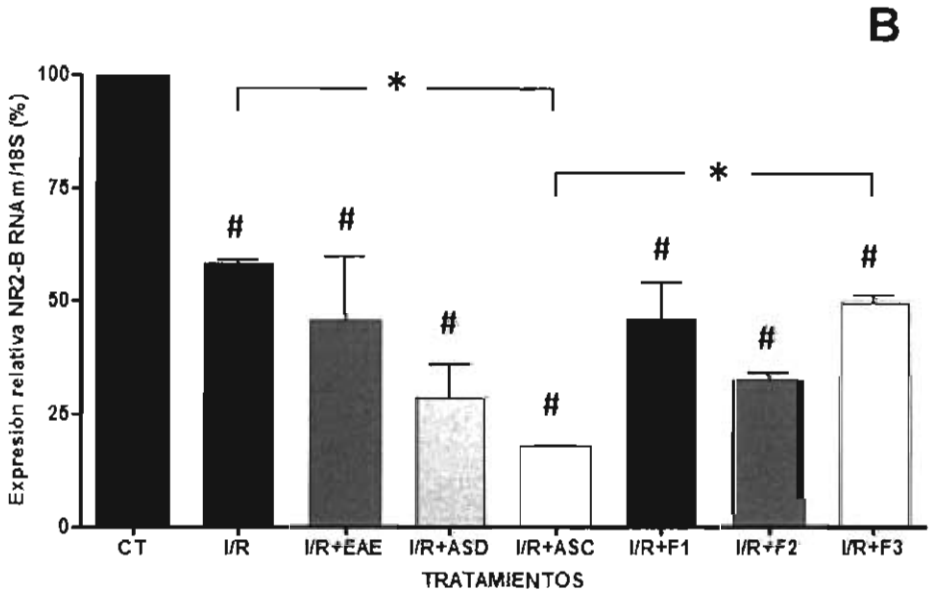


Figura 24. Porcentaje de los niveles de expresión del ARNm del gen de la subunidad A) *NR1* y B) *NR2-B* del receptor de NMDA en muestras de corteza cerebral del lado ipsilateral a la lesión de ratas sometidas a los tratamientos anteriormente descritos. Las ratas CT representan el 100% de expresión del ARNm en ambos genes. Las barras muestran la media ± desviación estándar (ANOVA de una via, post prueba de Tukey, los asteriscos muestran la diferencia estadistica a $P<0.05$ entre los tratamientos señalados; # representa diferencia estadística a $P<0.05$ con respecto al CT)

Con base en lo anterior, el extracto de ASC mostró mayor efecto en la disminución de la expresión de NR1 y NR2-B. Dicho efecto puede traducirse como un posible mecanismo por el cual el extracto está logrando el efecto protector observado en la inmunorreactividad a NeuN, a nivel de la corteza somatosensoria secundaria del lado ipsilateral a la lesión isquemica.

8.6. INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS DE AJO EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL GEN DE PAI-1.

Dentro de los mecanismos de daño inducidos por la hipoxia en la ICT, también se ha demostrado que existen diversos genes sobre-expresados que son capaces de incrementar el daño cerebral; tal es el caso del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) (Zhang y cols., 1999). El incremento en la expresión del gen PAI-1 repercute en la inhibición de la disolución del trombo que está generando la obstrucción en el vaso sanguíneo y promueve la liberación de diversos factores que inducen inflamación y edema cerebral (Zhang y cols., 1999). Debido a ello, evaluamos el posible efecto de los extractos de ajo en el nivel de expresión del gen PAI-1 y observamos que la isquemia generó un incremento importante en el nivel de expresión (grupo I/R; 2320±181), estadísticamente significativo al compararlo con el CT (Figura 25).

El grupo I/R+EAE (2000±527) presentó un incremento en la expresión del ARNm de PAI-1, similar a lo obtenido en el grupo I/R y con diferencia estadística con respecto al CT ($P<0.05$). En los animales tratados con los extractos hidroalcohólicos de material fresco de ajo, el nivel de expresión tiende a disminuir I/R+ASD (1060±414) e I/R+ASC (1490±305). No se observaron diferencias significativas entre los extractos frescos, sin embargo entre los grupos I/R e I/R+ASD si existe significancia estadística.

Es importante mencionar que el territorio irrigado por las ramificaciones que se desprenden de la arteria cerebral media abarca el lóbulo frontal, parietal y occipital, de tal modo que las regiones con daño isquémico son principalmente cuerpo estriado y la corteza (Schwab y cols., 1998), y bajo ciertas condiciones el hipocampo (Lopez y cols., 1997; Jun y

cols., 2001), donde el factor determinante en el tamaño de la lesión son los tiempos de isquemia/reperfusión (Aspey y cols., 1998; Bardutzky y cols., 2005).

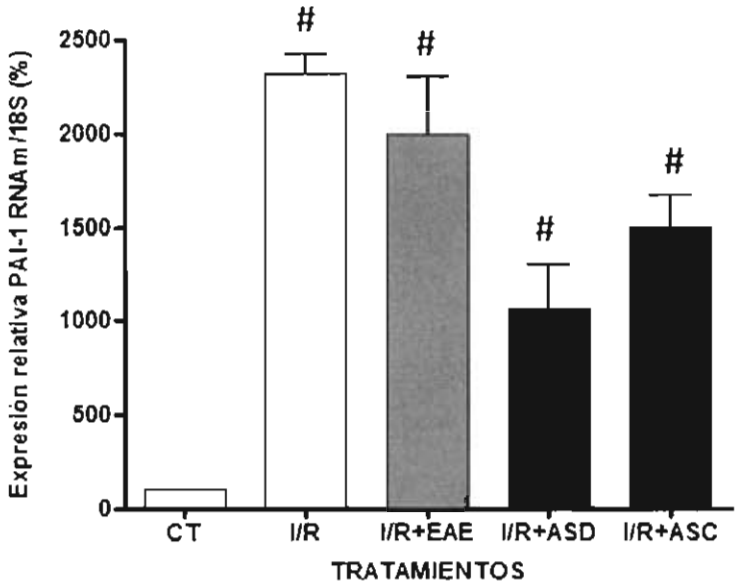


Figura 25. Porcentaje de los niveles de expresión del ARNm del gen *PAI-1* en muestras de corteza cerebral del lado ipsilateral a la lesión de ratas sometidas a los tratamientos anteriormente descritos. Las ratas CT representan el 100% de expresión del ARNm en ambos genes. Las barras muestran la media ± desviación estándar (ANOVA de una vía, post prueba de Tukey, # muestran los tratamientos con diferencia estadística a $P<0.05$ con respecto al CT).

En el presente trabajo se indujo el *ictus* empleando 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión. Anteriormente, utilizando la tinción con sales de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) se ha demostrado, que estos tiempos provocan un daño cerebral que abarca la región de corteza y cuerpo estriado en el hemisferio ipsilateral a la lesión (Aguilera y cols., 2010). Confirmamos este efecto evaluando la inmunoreactividad de NeuN, la cual en diversos trabajos se ha descrito que está directamente relacionada con la disminución en la viabilidad neuronal (Liu y cols., 2009). Además, acorde con los resultados previos, encontramos que en la región anterior de la corteza somatosensorial el número de células positivas a NeuN no fue alterado. Existen otros autores que mencionan que la reducción de inmunoreactividad a NeuN no necesariamente está relacionada con muerte neuronal, sino que puede ser el resultado de la disminución en la presencia de la proteína o la perdida de antigenicidad ocasionada por el

evento isquémico (Unal-Cevik y cols., 2004). Sin embargo, aún no existen datos contundentes que sustenten dicha premisa, por lo tanto, la técnica de inmunorreactividad a NeuN para evaluar muerte neuronal sigue siendo ampliamente utilizada para el estudio de la fisiopatología de la ICT.

Previamente se demostró que en este modelo (2 h isquemia/ 2 h reperfusión), la administración del EAE al inicio de la reperfusión, disminuye el área de infarto en un 70±44% (Aguilera y cols., 2012). Nosotros confirmamos este resultado y además observamos que el tratamiento con ASD y ASC previenen la disminución de la imnunoreactividad para NeuN. Estos resultados demuestran que tanto el EAE (Aguilera y cols., 2010) como los extractos hidroalcohólicos frescos, son capaces de producir un efecto neuroprotector en nuestro modelo experimental. Es posible que los compuestos no azufrados presentes en los extractos de ajo contribuyan al efecto protector observado ante la ICT, principalmente los polifenoles y flavonoides que presentan gran actividad antioxidante (*e.g.* ácido gálico y quercetina que exclusivamente estan presentes en extractos frescos) (Amagase y cols., 1997; Ide y cols., 1997; Imai y cols., 1994; Wei y cols., 1998; Kyo y cols., 2001; Pinto y cols., 2006; Saleem y cols., 2006; Brunetti y cols., 2009; Liu y cols., 2009; Aguilera y cols., 2010; Morihara y cols., 2011). Existen estudios donde se ha evaluado el efecto de la quercetina en un modelo de oclusión bilateral transitoria de la arteria carótida común/reperfusión en rata y se demostró que protege la microcirculación evitando la permeabilidad microvascular, disminuye la adhesión de leucocitos, la concentración de ERO (Lapi y cols., 2012) y reduce el daño generado por la isquemia/reperfusión mediante la regulación en la expresión de diversos genes implicados en la cascada isquémica (Lee y cols., 2011). Por otro lado, se ha demostrado que la cáscara de ajo (exocarpo) posee una gran variedad de flavonoides y polifenoles (principalmente fenilpropanoides) con gran poder antioxidante (Ichikawa y cols., 2003) y probablemente el efecto neuroprotector observado en los animales tratados con ASC así como su efecto en la regulación de la expresión de NR-1, NR-2 y PAI-1, podría estar asociado a la presencia de estas moléculas que podrían estar actuando mediante dos mecanismos: 1) a través de la reducción de las ERO y radicales libres que se encuentran exacerbados en la isquemia (Amagase y cols., 2001) y 2) en la modulación de diversas rutas de señalización celular,

incluyendo las que regulan la expresión de proteínas como el sistema NRF-1. Existen evidencias que sustentan que los flavonoides interactúan con sistemas de defensa celular antioxidante como NADPH: quinona oxidorreductasa (NQO1), la glutatión *S*-transferasa, tiorredoxina, hemo oxigenasa-1, ferritina, gama-glutamil cisteín sintetasa, y transportador de intercambio cisteína/glutamato (Tanigawa y cols., 2007). Los genes de todas estas enzimas tienen en común el elemento ARE en su región promotora (Tanigawa y cols., 2007). También, se ha demostrado que la quercetina es capaz de activar el sistema NRF-1 (nuclear respiratory factor-1), factor de transcripción escencial que interviene en la corregulación de la subunidades NR1 y NR2-B (Dhar y cols., 2009; Shilpa y cols., 2009) y probablemente el extracto de ASC, induzca la activación de NRF-1 generando cascadas de inhibición en la expresión de NR1 y NR2. También, es posible que los compuestos azufrados presentes en los extractos de ajo fresco induzcan neuroprotección ante el *ictus*, principalmente la SAC (que se encuentra en los extractos frescos pero en mayor concentración en el EAE). Existen estudios donde se comprueba que la molécula de SAC es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y generar una respuesta neuroprotectora ante un evento isquémico disminuyendo la lesión ocasionada por el *ictus* en la región del hipocampo (Atif y cols., 2009), en la corteza cerebral y cuerpo estriado (Ashafaq y cols., 2012). En adición, se ha intentado explicar los mecanismos por los cuales los compuestos azufrados presentes en los extractos de ajo (principalmente SAC) ejercen su efecto neuroprotector y se ha demostrado que pueden actuar como atrapadores de radicales libres (principalmente ERO y especies reactivas de nitrógeno) (Numagami y cols., 1995; Amagase y cols., 2001; Amagase y cols., 2006; Amorati y cols., 2008) e inducir diversos mecanismos como: 1) la activación de vías de señalización que estimulan la liberación de antioxidantes endógenos (*e.g.* la síntesis de GSH) modificando así, la proporción de GSH reducido/oxidado presente en la célula (Lawal y cols., 2011; Jeong y cols., 2012) 2) incrementando la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Park y cols., 2009; Aguilera y cols., 2010; Ho y cols., 2011; Morihara y cols., 2011); 3) protegiendo las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación por los radicales libres (Ley y cols., 2010; Morihara y cols., 2011) reduciendo así, la oxidación de lípidos de las membranas celulares (Ide y cols., 1999; Zalejska y cols., 2007; Misharina y cols., 2009; Lynett y cols., 2011) y 4) inhibiendo la activación del Factor Nuclear Kappa B (factor de transcripción inducido por oxidantes) (Ban y cols., 2007; Lee y cols., 2009;

Xiao y cols., 2011). De esta manera, los compuestos azufrados pueden estar alterando procesos celulares y moleculares como parte de su mecanismo de acción en diversos modelos experimentales. Sin embargo, aún falta información contundente que demuestre la participación de estos compuestos en la regulación de múltiples genes involucrados en los programas de adaptación inducidos por la hipoxia. Por ello, evaluamos el efecto que los diferentes extractos (EAE, ASD, ASC y las fracciones de ASD) tienen en el nivel de expresión de los genes de GCLC, las subunidades NR1 y NR2-B del receptor de glutamato tipo NMDA y PAI-1, todos implicados en la respuesta celular ante un evento isquémico.

Con respecto a GCLC, los resultados obtenidos muestran que el nivel de expresión del ARNm del gen GCLC en la corteza cerebral del lado ipsilateral a la lesión, no fue modificado por el EAE ni por el extracto de ASD y sus fracciones (F1, F2 y F3). En contraste, el extracto de ASC ocasionó una disminución significativa con respecto al grupo sometido al evento isquémico. Diversos autores han demostrado que diversos antioxidantes como terbutilhidroquinona (Shih y cols., 2005), extractos de *Ginkgo biloba* L. (Liu y cols., 2008) quercetina (Kang y cols., 2009), resveratrol (Zhang y cols., 2009) ácido ferúlico (Ma y cols., 2010), N-acetilcisteína (Antolino y cols., 2011) y aceite de naranja (*Citrus sinensis* L.) (Gao y cols., 2011) son capaces de promover la transcripción del gen de GCLC; subunidad catalítica e indispensable de la enzima GCL que interviene en el primer paso para la biosíntesis de GSH reducido, antioxidante intracelular que desempeña un papel crucial en la defensa celular frente al estrés oxidativo y nitrosativo (Meinster, 1988). Es por ello, que ante el estrés oxidativo generado por el evento isquémico, la inducción del incremento en la expresión del gen de GCLC conllevará al aumento en la concentración de la subunidad GCLC, fomentando la síntesis de GSH reducido; antioxidante que al incrementarse en el inicio de la reperfusión sanguínea podría contrarrestar el incremento exacerbado de radicales libres y ERO previamente inducidos por el *ictus*. Sin embargo, el hecho de que no hayamos encontrado un efecto similar al previamente reportado sugiere que probablemente, el daño cerebral generado a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión, no es suficiente para detectar cambios en el nivel de expresión del gen de GCLC. Por ello, es necesario realizar experimentos adicionales como un curso temporal del ARNm del gen de GCLC en diferentes tiempos de isquemia y reperfusión,

la evaluación con respecto al tiempo de la cantidad de proteína de GCLC presente en la corteza cerebral lesionada, y finalmente, determinar si los extractos de ajo son capaces de inducir la transcripción del gen de GCLC.

Por otro lado, se ha descrito que durante la isquemia cerebral, la excitotoxicidad por glutamato es capaz de inducir la sobreactivación de los NMDARs que consecuentemente ocasionan muerte celular (Ward y cols, 2007; Cull-Candy y cols., 2001). Sin embargo, para que los NMDARs sean funcionales requiere de la presencia estructural de las subunidades que lo conforman (NR1, NR2-A y NR2-B) (Dingledine y cols., 1999). Se ha demostrado mediante el uso de cultivos de neuronas corticales que tras la estimulación con NMDA (100 μM), se reduce el nivel de expresión de la proteína de NR1 ocasionando la disminución del daño celular (Gascón y cols., 2005). Resultados similares se obtuvieron en un modelo de OACM donde la concentración de proteína de NR1 disminuyó en la región cerebral infartada de manera progresiva con respecto al tiempo de reperfusión; a las 2 h, el nivel de NR1 se redujo moderadamente y después de 24 h fue prácticamente indetectable, demostrando que la cantidad de proteína de NR1 en la región infartada es el resultado de la disminución en el nivel de expresión del gen de NR1 debido al *ictus* (Takarada y cols., 2011). En este escenario, aún se desconoce el mecanismo por el cual la isquemia induce la reducción de expresión de NR1 y tomando en cuenta que NR1 es la subunidad obligatoria del receptor de NMDA, es posible que la diminución en su expresión sea un mecanismo adaptativo de las neuronas para contrarrestar el daño generado por las altas concentraciones de glutamato (Cull-Candy y cols., 2001 Gascón y cols., 2005; Takarada y cols., 2011).Por ello, evaluamos el efecto del tratamiento con los extractos en el nivel de expresión de estas subunidades. Encontramos que tras 2 h de OACM seguido de 2 h de reperfusión, los extractos de ajo ocasionaron una disminución en los niveles de expresión de NR1 en comparación con el grupo control. En este sentido, la reducción del ARNm sugiere un mecanismo de regulación que afecta el funcionamiento del receptor de NMDA contrarrestando el daño generado por la excitotoxicidad por glutamato en la ICT. Las diferencias entre cada extracto probablemente estén asociadas a la composición específica de cada compuesto, pero esto tendrá que evaluarse posteriormente.

Por otra parte, se observó que la isquemia provocó una disminución significativa de los niveles del ARNm de NR2-B en la corteza cerebral lesionada por el *ictus*. Así, los extractos de ajo fresco son capaces de inducir un decremento en el ARNm de NR1 y NR-2B. Este hecho tiene gran impacto fisiológico debido a que repercute en la disminución en la concentración de proteína de NR1 y NR2-B. En este escenario, una menor proporción de receptores NMDA conformados por las subunidades NR1/NR2-B en la membrana celular, podría resultar en el control de la excitotoxcicidad por glutamato provocada por la ICT. Cabe mencionar que el dímero NR1/NR2 se considera la estructura base de organización funcional para los NMDARs en donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos. En este sentido, se ha descrito que durante la excitotoxicidad por glutamato, como mecanismo compenstorio celular, la enzima calpaina se activa provocando la escisión de la subunidad NR2-B (Simpkins y cols., 2003; Dong y cols., 2004, 2006; Wu y cols., 2005; Takarada y cols., 2011), disminuyendo la sobreactivación del receptor de NMDA (Gascón y cols., 2005; Wu y cols., 2005). Es por ello, que en la búsqueda de fármacos que reduzcan la expresión genética del dímero NR1/NR2-B para el tratamiento en la ICT, no debe perderse de vista que una disminución excesiva de los NMDARs activos en la membrana celular puede ser contraproducente, poniendo en reisgo la fisiología celular.

Por otro lado, se ha descrito que durante la sobreactivación del receptor NMDA durante la isquemia, la expresión de la proteína de NR2 (A/B) no se modifica (Won y cols., 2001; Gascón y cols., 2005). En contraste, nosotros detectamos que durante la isquemia/reperfusión y los tratamientos de ajo, se reduce la expresión del ARNm de NR2-B.

Es importante mencionar que la subunidad NR2-A prevalece en la sinapsis de neuronas maduras y al activarse inician cascadas de sobrevivencia neuronal, mientras que NR2-B predomina en los sitios extra sinápticos que al activarse, inducen vías de señalización que promueven la muerte celular en el *ictus* (Hardingham y cols., 2010). En este sentido, la disminución en la expresión de NR2-B ocasionada por los tratamientos con ajo sugiere una posible reducción en el número de receptores extra sinápticos funcionales, lo que conlleva a la atenuación de la señal de muerte celular en la ICT. Además, se ha demostrado que la

curcumina (antioxidante presente en *Curcuma longa* L.) fue capaz de generar un efecto neuroprotector en células expuestas a altas concentraciones de NMDA mediante la disminución de la proteína de NR2-A (Matteucci y cols., 2011) demostrando que los niveles de expresión de las subunidades de los NMDARs pueden ser regulados por antioxidantes. Nuestros resultados indican que los extractos son capaces de disminuir la función integral de los NMDARs, siendo el de ASC el que tiene mayor efecto. Este hecho sugiere que los compuestos antioxidantes azufrados o no azufrados, presentes en los extractos de ajo fresco son capaces de inducir diversas señales que son capaces de modificar la expresión de diversos genes (GCLC, NR1, NR2-B) involucrados en los procesos adaptativos ante la ICT. Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para determinar el efecto preciso de los extractos de ajo en los niveles de expresión de subunidades de los NMDARs y el efecto en la funcionalidad del receptor.

Finalmente, evaluamos los niveles de expresión del gen PAI-1 cuya proteína favorece los mecanismos de inflamación que durante un evento isquémico se encuentra sobre expresado (Zhang y cols., 1999). La proteína PAI-1 es un inhibidor del activador de plasminógeno que funciona como una glucoproteína precursora de la enzima plasmina. La plasmina mediante lisis, es capaz de disolver los trombos adosados a los bazos sanguíneos que se forman en diversas patologías cardiovasculares. Por tanto, PAI-1 es un inhibidor del sistema fibrinolítico y se ha demostrado que en la isquemia cerebral el gen de PAI-1 se encuentra sobreexpresado (Zhang y cols., 1999). Nuestros resultados concuerdan con las evidencias, ya que se observó que la isquemia generó un incremento estadísticamente significativo en el nivel de expresión del gen PAI-1. En adición, los extractos de ajo principalmente ASD y ASC generaron una disminución del ARNm de PAI-1 que podría influir en los mecanismos compensatorios endógenos que se inducen tras un evento isquémico. Nuestros resultados concuerdan con diversos trabajos donde se ha demostrado mediante el uso de cultivos de células endoteliales, que el promotor del gen de PAI-1 es sobre-activado ante la presencia de concentraciones elevadas de ERO y que con la administración de antioxidantes, la sobre-expresión de PAI-1 se redujo en un 75% (Swiatkowska y cols., 2002). Nosotros observamos que los extractos frescos de ajo (ASD y ASC) fueron capaces de reducir considerablemente la sobre-expresión del gen de PAI-1, probablemente porque en los extractos frescos además de

compuestos azufrados, también están constituidos por flavonoides y polifenoles con gran poder antioxidante, reduciendo la concentración de radicales libres, especies reactivas de nitrógeno y ERO. Sin embargo, para determinar que la disminución en el RNAm de PAI-1 generado por los extractos frescos es de importancia biológica, es necesario realizar experimentos adicionales que permitan dilucidar si está reducción tiene impacto en la disminución de la concentración de proteína PAI-1 y su impacto en el restablecimiento del sistema fibrinolítico para permitir la reperfusión sanguínea en el *ictus* isquémico.

9. CONCLUSIONES.

1. El extracto de ajo envejecido, el extracto hidroalcohólico de endocarpo y exocarpo de ajo fresco previenen la disminución en la inmunorreactividad a NeuN en la corteza somatosensorial secundaria inducida por la isquemia. Estos resultados sustentan que los extractos de ajo poseen un efecto neuroprotector contra el daño cerebral generado por la isquemia. No hubo diferencias significativas entre el extracto de ajo envejecido y los extractos hidroalcohólicos de material fresco de ajo sobre la disminución en la inmunorreactividad a NeuN en la corteza somatosensorial secundaria. Esto indica que no es necesario que el ajo sea sometido a un largo periodo de añejamiento para obtener la respuesta neuroprotectora en la isquemia cerebral.

2. Los extractos frescos y el envejecido indujeron un decremento significativo en el porcentaje del ARNm de NR1 y NR2-B, lo que sugiere que la regulación negativa de este receptor puede ser un mecanismo compensatorio para disminuir la sobreactivación del receptor de NMDA ante la citotoxicidad por glutamato generada por la ICT. Lo que ya ha sido sugerido por otros grupos de investigación.

3. Es necesario realizar otros ensayos modificando los tiempos de isquemia/reperfusión después de la administración de los extractos así como la elaboración de una curva dosis-respuesta para determinar si los extractos de ajo son capaces de inducir la expresión del gen de GCLC y modificar la expresión del gen de PAI-1.

4. No hubo diferencias significativas en la expresión de los genes GCLC, NR1 y NR2-B entre las tres fracciones obtenidas del extracto de ASD. En contraste, se observó que el extracto de endocarpo posee más actividad que sus fracciones. Es probable que se requiera que los compuestos presentes en el ajo actúen en conjunto para ejercer una acción sinérgica entre ellos y obtener el efecto neuroprotector. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios, como el fraccionamiento del extracto de exocarpo con la finalidad de responder a las interrogantes sobre los compuestos con actividad biológica presentes en el ajo fresco.

10. REFERENCIAS.

- Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME, Ortiz-Plata A, León-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, Villeda-Hernández J, Sánchez-García A, Maldonado PD (2010). Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine* 17:241-7.
- Ajmo CT, Vernon DO, Collier L, Pennypacker KR, Cuevas J (2006). Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. Curr *Neurovasc Res.* 3(2):89-98.
- Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM (2001). Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *Jama.* 286(21):2673–82.
- Alkreathy H, Damanhouri ZA, Ahmed N, Slevin M, Ali SS, Osman AM (2010). Aged garlic extract protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 48 (3):951-6.
- Amagase H (2006). Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *J. Nutr.* 136:716S–725S.
- Amagase H, Milner J (1993). Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenzanthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* 14:1627–1631.

- Amagase H, Brenda LP, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y (2001). Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *J. Nutr.* 131:955S–962S.
- Amorati R, Pedulli F (2008). Do garlic-derived allyl sulfides scavenge peroxyl radicals?. *Org. Biomol. Chem.* 6:1103–1107.
- Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M (1990). Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K+ channels. *Science* 247:852-854.
- Angeleri F, Angeleri VA, Foschi N, Giaquintos S, Nolfe G (1993). The influence of depression, social activity and family stress on functional outcome after stroke. *Stroke.* 24:1478-83.
- Antolino LI, Meulenbelt J, Molendijk J, Nijmeijer SM, Scherpenisse P, Van BM, Van DMB (2011). Induction of glutathione synthesis and conjugation by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) in human and rat liver cells, including the protective role of some antioxidants. *Toxicology.* 289:175-84.
- Arango-Dávila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: Aspectos básicas y proyección a la clínica. *Rev Neurol.* 39:156-65.
- Arauz A, Murillo LM, Bonnin E (2002). Neuroprotección en isquemia cerebral aguda. Estado actual e importancia clínica de la cascada isquémica. *Rev. Ecuat. Neurol.* 11:109-112.
- Arnold J.L. (2005). Recommended modifications and applications of the Hospital Emergency Incident Command System for hospital emergency management. *Prehosp. Disaster. Med.* 20(5):290-300.
- Ashafaq M, Khan MM, Shadab Raza S, Ahmad A, Khuwaja G, Javed H, Khan A, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F (2012). S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutr Res.* 32(2):133-43.
- Aspey BS, Cohen S, Patel Y, Terruli M, Harrison MJ (1998). Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 24:487– 497.

- Atif F, Yousuf S, Agrawal SK (2009). S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res.* 10(1265):128-37.
- Bai G, Kusiak JW (1997). Nerve growth factor up-regulates the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 272:5936-5942.
- Bai G, Zhuang Z, Liu A, Chai Y, Hoffman PW (2003). The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 86:992-1005.
- Ban JO, Yuk DY, Woo KS, Kim TM, Lee US, Jeong HS, Kim DJ, Chung YB, Hwang BY, Oh KW, Hong JT (2007). Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-kappaB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. *J Pharmacol Sci.* 104(4):374-83.
- Bardutzky J, Shen Q, Henninger N, Bouley J, Duong TK, Fisher M (2005). Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging. *Stroke.* 36:2000-2005.
- Bendel O, Alkass K, Bueters T, Von Euler M, Von Euler G (2005). Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res.* 1033(2):135-42.
- Bhakuni DS, Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Gupta B, Srimal RC (1971). Screening of Indian plants for biological activity. *Indian J. Exp. Biol.* 9(1):91-102.
- Bigge CF (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:441-447.
- Block E (1985). Chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* 252: 94–99.
- Block E, Ahmad S, Jain MK, Crecely RW, Apitz-Castro R, Cruz MR (1984). (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombic agent from garlic. *J. Am. Chem.Soc.* 106: 8295–8296.
- Borek C (2001). Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *J. Nutr.* 131:1010S–1015S.
- Bradley PR (1992). British herbal compendium: a handbook of scientific information on widely used plant drugs /published by the British Herbal Medicine Association. *Scientific Committee. Bournemouth.*
- Brunetti L, Menghini L, Orlando G, Recinella L, Leone S, Epifano F, Lazzarin F, Chiavaroli A, Ferrante C, Vacca M (2009). Antioxidant Effects of Garlic in Young and Aged Rat Brain In Vitro. *J. Med. Food* 12(5):1166–1169.

- Cabrera R, Martínez O, Laguna H, Juárez O, Rosas B, Loria C, Medellín G, Cerón J, Sánchez M, Álvarez T, Rumbo N (2008). Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med. Int. Mex.* 24(2):98-103.
- Calderone A, Jover T, Noh KM, Tanaka H, Yokota H, Lin, Y, Grooms SY, Regis R, Bennett MV, Zukin RS (2003). Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J. Neurosci.* 23:2112-2121.
- Castillo J (2000). Physiopathology of cerebral ischemia. *Rev. Neurol.* 30:459-464.
- Center for Holistic Pediatric Education and Research: http://www.childrenshospital.org/holistic/
- Chatterton JE, Awobuluyi m, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chinopoulos C, Vera A (2006). Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *The FEBS Journal* 273:433-450.
- Choi DW (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11:465-469.
- Choi DW (1992). Excitotoxic cell death. J Neurobiol 23: 1261-76.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci.* 15:6498-6508.
- Collombet JM, Masqueliez C, Four E, Burckhart MF, Bernabe D, Baubichon D (2006). Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. Neurosci Lett. 398:337-42.
- Cooper A, William A, Pulsinelli T (1980).Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *JouARNI of Neurochemistry* 5(35):1242-1245.
- Corzo-Martínez, Nieves C, Mar V (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* 18(12):609-625.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:327-335.
- D-Pharm commences enrollment in MACSI Phase III clinical study for acute ischemic stroke (2010). *News Medical.* www.news-medical.net

- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
- Davis SM, Kennedy RL, Gregory WA, Hans D, Sabri M, Goeril K, John N (2000). Selfotel in Acute Ischemic Stroke: Possible Neurotoxic Effects of an NMDA Antagonist. *Stroke.* 31:347-55.
- Dawson VL, Kizushi V, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J. Neurosci.* 16:2479-87.
- Dhar SS, Wong-Riley MT (2009). Coupling of energy metabolism and synaptic transmission at the transcriptional level: role of nuclear respiratory factor 1 in regulating both cytochrome c oxidase and NMDA glutamate receptor subunit genes. *Journal of Neuroscience.* 29(2): 483-492.
- Diez-Tejedor E, del Brutto O, Alvarez Sabin J, Munoz M, Abiusi G (2001). Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society. *Rev. Neurol.* 33:455-464.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51:7-61.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends. *Neurosci.* 22:391-397.
- Dong YN, Waxman EA, Lynch DR (2004). Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *J Neurosci.* 24(49):11035-45.
- Dong YN, Wu HY, Hsu FC, Coulter DA, Lynch DR. (2006). Developmental and cell-selective variations in N-methyl-D-aspartate receptor degradation by calpain. *J Neurochem* 99:206-217.
- Dringen R (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62:649-671.

- Elenes S, Decker M, Cymes G, Grosman C. (2009). Decremental response to high-frecuency trains of acetylcholine pulses but unaltered fractional Ca^{2+} currents in a panel of "slow-channel syndrome" nicotinic receptor mutants. *J Gen Physiol.* 133(2):151-69.
- Efendy JL, Simmons DL, Campbell GR, Campbell JH (1997). The effect of aged garlic "kyolic" on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 132:37–42.
- Fenwick GR, Hanley AB (1985). The genus *Allium. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 22:273–377.
- Fernández-Gómez FJ, Hernández F, Argandoña L, Galindo MF, Segura T, Jordán J (2008). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo, Rev. Neurol. 47(5): 253-260.
- Flores-Soto, Chaparro-Huerta, Escoto-Delgadillo, Vazquez-Valls, González-Castañeda, Beas-Zaratea (2011). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurol.* 10: 2017-2023.
- Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B (1996). Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and the Netherlands. *Acta Neurol. Scand.* 93:56-60.
- Gao M, Singh A, Macri K, Reynolds C, Singhal V, Biswal S, Spannhake EW (2011). Antioxidant components of naturally-occurring oils exhibit marked anti-inflammatory activity in epithelial cells of the human upper respiratory system. *Respir Res.* 13:12:92.
- García-García J, Gracia-Gil J, Sopelana-Garay D,Ayo-Martín O, Vadillo-Bermejo A, Touza B (2008). Administración de tratamiento trombolítico intravenoso en el ictus isquémico en fase aguda: resultados en el Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. *Rev. Neurol.* 46:7-12.
- García GL, Sánchez M (2006). Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN* [online]. Set 2000. 50: 219-229.
- Gascón S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodríguez-Peña A, Díaz-Guerra M (2005). Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem.* 280(41):35018-27.
- Giles EH, Hilmar B (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience.* 11: 682-696.
- Ginsberg MD (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology* 5:245-249.

- Gould E, Cameron HA, McEwen BS (1994). Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *JouARNl of Comparitive Neurology.* 340:551–565.
- Greenblatt DJ, Leigh-Pemberton RA, Von Moltke LL (2006). In Vitro Interactions of Water-Soluble Garlic Components with Human Cytochromes P4501–3. *J. Nutr.* 136:806S–809S.
- Griffith OW, Mulcahy RT (1999). The enzymes of glutathione synthesis: γ-glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73:209–267.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J neurochemistry* 59:1609-1623.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5:405-414.
- Hardingham GE, Bading H (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 11(10):682-96.
- Hartley DM, Kurth MC, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW (1993). Glutamate receptor-induced Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.* 13:1993-2000.
- Heiss WD, Graf R (1994). The ischemic penumbra. *Curr. Opin. Neurol.* 7:11-19.
- Hollmann M, Heinemann S (1994). Cloned glutamate receptors. *A. Rev. Neurosci.* 17:31-108.
- Ho CY, Cheng YT, Chau CF, Yen GC (2012). Effect of diallyl sulfide on in vitro and in vivo Nrf2-mediated pulmonic antioxidant enzyme expression via activation ERK/p38 signaling pathway. *J Agric Food Chem.* 60(1):100-7.
- Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons A (2000). Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39:806-816.
- Iadecola C (1999). Mechanisms of cerebral ischemic damage in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology. *Human Press Totowa, NJ* 1:3-32.
- Iberl B, Winkler G, Knobloch K (1990a). Products of allicin transformation: ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. *Planta Med.* 56:202–211.
- Iberl B, Winkler G, Müller B, Knobloch K (1990b). Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.* 56:320–326.

- Ichikawa M, Ide N, Ono K (2006). Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *J Agric Food Chem.* 54(13):4849-54.
- Ichikawa M, Yoshida J, Ide N, Sasaoka T, Yamaguchi H, Ono K (2006). Tetrahydro-b-Carboline Derivatives in Aged Garlic Extract Show Antioxidant Properties. *J. Nutr.* 136:726S–731S.
- Ichikawa M, Ryu K, Yoshida J, Ide N, Kodera Y, Sasaoka T, Rosen RT (2003). Identification of six phenylpropanoids from garlic skin as major antioxidants. *J Agric Food Chem.* 51:7313-7.
- Ide N, Lau BH (1999). Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine.* 6(2):125-31.
- Ide N, Nelson AB, Lau BHS (1997). Aged Garlic Extract and its constituents inhibit Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med.* 63:263–264.
- Ikonomidou C, Turski L (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury?. *Lancet Neurol.* 1:383-386.
- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 60:417–420.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268:2836-2843.
- Jeong YY, Park HJ, Cho YW, Kim EJ, Kim GT, Mun YJ, Lee JD, Shin JH, Sung NJ, Kang D, Han J (2012). Aged red garlic extract reduces cigarette smoke extract-induced cell death in human bronchial smooth muscle cells by increasing intracellular glutathione levels. *Phytother Res.* 26(1):18-25.
- Jordán J, Ikuta I, García-García J, Calleja S, Segura T (2007). Stroke pathophysiology: management challenges and new treatment advances. *J. Physiol. Biochem.* 63:261-77.
- Jun YC, Jae WY, Sung MK, Young JL, Joo HC, Dae JJ (2011). Changes in Gene Expression in the Rat Hippocampus after Focal Cerebral Ischemia. *J Korean Neurosurg Soc.* 50:173-178.
- Kaku H, Goldstein IJ, Van D, Peumans W (1992). New mannose-specific lectins from garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*) bulbs. *Carbohydr. Res.* 229:347–353.

- Kang JH, Chang SY, Jang HJ, Cho JM, Kim DB, Lee SS, Ko SH, Park YM, Needs PW, Jo YH, Kim MJ (2009). Quercetin-induced upregulation of human GCLC gene is mediated by cis-regulatory element for early growth response protein-1 (EGR1) in INS-1 beta-cells. *J Cell Biochem.* 108(6):1346-55.
- Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y (2001). Pharmacologic Activities of Aged Garlic Extract in Comparison with Other Garlic Preparations. *JouARNl of Nutrition.* 131: 1080S–1084S.
- Kemp JA, McKeARNn RM (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.* 5:1039-1042.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Visual S (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmocol Toxicol.* 47:6.1-6.28.
- Kim KC, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Kim GY, Kang MY, Lee SJ, Lee NH, Surh YJ, Hyun JW (2010). Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(2):297-305.
- Kyo E, Uda N, Kasuga S, Itakura Y (2001). Immunomodulatory effects of aged garlic extract. *J Nutr.* 131(3s):1075S-9S.
- Königsberg FM (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev. de Educ. Bioq.* 26(001):18-25
- Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17:343-352.
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.
- Lapi D, Vagnani S, Pignataro G, Esposito E, Paterni M, Colantuoni A (2012). Protective Effects of Quercetin on Rat Pial Microvascular Changes during Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion and Reperfusion. *Front Physiol.* 3:32-39.
- Lau CG, Zukin RS (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(6):413-26.

- Laurie DJ, Seeburg PH (1994). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mARN. *J. Neurosci.* 14:3180-3194.
- Lawal AO, Ellis EM (2011). The chemopreventive effects of aged garlic extract against cadmium-induced toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 32(2):266-74.
- Lawson LD (1998). Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In
- Lawson LD, Bauer R, editors. Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity. Washington, DC: *American Chemical Society* 176-209.
- Lawson LD, Gardner CD (2005). Composition, Stability, and Bioavailability of Garlic Products Being Used in a Clinical Trial. *J Agric Food Chem.* 53(16): 6254–6261.
- Lee EK, Chung SW, Kim JY, Kim JM, Heo HS, Lim HA, Kim MK, Anton S, Yokozawa T, Chung HY (2009). Allylmethylsulfide Down-Regulates X-Ray Irradiation-Induced Nuclear Factor-kappaB Signaling in C57/BL6 Mouse Kidney. *J Med Food.* 12(3):542-51.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999). The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. *Nature* 399:A7-A14.
- Lee JK, Kwak HJ, Piao MS, Jang JW, Kim SH, Kim HS (2011). Quercetin reduces the elevated matrix metalloproteinases-9 level and improves functional outcome after cerebral focal ischemia in rats. *Acta Neurochir (Wien).* 153(6):1321-9.
- Lei YP, Liu CT, Sheen LY, Chen HW, Lii CK (2010). Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. Mol Nutr *Food Res.* 54:S42-52.
- Leszek K, Kossut M, Skangiel-Kramska J (1997). Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Physiol. Rev.* 77:217-55.
- Lind D, Franjen S, Kappler J (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. J Neurosci Res.79: 295-302.
- Lipton E (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79:1431-1568.
- Liu RM, Hu HP, Robison TW, Forman H J (1996a). Differential enhancement of gamma-glutamyl transpeptidase and gamma-glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14:186–191.

- Liu A, Hoffman PW, Lu W, Bai, G (2004). NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 279:17449-17458.
- Liu A, Zhuang Z, Hoffman PW, Bai G (2003). Functional analysis of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A promoter: multiple transcription starts points, positive regulation by Sp factors, and translational regulation. *J. Biol. Chem.* 278:26423-26434.
- Liu F, Schafer DP, McCullough LD (2009). TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J. Neurosci. Methods.* 179(1):1-8.
- Liu XP, Goldring CE, Wang HY, Copple IM, Kitteringham NR, Park BK, Wei W (2008). Extract of Ginkgo biloba induces glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC). *Phytother Res.* 22(3):367-71.
- Livak K, Schmittgen T (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta (CT)) *Method. Methods* 25(4):402-408.
- Lo EH (2008). A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat. Med.* 14:497-500.
- López HE, Parra GL, Bravo MJ, García HA, Ortíz EA, Solís H (1997). Repercusiones en el hipocampo de la isquemia cerebral focal transitoria. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica.* 5(4): 102-108.
- Lynett PT, Butts K, Vaidya V, Garrett GE, Pratt DA (2011). The mechanism of radical-trapping antioxidant activity of plant-derived thiosulfinates. Org Biomol Chem. 9(9):3320-30.
- Ma ZC, Hong Q, Wang YG, Tan HL, Xiao CR, Liang QD, Zhang BL, Gao Y (2010). Ferulic acid protects human umbilical vein endothelial cells from radiation induced oxidative stress by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Biol Pharm Bull.* 33(1):29-34.
- Martínez VE, Irimia P (2005). Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis.* 20(2):148-58.
- Matsuura H, Ushiroguchi T, Itakura Y, Hayashi H, Fuwa T (1988). A furostanol glycoside from garlic bulbs of Allium sativum I. *Chem. Pharm.* 36:3659–3663.
- Matteucci A, Cammarota R, Paradisi S, Varano M, Balduzzi M, Leo L, Bellenchi GC, De Nuccio C, Carnovale-Scalzo G, Scorcia G, Frank C, Mallozzi C, Di Stasi AM, Visentin S,

Malchiodi-Albedi F (2011). Curcumin protects against NMDA-induced toxicity: a possible role for NR2A subunit. *Invest Ophthalmol.* 22;52(2):1070-7.

- McRae MP (2005). A review of studies of garlic (*Allium sativum*) on serum lipids and blood pressure before and after 1994: does the amount of allicin released from garlic powder tablets play a role. *Journal of Chiropractic Medicine*; 4(4): 182-190.
- Medina A, García-Cairasco, Escobar E (2008). Respuesta de una subpoblación de interneuronas y del transportador glial de glutamato GLT1 en la corteza contralateral a un foco isquémico. *Colomb Med.* 39:14-24.
- Meister A (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *The JouARNI of Biological Chemistry* 263:17205-17208.
- Menzies SA, Hoff JT, Betz LA (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31:100–107.
- Michaelis EK (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54:369-415.
- Micronutrient Research for Optimum Health (2011): fecha de consulta; 22 de junio de 2012. http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/garlic/#sources
- Misharina TA, Terenina MB, Krikunova NI (2009). Antioxidant properties of essential oils. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 45(6):710-6.
- Mizui T, Kinouchi H, Chan PH (1992). Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am. J. Physiol.* 12:313-317.
- Mohr JP, Mast H, Thompson JLP, Sacco RL (1998). Are more complex study designs needed for future acute stroke trials? *Cerebrovasc. Dis.* 8:17-22.
- Morihara N, Hayama M, Fujii H (2011). Aged Garlic Extract Scavenges Superoxide Radicals. *Plant Foods Hum. Nutr.* 66:17–21.
- Moskowitz MA, Eng HL, Iadecola C (2010). The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. Neuron. 67: 181-198.
- Mulcahy RT, Marybeth A, Wartman, Howard HB, Jerry JG (1997). Constitutive and b-Naphthoflavone-induced Expression of the Human g-Glutamylcysteine Synthetase Heavy Subunit Gene Is Regulated by a Distal Antioxidant Response Element/TRE 11:7445–7454.

- Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1990). Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *Faseb J* 4:1624-1633.
- Nagatoshi I, Benjamin HS, Lau (2001). Garlic Compounds Minimize Intracellular Oxidative Stress and Inhibit Nuclear Factor-kB Activation. *J. Nutr.* 131:1020S–1026S.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke (1990). Classification of cerebrovascular disease III. *Stroke* 21:637-741.
- Nicholls DG, Budd SL, Ward MW, Castilho RF (1999). Excitotoxicity and mitochondria. *Biochem. Soc. Symp.* 66:55-67.
- Numagami Y, Sato S, Ohnishi T (1995). Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. Neurochem. Int. 29:135-143.
- Okamoto S, Sherman K, Bai G, Lipton SA (2002). Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 107:89-96.
- Organización Mundial de la Salud (Sep 2011). Enfermedades cardiovasculares. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/
- Paas Y (1998). The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci.* 21:117-125.
- Papadia S, Hardingham GE (2007). The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist.* 13(6): 572–579.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005). Nuclear Ca^{2+} and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J. Neurosci.* 25:4279-4287.
- Paquette MA, Anderson AM, Lewis JR, Meshul CK, Johnson SW, Paul Berger S (2010). MK-801 inhibits L-DOPA-induced abnormal involuntary movements only at doses that worsen parkinsonism. *Neuropharmacology.* 58(7):1002-8.
- Park JH, Park YK, Park E (2009). Antioxidative and antigenotoxic effects of garlic (Allium sativum L.) prepared by different processing methods. *Plant Foods Hum Nutr.* 64(4):244-9.
- Peirce A (1999). The American Pharmaceutical Association practical guide to natural medicines. New York: William Morrow and Company, Inc.

- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998). Increased Formation of Reactive Oxygen Species After Permanent and Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2:78-85.
- Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB (1997). Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 52:261-281.
- Philip A (2003). Biochemistry of ischemic stroke. *Stroke.* 92:151-163.
- Pinto JT, Krasnikov BF, Cooper AJ (2006). Redox-sensitive proteins are potential targets of garlic-derived mercaptocysteine derivatives. *J Nutr.* (3 Suppl):835S-841S.
- Plaisance V, Niederhauser G, Azzouz F, Lenain V, Haefliger JA, Waeber G, Abderrahmani A. (2005). The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J. Biol. Chem.* 280:401-407.
- Preusser M, Laggner U, Haberler C, Heinzl H, Budka H, Hainfellner JA (2006). Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology.* 48(4):438-44.
- Prevención secundaria, diagnóstico, tratamiento y vigilancia de la enfermedad vascular cerebral isquémica México: Secretaría de Salud (2008).
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The JouARNl of biological chemistry* 266: 4244-4250.
- Rahman K, Billington D (2000). Dietary supplementation with Aged Garlic Extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *J. Nutr.* 130:2662–2665.
- Rasul MHA, Sadiq BM, Muhammad Anjum F, Saeed F, Batool R, Nisar AA (2011). Aqueous garlic extract and its phytochemical profile; special reference to antioxidant status. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 21:67-72.
- Rosenberg G, Bornstein N, Diener HC, Gorelick PB, Shuaib A, Lees K (2011). The Membrane-Activated Chelator Stroke Intervention (MACSI) Trial of DP-b99 in acute ischemic stroke: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational pivotal phase III study. Int J Stroke. 6(4):362-7.
- Ross IA (1999). Medicinal plants of the world: chemical constituents, traditional, and modern medicinal uses. *Humana Press.* 415.

- Ruíz-Giménez N, González RP, Suárez C (2002). Abordaje del accidente cerebrovascular. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud* 26:93-106.
- Ryu K, Ide N, Matsuura D, Itakura Y (2001). Nα-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-L-Arginine, an Antioxidant Compound Identified in Aged Garlic Extract. *J. Nutr.* 131: 972S–976S.
- Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Islam F (2006). Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral isquemia. *J Med Food.* 9(4):537-544.
- Schoepp D, Bockaert J, Sladeczek F (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:508-515.
- Schwab S, Steiner T, Aschoff A, Schwarz S, Steiner HH, Jansen O (1998). Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction. *Stroke.* 29:1888-1893.
- Segura T, Calleja S, Jordan J (2008). Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opin. Pharmacother.* 9:1071-85.
- Sekhar KR, Long M, Long J, Xu ZQ, Summar ML, Freeman ML (1997). Alteration of transcriptional and posttranscriptional expression of γ-glutamylcysteine synthetase by diethyl maleate. *Radiat.* 147(5):592–597.
- Seppet E, Gruno M, Peetsalu A, Gizatullina Z, Nguyen H, Vielhaber S, Manfred HP, Trumbeckaite S, Arandarcikaite O, Jerzembeck D, Sonnabend M, Jegorov K, Zierz S, Striggow F, Gellerich F (2009). Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 10:2252-2303.
- Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH (2005). Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem.* 280(24):22925-36.
- Shilpa S. Dhar, Margaret T. T. Wong-Riley (2009). Coupling of Energy Metabolism and Synaptic Transmission at the Transcriptional Level: Role of Nuclear Respiratory Factor 1 in Regulating both Cytochrome C Oxidase and NMDA Glutamate Receptor Subunit Genes. *The Journal of Neuroscience*,2: 133-141.

- Shin EJ, Bach JH, Lee SY, Kim JM, Lee J, Hong JS, Nabeshima T, Kim HC (2011). Neuropsychotoxic and neuroprotective potentials of dextromethorphan and its analogs. J *Pharmacol Sci.* 116(2):137-48.
- Simon RP, Swan JH, Griggihts T, Meldrum BS (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226:859-862.
- Simons LA, Balasubramaniam S, Von KM, Parfitt A, Simons J, Peters W (1995). On the effect of garlic on plasma lipids and lipoproteins in mild hypercholesterolemia. *Athlerosclerosis* 113:219–225.
- Simpkins KL, Guttmann RP, Dong Y, Chen Z, Sokol S, Neumar RW, Lynch DR (2003). Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neuroscience.* 23(36):11322-31.
- Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ, Freeman ML (2000). Multi-faceted regulation of γ-glutamylcysteine synthetase. *J. Cell Physiol.* 182(2):163–170.
- Soto V, Camargo A, González R y Galmarini C (2007). Synthesis and purification of ajoene and its quantification in commercial garlic oils. Rev. FCA UNCuyo. 1:93-100.
- Souci SW, Fachmann W, Krant H (1994). Food Composition and Nutrition Tables. Stuttgart: *Medpharm* 13:123-146.
- Steiner M, Li W (2001). Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors. *J. Nutr.* 131:980S–984S.
- Sterling SJ, Eagling RD (2001). Agronomic and allicin yield of Australian grown garlic (Allium sativum). *Acta Horticulturae.* 555:63–73.
- Sticher O (1991). Components of garlic. *Apoth. Ztg.* 131: 403-408.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA, (1995). Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J. Neurosci.* 15:6509-6520.
- Shüler T, Mesic I, Madry C, Bartholomäus I, Laube B (2008). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem.* 283: 37-46.

- Sugii M, Suzuki T, Nagasakawa S, Kawashima K (1964). Isolation of gamma-1-glutamyl-S-allylmercapto-L-cysteine and S-allylmercapto-L-cysteine from garlic. *Chem Pharm Bull.* 12:1114-5.
- Sugiyama H, Ito I, Hirono C (1987). A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325:531-533.
- Sumiyoshi H, Kanezawa A, Masamoto K, Harada H, Nakagami S, Yokota A, Nishikawa M, Nakagawa S (1984). Chronic toxicity test of garlic extract in rats. *J. Toxicol. Sci.* 9:61–75.
- Swartz BE, Houser CR, Tomiyasu U, Walsh GO, DeSalles A, Rich R (2006). Hippocampal cell loss in posttraumatic human epilepsy. Epilepsia. 47:1373-82.
- Sweeney MI, Yager JY, Walz W, Juurlink HJ (1995). Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can. J. Physol. Pharmacol.* 73:1525-1535.
- Swiatkowska M, Szemraj J, Al-Nedawi KN, Pawłowska Z (2002). Reactive oxygen species upregulate expression of PAI-1 in endothelial cells. *Cell Mol Biol Lett.* 7(4):1065-71.
- Takarada T, Hara T, Konishi S, Nakazato R, Yoneda Y (2011). Selective downregulation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) rather than non-NMDAR subunits in ipsilateral cerebral hemispheres in rats with middle cerebral artery occlusion. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 31(4):187-94.
- Tanaka K, Pracyk JB, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Deshpande SS, Ozaki M, Hwang PM, Lowenstein CJ, Irani K, Finkel T (1998). Expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redox-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 273(40):25922-8.
- Tegos TJ, Kalodiki E, Daskalopoulou SS, Nicolaides AN (2000) Stroke:Epidemiology, clinical picture and risk factors. *Angiology* 51:793-808.
- The Longwood Herbal Task Force: http://www.mcp.edu/herbal/default.htm
- Thomas MJ (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 16(7):716-8.
- Tymianski M (2011). Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nature neuroscience.* 14(11):1369-1374.
- Tsubokawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kawai N (1994). Ca(2+)-dependent non-NMDA receptor-mediated synaptic currents in ischemic CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 71:1190-1196.

- Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 1015: 169-74.
- Verhagen H, Hageman GJ, Rauma AL, Versluis-de Haan G, van Herwijnen MH, de Groot J, Törrönen R, Mykkänen H (2001). Biomonitoring the intake of garlic via urinary excretion of allyl mercapturic acid. *Br J Nutr.* 1:S111-4.
- Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD, Haibach FG (1993). Identification and quantification of organosulfur compliance markers in garlic extract. *J. Agric. Food Chem.* 41:37–41.
- Weinberger J (2000). Contemporary diagnosis and management of stroke. 2nd ed. Handbooks in Health Care Co., Newtown Pennsylvania, USA.
- White BC, Sullivan JM, De Gracia DJ, O´Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179:1-33.
- Wijdicks EFM. Neurologic complications of cardiac arrest. In: Wijdicks EFM. (Ed). Neurologic complications of critical illness. Oxford University Press. Oxford. 2002: 123-42.
- Wo ZG, Oswald RE (1995). Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 18:161-168.
- Wolf H, Buslei R, Schmidt R, Schmidt PK, Pietsch T, Wiestler O, Blümcke I (1996). NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem.* 44(10):1167-71.
- Won MH, Kang T, Park S, Jeon G, Kim Y, Seo JH, Choi E, Chung M, Cho SS (2001).The alterations of N-Methyl-D-aspartate receptor expressions and oxidative DNA damage in the CA1 area at the early time after ischemia-reperfusion insult. *Neurosci Lett.* 30;301(2):139-42.
- Wu HY, Yuen EY, Lu YF, Matsushita M, Matsui H, Yan Z, Tomizawa K (2005). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calpain in cortical neurons. *J Biol Chem.* 280(22):21588-93.

- Xiao J, Liong EC, Ling MT, Ching YP, Fung ML, Tipoe GL (2011). S-allylmercaptocysteine reduces carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and necroinflammation via nuclear factor kappa B-dependent pathways in mice. *Eur J Nutr.* 36:128-133.
- Yan X, Wang Z, Barlow P (1992). Quantitative estimation of garlic oil content in garlic oil based health products. *Food Chem.* 45:135–139.
- Yang Y, Chen Y, Johansson E, Schneider SN, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP (2007). Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. Biochem. *Pharmacol.* 74(2):372–381.
- Zalejska-Fiolka J, Kasperczyk A, Kasperczyk S, Błaszczyk U, Birkner E (2007). Effect of garlic supplementation on erythrocytes antioxidant parameters, lipid peroxidation, and atherosclerotic plaque formation process in oxidized oil-fed rabbits. *Biol Trace Elem Res.* 120(1-3):195-204.
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummings R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.
- Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, Majid A (2004). Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 25:895-904.
- Zhang ZG, Chopp M, Goussev A, Lu D, Morris D, Tsang W, Powers C, Khang-Loon (1999). Cerebral Microvascular Obstruction by Fibrin is Associated with Upregulation of PAI-1 Acutely after Onset of Focal Embolic Ischemia in Rats. *The JouARNl of Neuroscience.* 24:10898-10907.
- Zhang H, Shih A, Rinna A, Forman HJ (2009). Resveratrol and 4-hydroxynonenal act in concert to increase glutamate cysteine ligase expression and glutathione in human bronchial epithelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 481(1):110-5.
- Zhao H, Xiong LZ, Dong HL, Chen SY, Lu ZH, Sun YY, Sun J, Gao P. Protective effect of remote ischemic preconditioning against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Hongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 19(6):340-2.

11. ANEXO I: DIFUSIÓN

Trabajos en Congresos:

I. FORO: XXXI JORNADA DE INVESTIGACIÓN DE PEDIATRÍA, ABRIL 11-15, 2011. CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

RESUMEN: **EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE MATERIAL FRESCO DE *Allium sativum* L. EN LA EXPRESION GENETICA DEL RECEPTOR DE NMDA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL EN MODELO MURINO** Cervantes D D L. M. Isabel , Calzada B. Fernando y Aguilera H. Penélope.

En México, la enfermedad vascular isquémica cerebral (IC) se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública. La IC se caracteriza por un déficit neurológico focal, secundario a una interrupción temporal del flujo sanguíneo cerebral debido a la obstrucción de un vaso sanguíneo y como consecuencia la pérdida del aporte de oxígeno y factores provenientes de la sangre, activando diversos mecanismos de daño donde destaca la producción de especies reactivas de oxígeno. Las plantas medicinales pueden ser el punto de partida para el hallazgo de productos con efecto neuroprotector para limitar la progresión de la cascada isquémica. **Objetivo** evaluar el extracto hidroalcohólico de material fresco de *Allium sativum* como agente protector en la IC en modelo murino. **Método**: El extracto hidroalcohólico del endocarpo de *A. sativum* se preparo por maceración con etanol acuoso al 20%. Para la prueba biológica, se emplearon ratas macho Wistar a las que se les indujo isquemia focal y se les administró el extracto a una dosis de 360 mg/Kg. Al grupo control se le indujo la isquemia y se administró 1ml de vehículo. Después de 3 hrs se evaluó el área de infarto usando tinción con sal de tetrazolio (TTC). **Resultados:** el extracto obtenido del endocarpo de *A. sativum* inhibió en un 49 % la zona de infarto. **Conclusión:** el extracto del endocarpo de *A. sativum* tiene efecto neuroprotector en un modelo murino de IC a una dosis de 360 mg/Kg. 3 horas de isquemia y 3 de reperfusión.

II. FORO: SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, NOVEMBER 12-16, 2011. WASHINGTON, DC.

RESUMEN: **Hydroalcoholic fresh and aged extracts of *Allium sativum* regulate expression of genes involved in the neuroprotective response in cerebral ischemia.**

Cervantes Isabel, Ruiz-Tachiquín Martha , Ortíz-Plata Alma, Espinoza-Rojo Mónica, Calzada B. Fernando[1] and Aguilera Penélope.

Introduction. Garlic (*Allium sativum* L) products have protective effects against ischemic-induced brain injury. The protection mechanisms are unknown but transcriptional up- and down- regulation of multiples genes that lead to adaptive programs could be involved. This study was designed to investigate the effect that aged garlic extract (AGE), and hydroalcoholic extracts of endocarp (HEn) and exocarp (HEx) from fresh garlic bulb have on the expression level of genes involved in the adaptative response to cerebral ischemia (CI). **Methods.** AGE was from Wakunaga of America Co. Ltd; HEn and HEx were obtained by fresh garlic maceration in 20% ethanol-water during 2 weeks. The HEn was subjected to silica gel column, and eluted with water:ethanol:acetone (1:3:3) to give four fractions (F1- F4). Male Wistar rats (280-350 g) were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion and 2 h of reperfusion (R). AGE, HEn, HEx (360 mg/Kg body, *i.p.*) and fractions (120 mg/Kg body, *i.p.*) were administrated at the beginning of R. Total RNA was extracted from ipsilateral cerebral cortex using TriPure reagent and reversely transcribed into cDNA. The relative mRNA levels of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) NR1 subunit, the glucose transporter 3 (GLUT3), and the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) were determined by quantitative real time PCR. **Results.** NR1 mRNA expression was reduced after all treatments (AGE 35%, HEn 53%, and Hex,73.2%). GLUT3 mRNA expression was increased by AGE treatment (51%), and reduced by HEn (38.9%), and HEx (62.4%). GCLC mRNA expression was increased by AGE. The fractions induced down- regulation of NR1 mRNA (F1 46.3%, F2 49.1%, F3 45.9%, F4 45.9%), and GLUT3 mRNA (F1 10%, F2 34%, F3 46.3%, F4 23.2%). **Discussion**. Our results showed that AGE, HEn, and HEx induced a significant reduction in mRNA NR1 expression after 2 h of R versus non-treated groups. This effect may have an important role in delayed

neuronal death, similar to NR1 mRNA reduction induced by the excessive receptor activation after 24 h of R. AGE increased GLUT3 mRNA expression while fresh extracts reduced it. Up-regulation could be associated to an increase in the metabolic requirements of neurons during ischemia; however, high levels of glucose could promote cellular free radical generation. We observed that fresh as aged garlic extracts induced activation of signaling that activate gene regulation, it might be associated to neuroprotection response but it require further evaluation.

Artículo en revisión para su publicación:

Maria Isabel Cervantes, Pavel Montes de Oca Balderas, José de Jesús Gutiérrez-Baños, Marisol Orozco-Ibarra, Berenice Fernández-Rojas, Omar Noel Medina-Campos, Mónica Espinoza-Rojo, Martha Ruiz-Tachiquín, Alma Ortiz-Plata, Ma. Isabel Salazar, Moisés Rubio-Osornio , Eduardo Castañeda-Saucedo, José Pedraza-Chaverri , Fernando Calzada Bermejo y Penelope Aguilera. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chemistry*. Manuscript Number: FOODCHEM-D-12-03656.

12. ANEXO II: ABREVIATURAS.

AB	Arteria basilar.
ACC	Arteria carótida común.
ACE	Arteria carótida externa.
ACI	Arteria carótida interna.
ACM	Arteria cerebral media.
ADNc	Ácido desoxiribonucléico complementario.
AKT	Proteína cinasa B.
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-propiónico.
AO	Arteria occipital.
APP	Arteria pteriogopalatina.
ARN	Ácido ribonucléico.
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero.
ASC	Extracto hidroalcohólico de exocarpo fresco de ajo.
ASD	Extracto hidroalcohólico de endocarpo fresco de ajo.
ATP	Adenosín trifosfato.
ATS	Arteria tiroidea superior.
BSA	Suero de bovino.
Ca^{2+}	Ion calcio.
CCF	Capa fina preparativa.
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución.
DAPI	6-diamino-2-fenilindol.
DCT	Dominio carboxilo terminal.
DEPC	Dietilpolicarbonato.
DNT	Dominio extracelular amino terminal.

DUL	Dominio de unión para el ligando.
dNTPs	Nucleótidos fosfatados.
EAE	Extracto de ajo envejecido.
ERK	Familia de cinasas.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
EVC	Enfermedad vascular cerebral.
FSC	Flujo sanguíneo cerebral.
GCL	Ligasa de glutamato y cisteína.
GCLC	Glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica.
GSH	Glutatión.
GSHS	Glutatión sintetasa.
GSSG	Disulfuro de glutatión.
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno.
I/R	Isquemia/reperfusión.
ICT	Isquemia cerebral transitoria.
iGluRs	Familia de receptores ionotrópicos.
K^+	Ion potasio.
KCl	Cloruro de potasio.
Keap1	Kelch-like ECH- associated protein 1.
KH_2PO	Posfato dibasico de potasio.
Maf	Proteína oncogenética.
MAZ	Myc-associated zinc finger protein.
Mg^{2+}	Ion magnesio.
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio.
mGluRs	Familia de receptores metabotrópicos.

REST/NRSF	Represor element silencing transcription/neuron-restrictive silencer.
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.
SAC	S-alil-cisteína.
SAMC	S-alil-mercaptocisteína.
Tris-HCl	Tris-ácido clorhídrico.
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolio.
γ-GC	L-γ-glutamil-L-cisteína.
Δψm	Potencial de membrana mitocondrial.
18S	Subunidad ribosomal.