



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD

DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN A LA SALUD

LICENCIATURA EN MEDICINA

“Efecto de los compuestos derivados del ajo sobre la regulación  
antioxidante inducida por el factor Nrf2 en ratones jóvenes y viejos durante la  
isquemia cerebral”

M.P.S.S JADE BELÉN HIDALGO LÓPEZ  
MATRÍCULA: 2163062273

ASESOR INTERNO

DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA

No. Económico 26343

ASESOR EXTERNO

DR. CARLOS A. SILVA ISLAS

Numero de empleado  
4036

AGOSTO 2023

<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>CAPITULO I INVESTIGACIÓN</b>	5
Efecto de los compuestos derivados del ajo sobre la regulación antioxidante inducida por el factor Nrf2 en ratones durante la isquemia cerebral	5
1.1 Planteamiento del problema	5
1.2 Justificación	5
1.3 Marco teórico	5
1.4 Objetivo general	9
1.5 Objetivos específicos	9
1.6 Hipótesis	9
1.7 Metodología	9
1.7.1 Tipo de estudio	
1.7.2 Definición operacional	
1.7.3 Material y métodos	
1.8 Resultados: cuadros y gráficas	18
1.9 Análisis de resultados	20
1.10 Conclusiones de la investigación	21
<b>CAPITULO II DESCRIPCIÓN DE LA COMUNIDAD DONDE SE HIZO LA INVESTIGACIÓN</b>	 22
1. Datos históricos	
<b>CAPITULO III DESCRIPCIÓN DEL CENTRO DE SALUD, INFRAESTRUCTURA, RECURSOS FÍSICOS Y HUMANOS</b>	 23

<b>CAPITULO IV ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL SERVICIO SOCIAL</b>	<b>24</b>
---	-----------

**CAPITULO V CONCLUSIONES DEL PASANTE SOBRE SU SERVICIO SOCIAL**

1.1 En relación a su formación como persona	25
1.2 En relación a su formación profesional	26
1.3 En relación a su aportación a la comunidad	26
1.4 En relación con su institución educativa	26
Bibliografía	27

## INTRODUCCIÓN

El evento cerebrovascular (EVC) es un trastorno circulatorio cerebral en el que uno o más vasos sanguíneos se ven afectados, alterando temporal o permanentemente la función del cerebro. El evento cerebral vascular es un problema de salud pública porque en 2015 representó la segunda causa de muerte a nivel mundial y fue la primera causa de discapacidad en adultos en los países industrializados (1).

La isquemia cerebral representa el 87% de los casos de EVC y se produce por la oclusión permanente o transitoria de los vasos sanguíneos cerebrales, provocada principalmente por un trombo o émbolo que disminuye o bloquea el flujo sanguíneo cerebral. La oclusión transitoria del flujo sanguíneo cerebral induce una serie de eventos bioquímicos conocidos como cascada isquémica, que incluyen: agotamiento de los niveles de ATP, glucólisis anaeróbica, acidosis láctica, despolarización de la membrana, excitotoxicidad, disfunción mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, estrés oxidativo e inflamación, que conduce a la muerte neuronal. El aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno induce la oxidación de lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que conduce a daño de la integridad celular y al deterioro de la función, lo que eventualmente causa la muerte neuronal. El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es el principal regulador de la respuesta al estrés oxidativo debido a su capacidad para inducir la transcripción de proteínas antioxidantes y de fase 2, como la hemoxygenasa-1 (HO-1), NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1), superóxido dismutasa 1 (SOD1), SOD2, glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT), que en conjunto son capaces de regular el estado redox celular al disminuir los niveles de especies reactivas (2). Es por ello que, la evaluación de moléculas que actúen a través de la vía de Nrf2 para el tratamiento de la isquemia cerebral.

## **CAPÍTULO I INVESTIGACIÓN**

### **EFFECTO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DEL AJO SOBRE LA REGULACIÓN ANTIOXIDANTE INDUCIDA POR EL FACTOR NRF2 EN RATONES DURANTE LA ISQUEMIA CEREBRAL**

#### 1.1 Planteamiento del problema

Dado que el evento cerebrovascular isquémico es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la principal causa de discapacidad, en la actualidad el único tratamiento farmacológico aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) es el activador del plasminógeno de tipo tisular recombinante (rt-PA), que de tal manera es necesaria la investigación de nuevos tratamientos que favorezcan la recuperación del paciente, como lo es la S-alilcisteína.

#### 1.2 Justificación

De acuerdo a la OMS anualmente 15 millones de personas a nivel mundial sufren de un evento vascular cerebral, de los cuales 5 millones mueren y el resto quedan con secuelas permanentes (1).

Hasta la fecha, la administración intravenosa de rt-PA era la única terapia establecida para el accidente cerebrovascular isquémico. Sin embargo, solo beneficia a una pequeña parte de los pacientes porque su ventana de tiempo de eficacia es bastante limitada. Además, de que la reperfusión puede desencadenar estrés oxidativo. Por lo tanto, es necesario encontrar terapias alternativas para el daño por isquemia/reperfusión, incluidas estrategias que mejoren los daños neuronales mediadas por especies reactivas de oxígeno (3).

#### 1.3 Marco teórico

La Enfermedad Vascular Cerebral (EVC) se define como un episodio súbito de disfunción focal cerebral, de retina o médula espinal y con duración  $\geq 24$  horas, o sin importar la duración si en la imagen o la autopsia, se observa infarto o hemorragia en asociación con los síntomas (4)

Existen dos subtipos de EVC, isquémico, representando más del 70% de los casos y el hemorrágico.

El sistema de clasificación TOAST es el más utilizado para pacientes con isquemia cerebral y define cinco subtipos: 1) aterosclerosis de grandes arterias, 2) cardioembólico, 3) oclusión de vasos pequeños, 4) accidente cerebrovascular de otra etiología determinada, y 5) accidente cerebrovascular de etiología indeterminada (5)

Los datos de la carga global de morbilidad de 2016 que se publicaron en 2019 indican que una de cada cuatro personas sufrirá un accidente cerebrovascular en su vida. Se estima que hay 9,6 millones de accidentes cerebrovasculares isquémicos y 4,1 millones de accidentes cerebrovasculares hemorrágicos (incluidas las hemorragias intracerebrales y subaracnoideas) en todo el mundo cada año. Dentro de los factores de riesgo más importantes para presentar EVC se incluyen la hipertensión arterial, diabetes mellitus, fibrilación auricular, hiperlipidemia, tabaquismo, sedentarismo (6).

Los síndromes de accidente cerebrovascular se presentan clínicamente como déficits neurológicos de inicio repentino. Los síntomas dependen de la región afectada del cerebro, que a su vez se define por la anatomía arterial involucrada. Los síntomas comunes de accidente cerebrovascular en el hemisferio izquierdo incluyen afasia, hemiparesia derecha y hemianopsia derecha, y en el hemisferio derecho, negligencia hemiespacial izquierda, hemiparesia izquierda y hemianopsia izquierda. La mayoría (90%) de los accidentes cerebrovasculares son supratentoriales; como tal, se puede enseñar al público a reconocer y actuar en caso de accidente cerebrovascular utilizando el acrónimo FAST, para caída facial, caída del brazo, alteración del habla y tiempo. El ictus de circulación posterior o infratentorial tiene una multitud de síntomas adicionales, que incluyen diplopía, parálisis bulbar, disfagia, dismetría unilateral e incoordinación, así como niveles reducidos de conciencia (6). Para confirmar el diagnóstico se requiere de un estudio de imagen como una tomografía o resonancia magnética (7).

Dentro de la fisiopatología de la isquemia cerebral, el accidente cerebrovascular isquémico conduce a la depleción de oxígeno en el cerebro, lo que tiene varias

consecuencias celulares y moleculares que afectan la función neuronal y glial, además de alteraciones vasculares e inflamación.

La función neuronal se basa en la disponibilidad continua de ATP (que a su vez requiere un suministro continuo de oxígeno y glucosa al cerebro). Cuando se interrumpe este suministro, como en el accidente cerebrovascular, las neuronas ya no pueden mantener su gradiente transmembrana, lo que provoca el deterioro de la señalización neuronal y una serie de eventos bioquímicos conocidos como cascada isquémica; además, la despolarización anóxica (es decir, la despolarización neuronal repentina y progresiva durante estados de suministro inadecuado de sangre al cerebro) en las terminales presinápticas conduce a la liberación de neurotransmisores (8), disfunción mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN), el estrés oxidante y la inflamación (8).

La producción de ERO y ERN ocurre principalmente entre los primeros 20 min posteriores a la reperfusión y las 3 h (9). Se generan muchas ROS durante un accidente cerebrovascular isquémico agudo y existe evidencia considerable de que el estrés oxidativo es un mediador importante de la lesión tisular en el accidente cerebrovascular isquémico agudo. La isquemia cerebral genera superóxido ( $O_2^-$ ), que es el principal radical a partir del cual se forma el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es la fuente del radical hidroxilo (OH). El óxido nítrico es un radical libre soluble en agua y en lípidos que se produce a partir de la L-arginina por tres tipos de óxido nítrico sintasas (NOS). La isquemia provoca un aumento de la actividad de la NOS tipo I y III en las neuronas y el endotelio vascular, respectivamente. En una etapa posterior, se produce una actividad elevada de NOS tipo II (iNOS) en una variedad de células, incluidas la glía y los neutrófilos infiltrantes. Por lo tanto, los radicales libres se consideran un objetivo terapéutico importante para mejorar el resultado de un accidente cerebrovascular isquémico (10)

El factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) es considerado uno de los reguladores más importantes de la respuesta celular contra el estrés oxidativo debido a que induce la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la defensa antioxidante (12).

En condiciones homeostáticas basales, Nrf2 en el citoplasma se une

predominantemente a la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) a través del complejo Keap1-Cullin3 (Cul3)-Rbx1 ubiquitina E3 ligasa y se degrada constitutivamente por el proteasoma. Cul3 sirve como una proteína de andamiaje que se une tanto a Keap1 como a Rbx1. Como resultado, la abundancia y la actividad de Nrf2 se mantienen en niveles bajos. En condiciones de estrés, la proteína Nrf2 se libera de la represión mediada por Keap1. El Nrf2 estabilizado y acumulado se traslada al núcleo y, como un heterodímero con una de las proteínas Maf pequeñas, se une al ARE/EpRE en la región promotora de los genes diana de Nrf2, activando así una amplia gama de genes citoprotectores (13).

cuando las células se exponen a estímulos oxidativos excesivos durante la isquemia cerebral, Nrf2 se libera de Keap1, se traslada al núcleo y se une a la secuencia elementos de respuesta antioxidante (ARE), regulando así la expresión de sus genes diana, que codifican proteínas citoprotectoras como enzimas antioxidantes. En los últimos años, los estudios han proporcionado evidencia sustancial in vivo de la alternancia dinámica de la expresión de Nrf2, así como de sus genes diana, y de la distribución celular y subcelular de Nrf2 durante las diferentes etapas de la isquemia cerebral (13).

La creciente evidencia sugiere que Nrf2 está involucrado en la enfermedad isquémica cerebral y, por lo tanto, puede ser un objetivo prometedor para el tratamiento del accidente cerebrovascular (12). Esto se corrobora aún más, ya que varios estudios destacan la capacidad de los medicamentos o compuestos naturales derivados de plantas para proteger contra el accidente cerebrovascular a través de la activación de la vía Nrf2 (14, 15).

La molécula de organosulfuro S-alil cisteína (SAC) es el compuesto más abundante del extracto de ajo envejecido (AGE) y exhibe una amplia gama de propiedades antioxidantes. Varios estudios han demostrado que SAC mejora el daño oxidativo del accidente cerebrovascular experimental (16,17).

Sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo antioxidante subyacente al efecto protector de SAC contra el accidente cerebrovascular experimental. Dado que numerosos antioxidantes tienen propiedades protectoras de amplio espectro, incluida la estimulación del factor de transcripción Nrf2, planteamos la hipótesis de



que SAC podría tener acciones similares. Por lo tanto, emprendimos este estudio para investigar los posibles efectos neuroprotectores y el mecanismo subyacente de SAC contra la lesión cerebral isquémica/reperfusión. Nuestra nueva evidencia se presenta para demostrar que SAC confiere neuroprotección al activar la vía de señalización antioxidante Nrf2.

#### 1.4 Objetivo general

Evaluar el nivel de protección de la SAC sobre el daño inducido por 1 hora de isquemia cerebral y 48 horas de reperfusión en ratones de la cepa CD1 de 3 meses.

#### 1.5 Objetivos específicos

- 1) Comparar las alteraciones conductuales inducidas por isquemia cerebral y posterior a la administración de la SAC.
- 2) Evaluar los efectos de la SAC en los niveles del factor Nrf2
- 3) Evaluar los niveles de Cu/ZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), HO-1, Keap-1 en el hipocampo.

#### 1.6 Hipótesis

La SAC inducirá protección en el tejido cerebral tras el daño producido por la isquemia cerebral por un aumento de la acetilación del promotor de Nrf2, lo cual aumentará su expresión y activación induciendo la expresión de enzimas antioxidantes.

#### 1.7 Metodología

##### 1.7.1 Tipo de estudio

Estudio experimental

### 1.7.2 Definición operacional

Se establecerá una técnica de muestreo consecutivo por conveniencia en las áreas del laboratorio de patología vascular del INNN que está encargado de la planeación, ejecución y análisis de las muestras.

Cronograma: Periodos en meses (x)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Planeación	x	x										
Ejecución			x	x	x	x	X					
Análisis								x	x	x	x	
Preparación de la publicación												x

Planeación: se refiere a la redacción del estudio, sometimiento al comité de investigación y local de bioética.

Ejecución: hace referencia a la obtención de los tejidos en fresco de cada grupo de animales

Análisis: se refiere a la determinación de NRF2, HO-1, Keap-1, CuZnSOD y MnSOD por parte del laboratorio de patología vascular del INNN

### 1.7.3 Material y métodos

#### Animales

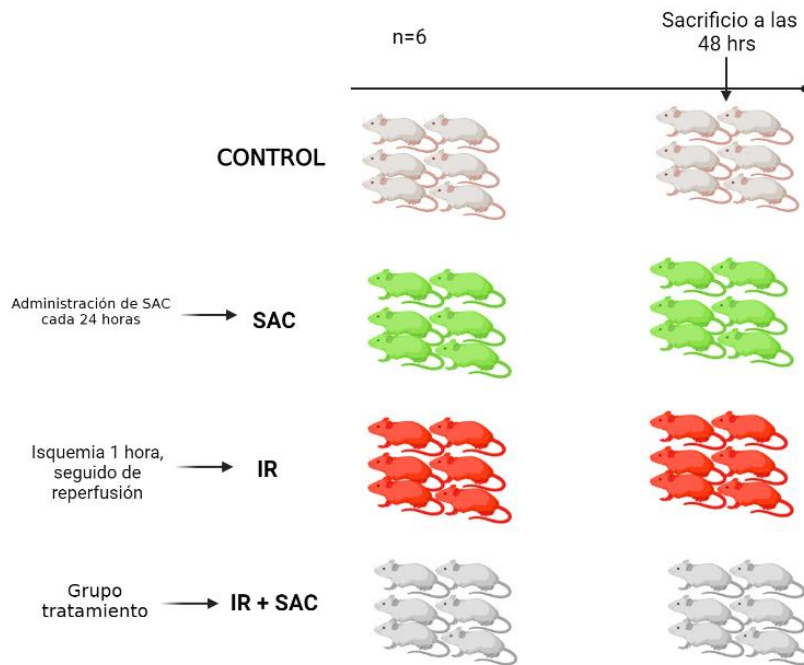
Se requirieron 24 ratones macho de la cepa CD-1 de 3 meses de edad, los cuales se seleccionaron de manera aleatoria para a su vez dividirlos en 4 grupos de estudio.

Todos los animales se encontraron en cajas de poli sulfonato con acceso libre a agua y alimento con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad dentro de un microaislador a temperatura de 22°C.

## Diseño del estudio

Se dividieron en 4 grupos con una n=6:

- 1) Grupo control (CT)
- 2) Grupo sometido a isquemia y reperfusión (IR)
- 3) Grupo administrado con SAC (SAC)
- 4) Grupo sometido a isquemia y reperfusión, administrado con SAC (IR + SAC)



Los ratones de los grupos IR e IR + SAC se sometieron a una hora de isquemia y 48 horas de reperfusión. Tanto los grupos de SAC e IR + SAC fueron administrados con SAC disuelta en solución salina al 0.9% (100 mg/kg vía intraperitoneal) cada 24 horas (tabla 1). La primera dosis del tratamiento se administra antes del inicio de la reperfusión.

Tabla 1. Dosis de SAC en ratones por kilogramo de peso

Administración de SAC ratones (cada 24 h)	
Dosis	100 mg/Kg
Concentración solución	50 mg/mL

Peso ratón	Cantidad mg	Volumen uL por ratón	Peso ratón	Cantidad mg	Volumen uL por ratón	Peso ratón	Cantidad mg	Volumen uL por ratón	Peso ratón	Cantidad mg	Volumen uL por ratón
25	2.5	50	41	4.1	82	57	5.7	114	73	7.3	146
26	2.6	52	42	4.2	84	58	5.8	116	74	7.4	148
27	2.7	54	43	4.3	86	59	5.9	118	75	7.5	150
28	2.8	56	44	4.4	88	60	6	120	76	7.6	152
29	2.9	58	45	4.5	90	61	6.1	122	77	7.7	154
30	3	60	46	4.6	92	62	6.2	124	78	7.8	156
31	3.1	62	47	4.7	94	63	6.3	126	79	7.9	158
32	3.2	64	48	4.8	96	64	6.4	128	80	8	160
33	3.3	66	49	4.9	98	65	6.5	130	81	8.1	162
34	3.4	68	50	5	100	66	6.6	132	82	8.2	164
35	3.5	70	51	5.1	102	67	6.7	134	83	8.3	166
36	3.6	72	52	5.2	104	68	6.8	136	84	8.4	168
37	3.7	74	53	5.3	106	69	6.9	138	85	8.5	170
38	3.8	76	54	5.4	108	70	7	140	86	8.6	172
39	3.9	78	55	5.5	110	71	7.1	142			
40	4	80	56	5.6	112	72	7.2	144			

Además, los ratones fueron administrados con un analgésico, meloxicam, cada 24 horas a una dosis de 3 mg/kg vía subcutánea (tabla 2) así como un antibiótico, enrofloxacino, 10 mg/kg cada 24 horas vía subcutánea (tabla 3).

Tabla 2. Dosis de Meloxicam por kilogramo de peso

**Administración de Meloxicam ratones (cada 24 h)**

Dosis	3 mg/Kg
Concentración solución	5 mg/mL

Peso ratón (g)	Volumen meloxicam	
	mL	uL
30-41	0.02	20
42-58	0.03	30
59-74	0.04	40
75-91	0.05	50

Tabla 3. Dosis de enrofloxacin por kilogramo de peso

**Administración de Enrofloxacin ratones (cada 24 h)**

Dosis	10 mg/Kg
Concentración solución stock	50 mg/mL (5%)
Concentración solución 1:10	5 mg/mL

Peso ratón (g)	Volumen Enrofloxacin dilución 1:10 (5 mg/mL)	
	mL	uL
25-27	0.05	50
28-32	0.06	60
33-37	0.07	70
38-42	0.08	80
43-47	0.09	90
48-52	0.10	100
53-57	0.11	110
58-62	0.12	120

A los animales correspondientes a cada grupo se evaluará el estrés oxidante, los niveles totales de Nrf2 y Keap 1 y de las enzimas Cu/ZnSOD, MnSOD, y HO-1 mediante Western Blot.

La evaluación de los niveles de las enzimas antioxidantes mediante western blot servirá para determinar si existe un cambio en el contenido total de éstas enzimas en función del tratamiento administrado.

**Modelo oclusión de arteria cerebral media**

- 1) Los ratones se anestesiaron con un régimen adecuado de anestesia, la inducción con 1,5 - 2% isoflurano y el mantenimiento de 1,0 a 1,5% isoflurano (18).
- 2) La temperatura corporal de los ratones se mantiene en 36,5 ° C durante la cirugía.
- 3) La desinfección de la piel y la piel circundante con un agente apropiado (por ejemplo, 70% de alcohol etílico o yodopovidona) y secarlo después.
- 4) Se realiza una incisión de línea media del cuello y los tejidos blandos se separan (18).
- 5) La arteria carótida común izquierda (ACCI) se disecciona cuidadosamente libre de los nervios que rodean (sin dañar el nervio vago) y se realiza una ligadura.

- 6) La arteria carótida externa izquierda (ACEI) se separa y un segundo nudo se hace.
- 7) A continuación, la arteria carótida interna izquierda está aislado y un nudo se prepara con un filamento de 5-0.
- 8) Después de obtener la buena vista de la arteria carótida interna izquierda y la arteria izquierda pterigopalatina, ambas arterias se recortan, con un clip microvascular (18).
- 9) Un pequeño agujero se corta en la arteria carótida común antes de que se bifurca a la ACEI y la interna. Un monofilamento de nylon 6-0 ó 5-0 se introduce en la interna, hasta que se detenga en el clip (18).
- 10) Las arterias cortadas se abren al mismo tiempo que el filamento se inserta en la interna para ocluir el origen del polígono de Willis (18).
- 11) El tercer nudo en la interna está cerrada para fijar el filamento en su posición.
- 12) Por último se realiza el cierre de la herida quirúrgica (18).

#### Evaluación conductual

La isquemia y reperfusión inducen un gran daño al tejido cerebral, lo cual se ve reflejado en la coordinación motora de los animales es por ello que se realizaron pruebas para evaluar la coordinación motora de los animales, determinando así si el tratamiento con SAC disminuyen las afecciones motoras que se presentan posteriores a un evento isquémico. Se determinó el déficit neurológico mediante 5 evaluaciones de la siguiente manera:

- 10 minutos antes de la reperfusión como indicador de la oclusión de la arteria cerebral media.
- 1 hora posterior a la reperfusión.
- 30 minutos antes del sacrificio de los animales

Se asignará un valor de cero si el animal presenta una conducta normal y un valor de 1 si presentan una conducta alterada. La suma de las 5 pruebas indicara el déficit neurológico.

Las pruebas a evaluar serán

- Movilidad espontanea: los ratones se colocarán en una superficie plana de 1m<sup>2</sup> y se observará la presencia de movimientos exploratorios en un tiempo máximo de 10 segundos. Los ratones con ausencia de movimiento serán descartados del estudio ya que esto es un indicativo de daño hemorrágico (2).
- Giros contralaterales a la lesión: los ratones se tomarán de la cola y se levantarán con una inclinación de 45° sobre una superficie plana, cuidando que las patas delanteras toquen la superficie. Se observará la presencia de giros contralaterales a la lesión en un periodo de 30 segundos. Los animales dañados presentarán al menos 5 giros en ese periodo de tiempo (2).
- Flexión de las patas delanteras: los ratones se tomarán de la cola y se levantarán aproximadamente 30 cm sobre una superficie plana y se observará la flexión de los miembros delanteros. Los ratones con daño flexionarán la pata delantera contralateral a la lesión (2).
- Reflejo de agarre: los ratones se tomarán de la cola y se acercarán a un cable. Los ratones dañados presentarán dificultad para intentar agarrarse con ambas patas delanteras (2).
- Barra horizontal: los ratones se suspenderán en una barra horizontal, sujetándose con ambas patas delanteras y se tomará el tiempo en el cual los ratones se mantienen sostenidos. Los animales dañados serán incapaces de sostenerse por más de 5 segundos (2).

## Eutanasia

A todos los animales se les administró pentobarbital sódico intraperitoneal a una dosis de 70-90 mg/kg

Posterior a administración, los animales se decapitaron para la obtención de tejido en fresco.

## Homogenización del tejido

Tras la obtención del cerebro, tanto los estriados, cortezas e hipocampos izquierdos

se aislarán y se homogenizarán con 300  $\mu$ L de buffer de lisis frío RIPA (EDTA 5Mm, SDS 0.1%, deoxicolato de sodio 1%, NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM pH 7.4, Tritón<sup>®</sup> X 100 al 1%), 7  $\mu$ L de inhibidores de proteasas (apoptina, leupeptina y pepstatina A), 70  $\mu$ L de inhibidores de fosfatasas y 35  $\mu$ L de PMSF. Se coloca cada tubo con la muestra en el sonicador a una amplitud del 60% por 10 segundos. Se centrifugan a 10,000 x g por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se colectan y se almacenan a -70°C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas de los tejidos obtenidos se determinó por método de Lowry.

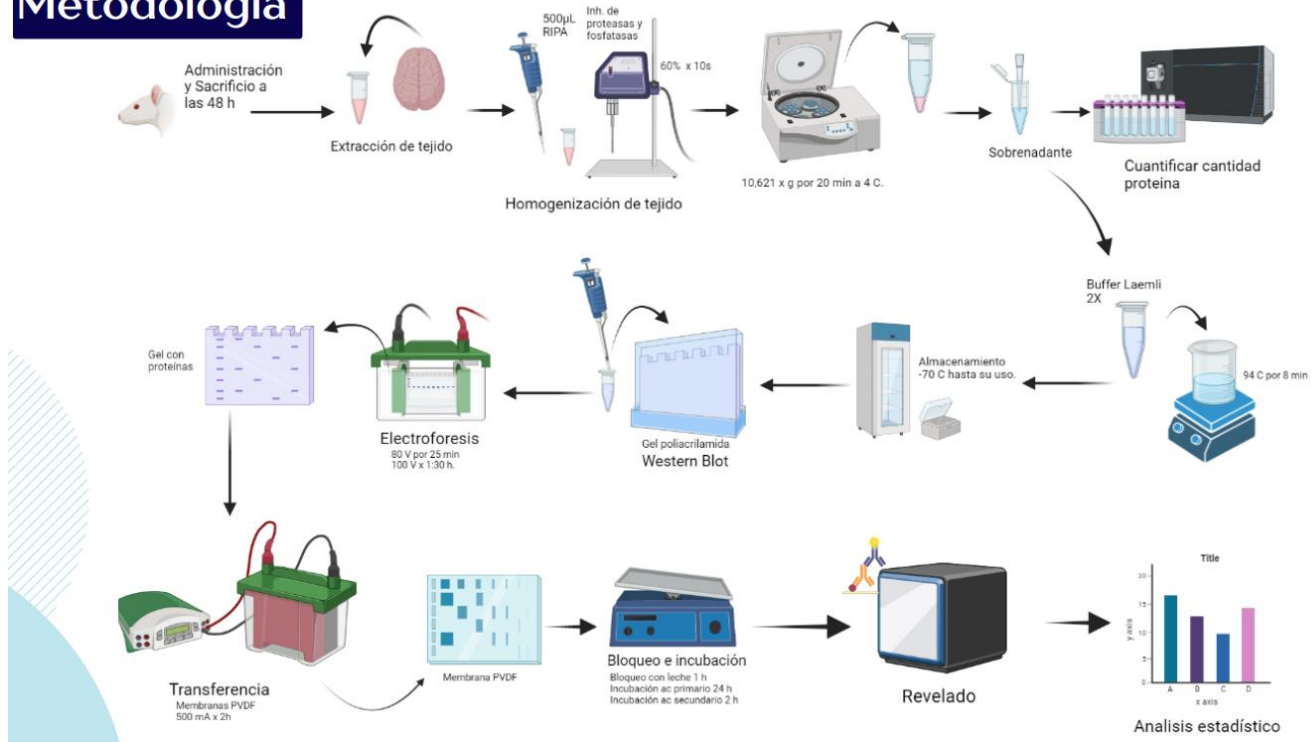
### Western Blot

Los niveles de NRF2, HO-1, Keap-1, CuZn SOD y MnSOD se evaluaron de forma cuantitativa por medio de Western blot.

Se tomaron 100  $\mu$ L de cada tejido ya homogenizado, adicionado con buffer Laemli, para correr en geles de poliacrilamida al 10% y 15%. Las proteínas se transfieren a membranas de PVDF. El bloqueo de dichas membranas se realizó con leche baja en grasa al 5% diluida en TBS-T 1X durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente la incubación de anticuerpos primarios con las siguientes diluciones: anti-NRF2 (1:1000), anti-Keap 1 (1:500), anti-HO-1 (1:1000), anti-CuZnSOD (1:1500), anti-MnSOD (1:1500), anti-alfa tubulina (1:10,000) y anti-B-actina (1:5,000) durante 24 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizan 3 lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno para después incubar el anticuerpo secundario: anti-ratón (1:10,000) o anti-conejo (1:10,000) por dos horas en agitación a temperatura ambiente. El revelado de las membranas se realizó con el kit inmobilon Western en un fotodocumentador.



## Metodología



### Análisis de resultados

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el programa Image J. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba de Tukey, usando el software Graph Pad Prism 10.0. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

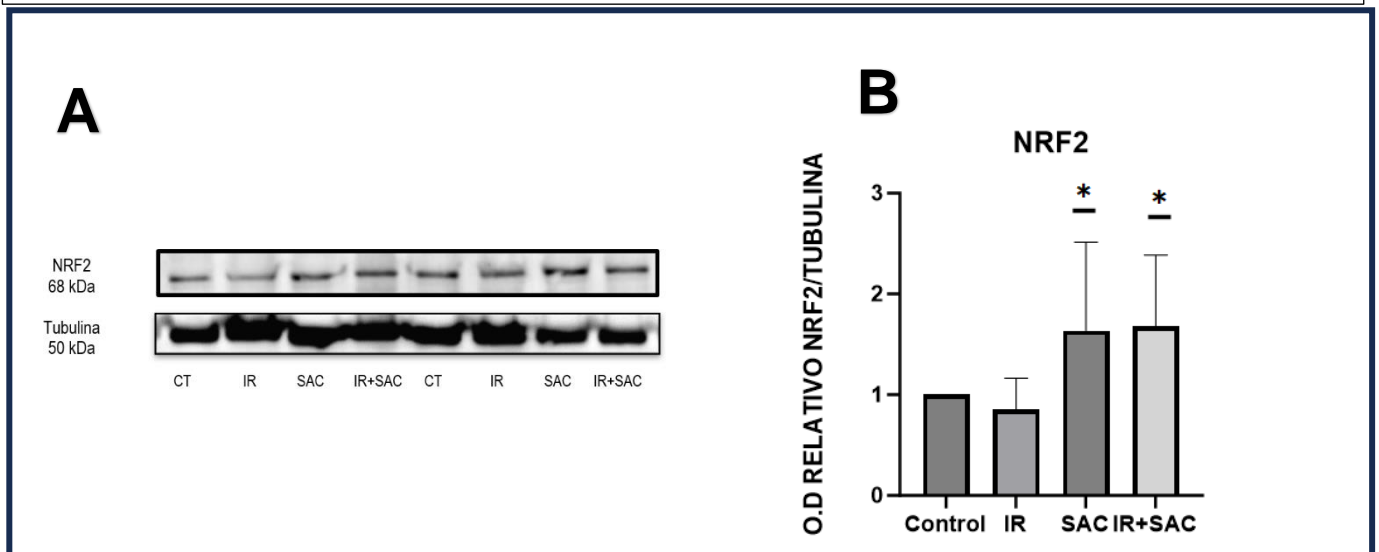
**Resultados. TODOS ESTOS RESULTADOS PERTENECEN AL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ, ASÍ COMO AL TITULAR DEL PROYECTO, EL DR. CARLOS A. SILVA ISLAS, QUIEN SERÁ EL ENCARGADO DE LA PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS FINALES EN UN ARTÍCULO DE UNA REVISTA INDEXADA.**

Cuadros y gráficas

**FIGURA 1**

Comparación de los niveles de expresión de NRF2 en hipocampos

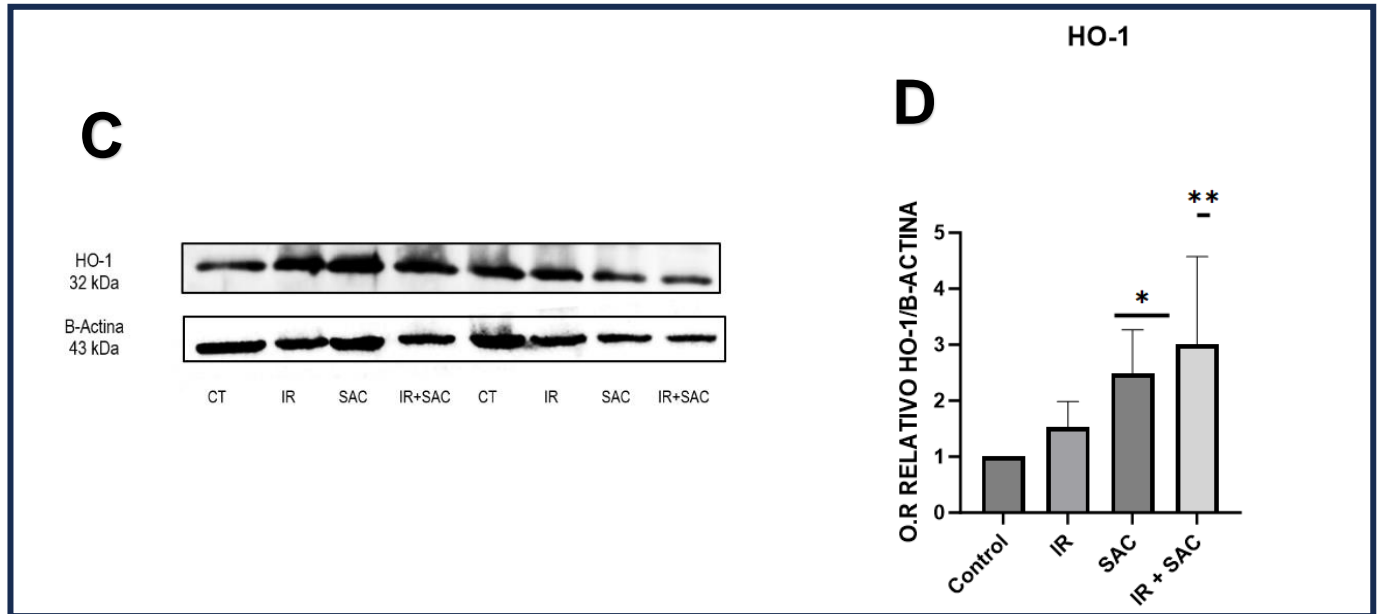
- A) La proteína observada, Nrf2, fue expresada en Western Blot en hipocampos, dependiendo del grupo de estudio, en los grupos que fueron administrados con SAC (SAC e IR + SAC) se observó mayor expresión de los niveles de Nrf2 así como los niveles del control de carga utilizado, tubulina.
- B) Se observa en la gráfica que los grupos que fueron administrados con el tratamiento con SAC, aumentaron los niveles de expresión de Nrf2, tanto el grupo SAC e IR +SAC, en comparación con el grupo control e IR, donde  $*p<0.05$ .



## FIGURA 2

Comparación de los niveles de expresión de HO-1 en hipocampos

- A) La proteína observada, HO-1, fue expresada en Western Blot en hipocampos, dependiendo del grupo de estudio, en los grupos que fueron administrados con SAC (SAC e IR + SAC) se observó mayor expresión de esta enzima antioxidante así como los niveles del control de carga utilizado, B-actina.
- B) Se observa en la gráfica que los grupos que fueron administrados con el tratamiento con SAC, aumentaron los niveles de expresión de HO-1, tanto el grupo SAC e IR +SAC, en comparación con el grupo control e IR, donde  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$



## 1.8 Análisis de resultados

### La SAC incrementa la activación de NRF2 en el hipocampo

Desde el tratamiento con SAC en los grupos administrados (IR+ SAC), disminuyó el deterioro del comportamiento motor y el estrés oxidativo inducido por la isquemia cerebral, por lo que estos reportes indican la habilidad que tiene la SAC de inducir la activación de NRF2.

El grupo sometido a isquemia-reperfusión (IR) no tuvo cambios significativos en la activación de NRF2 comparado con el grupo control. Contrariamente tan sólo al grupo de animales al que se le administró SAC, con una  $p < 0.05$ , por lo que fue significativo el incremento en comparación con el grupo control. Además los animales del grupo con isquemia-reperfusión más administración de tratamiento con SAC mostraron un aumento significativo para la activación transcripcional de NRF2 comparado con el grupo control e isquemia, lo que nos traduce que NRF2 disminuye el estrés oxidativo tras la isquemia, como se observa en la figura 1.

### La SAC incrementa los niveles de HO-1

El grupo sometido a isquemia-reperfusión (IR) no tuvo cambios significativos en la activación de HO-1 comparado con el grupo control. Contrariamente en el grupo de animales al que se le administró SAC, con una  $p < 0.05$  por lo que fue significativo el incremento en comparación con el grupo control. Además los animales del grupo con isquemia-reperfusión más administración de tratamiento con SAC mostraron un aumento significativo  $p < 0.01$ , para la activación de HO-1 comparado con el grupo control e isquemia (figura 2).

## 1.9 Conclusiones de la investigación

La evidencia emergente demuestra que la vía involucrada con Nrf2 juega un papel crucial en la adaptación celular al controlar una amplia gama de proteínas citoprotectoras, contrarrestar distintos daños endógenos y exógenos al tiempo que proporciona un objetivo terapéutico óptimo prometedor contra diversas enfermedades. Mediante el uso de varios modelos con roedores de accidentes cerebrovasculares isquémicos, los estudios preclínicos recientes proporcionan evidencia directa in vivo que revela la contribución de la vía Nrf2 en la patogénesis y la neuroprotección del accidente cerebrovascular isquémico. Este proyecto intenta destacar el potencial prometedor de las intervenciones dirigidas a Nrf2, lo que implica que su activación.

Parte de los resultados demuestran que los compuestos antioxidantes del tratamiento con SAC mejoran la función motora y disminuyen el daño cerebral inducidos por la isquemia. Los antioxidantes indirectos inducen la activación de Nrf2 y aumentan la defensa antioxidante endógena, desencadenando una protección a largo plazo contra el estrés oxidativo, en comparación con los antioxidantes directos que reaccionan con las especies reactivas de oxígeno y se consumen, generando una protección a corto plazo.

Por estas razones, evaluamos el efecto de la SAC en la activación de Nrf2 como un posible mecanismo de protección contra el daño (grupo IR). La activación de Nrf2 se observó en ratones sanos a las que se les administró SAC, mientras que la administración de SAC en animales sometidos a IR (IR + SAC) también indujo la activación de Nrf2. Sin embargo, en el grupo IR + SAC, la activación de Nrf2 fue mayor, lo que sugiere un efecto sinérgico de la agresión con IR y el tratamiento con SAC en la activación de Nrf2. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que el efecto protector de SAC observado a nivel molecular y en la función motora se produjo a través de la activación de Nrf2.

Este estudio demuestra el efecto protector de la SAC ante el daño inducido por la isquemia cerebral y su asociación con el decremento del estrés oxidativo a través de Nrf2, por lo que lo hace un compuesto potencial para tratamiento farmacológico en la enfermedad cerebrovascular isquémico.

## **CAPÍTULO II DESCRIPCIÓN DE LA COMUNIDAD DONDE SE HIZO LA INVESTIGACIÓN**

### Historia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

A mediados de los años cuarenta del siglo XX, en el Hospital Juárez de la ciudad de México, existía un Servicio de Neurocirugía distribuido en tres sectores; encabezado por los doctores Miguel Lavalle, Joaquín Maas y Manuel Velasco Suárez, quienes gracias a su esfuerzo consiguieron durante la presidencia de Miguel Alemán Valdés, la firma del decreto presidencial que daría lugar a la creación del Instituto Nacional de Neurología (19).

Al inicio de dicho siglo, en la zona sur de la ciudad de México, había una extensa propiedad: la Hacienda de San Juan de Dios en Tlalpan, integrada por terrenos de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, parte de los cuales se utilizaron para construir, en 1963, el Instituto Nacional de Neurología, que sería inaugurado por el Presidente Adolfo López Mateos el 28 de febrero del siguiente año (19).

El primer caso resuelto por cirugía en el Instituto lo llevó a cabo el Dr. Velasco Suárez en 1964 y el primer número de la revista de esta entidad se editó en el mes de septiembre de 1966; la cual se enfocaba en la difusión de artículos científicos, en informar de acontecimientos y reuniones de tipo académico; así como de todo lo relacionado con las actividades laborales del personal. En este mismo año concluyó su formación como residente de neurocirugía el Dr. Fernando Chong García, convirtiéndose en el primer especialista egresado del Instituto (19).

En 1974, gracias a las gestiones iniciadas años atrás por los doctores Manuel Velasco Suárez y Gastón Castellanos en la Organización Mundial de la Salud, en Ginebra Suiza, se logró que el Instituto fuera considerado Centro Colaborador de la OMS; gracias a dicha designación se pudo contar con apoyo para realizar actividades académicas, contar con profesores visitantes y con becas para estancias en el extranjero de médicos y técnicos; así como becas para extranjeros que asistieran al Instituto, por periodos determinados, con el fin de familiarizarse y adiestrarse en un tema específico en el campo de las neurociencias (19).

El Dr. Jesús Rodríguez Carbajal asumió la Dirección en 1993, un año después del inicio de su gestión, se publicó en el Diario Oficial el decreto presidencial que, considerando los méritos del Dr. Manuel Velasco Suárez y el interés de diversos representantes de la comunidad, designaba al Instituto con su nombre, para quedar como “Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez” que inició sus funciones en 1998 con la toma de posesión, el 6 de enero, del Dr. Julio Sotelo Morales como su nuevo Director General. Fue en el año 2000 cuando el instituto obtuvo la certificación que lo convertía en un Instituto Nacional de Salud (19).

Los servicios en estas disciplinas alcanzan a más de 52 departamentos que cubren todas las ciencias médicas afines, como la otoneurología, la neurooftalmología, la neurofisiología, neurogenética y la neuroimagen, entre otras. En los que respecta al área de investigación, los campos de estudio de neurociencias como la biología molecular, la psicología experimental, la neuroquímica, neurofarmacología, neuroinmunología y neurocirugía experimental, son estudiadas en 30 laboratorios de experimentación especializada; mientras que en la docencia, el Instituto constituye el centro de entrenamiento más grande en Latinoamérica para la formación de médicos especialistas en ciencias neurológicas.

Actualmente se encuentra ubicado en Av. Insurgentes Sur 3877, La Fama, Tlalpan, 14269 Ciudad de México.

### **CAPITULO III DESCRIPCIÓN DE LA INSTITUCIÓN, INFRAESTRUCTURA, RECURSOS FÍSICOS Y HUMANOS**

El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN) proporciona atención especializada, mediante una consulta enfocada a problemas relativos a las neurociencias como neurología, neurocirugía y neuropsiquiatría.

El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN) proporciona atención especializada, mediante una consulta enfocada a problemas relativos a las neurociencias como neurología, neurocirugía y neuropsiquiatría.

Su misión es contribuir al bienestar y la equidad social en cumplimiento con el derecho de protección a la salud a través de la innovación científica, la excelencia académica y la calidad y seguridad de los servicios de salud en el ámbito de las neurociencias

Su visión es ser la institución pública líder a nivel nacional e internacional en atención médica integral; enfocada principalmente en el sistema nervioso, el desarrollo de investigación clínica, científica y en la formación de capital humano, con el más alto grado de humanismo, calidad y eficiencia (19).

## **CAPITULO IV ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL SERVICIO SOCIAL**

### **-Actividades de investigación**

- Durante los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre se empezaron a realizar los modelos de oclusión de la arteria cerebral media, la evaluación del déficit neurológico en los animales sometidos a este procedimiento de isquemia cerebral, así como la obtención de los tejidos en fresco (hipocampo, estriado y corteza). Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo en la facultad de química y medicina de la UNAM, de 08:00 a.m a 10:00 a.m.
- En el mes de diciembre se llevó a cabo la homogenización de los tejidos con buffer RIPA e inhibidores de proteasas para poder realizar la cuantificación de proteínas por método de Lowry en el laboratorio de patología vascular del INNN.
- A partir de enero hasta el mes de mayo de 09:00 a.m a 15:00 horas se realizó la técnica de Western Blot para evaluar los niveles de las proteínas NRF2, Keap 1, HO-1, SOD1 y SOD2.
- Durante junio y julio comenzamos a realizar extracción de ADN de los tejidos (hipocampo, corteza y estriado) de ratones sometidos a isquemia cerebral,



para posteriormente realizar PCR de punto final y así validar primers de la región promotora de NRF2.

#### Otras actividades asistenciales

- Los días lunes, miércoles y jueves de 07:00 a.m a 08:00 a.m tomaba clases presenciales por parte del neurocampus del INNN, junto con los residentes de neurología y neurocirugía sobre temas básico y relevantes de neurociencias.
- En el mes de marzo se llevó a cabo en el INNN la semana del cerebro, donde participé con el cartel “Neuroplasticidad, algo que no debemos de olvidar en el Alzheimer”.

## **CAPITULO V CONCLUSIONES DEL PASANTE SOBRE SU SERVICIO SOCIAL EN RELACIÓN A MI FORMACIÓN COMO PERSONA**

Constantemente como estudiantes nos encontramos en un proceso de aprendizaje diario, pero es hasta el servicio social donde podemos llegar a consolidar o incluso enriquecer más nuestra formación. Toda la carrera y hasta el internado estuve en contacto estrecho con pacientes, sin embargo, este año fue un poco diferente, ya que mi servicio social fue totalmente enfocado en la investigación pero en un laboratorio, el de patología vascular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, lo que me permitió ampliar la visión que tenía sobre el abordaje completo y multidisciplinario que conlleva la búsqueda de un nuevo fármaco para su aplicación clínica.

Pude darme cuenta que el médico no sólo debe de saber sobre medicina, si no que siempre hay que ir más allá para poder aportar algo a la comunidad ya que en el laboratorio tuve que aprender a realizar otras técnicas con las que nunca había estado en contacto, como la realización de Western Blot, PCR, así como análisis estadísticos, por decir algunas, lo que me llevó a ser más paciente y resiliente con las situaciones, a siempre aprender algo nuevo y resolver problemas a los que no estaba acostumbrada.

## EN RELACIÓN A MI FORMACIÓN PROFESIONAL

Mi desarrollo profesional durante el servicio social en investigación fue integral, para mi fue un honor haberlo realizado en una de las instituciones más importantes del país. La investigación es uno de los pilares de la medicina, siempre en constante actualización, la necesidad de buscar alternativas en los tratamientos. Además de tener la oportunidad de colaborar con otros laboratorios como el del departamento de farmacología de la facultad de medicina de la UNAM.

Estoy segura que formar parte de este protocolo me seguirá dando la oportunidad de crecer en el ámbito de la investigación y junto con la parte clínica complementar todas las bases que adquiriré durante la carrera para beneficio de los pacientes.

Una de las partes más importantes para mi fue contar con el apoyo de mi tutor, el Dr. Carlos Silva quien desde un principio me abrió las puertas al área de investigación, fue parte fundamental para mi formación en este ámbito al compartir su experiencia y sobre todo sus valores.

## EN RELACIÓN A MI APORTACIÓN A LA COMUNIDAD

Como bien se mencionó en el marco teórico del protocolo, haciendo hincapié en la enfermedad cerebral vascular isquémica, es una de las enfermedades con más morbimortalidad a nivel mundial, sin embargo a pesar de la gran cantidad de personas afectadas por año, sólo contamos con un fármaco para su tratamiento, además de las medidas de soporte, de ahí radica la importancia de este protocolo, la creación de alternativas terapéuticas y coadyuvantes a disminuir las secuelas neurológicas de esta enfermedad, así como se busca que las personas aumenten su calidad de vida. Finalmente el objetivo de la investigación siempre será el poder ayudar a las demás personas.

## EN RELACIÓN CON MI INSTITUCIÓN EDUCATIVA

Personalmente pienso que la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) fue un punto clave en mi formación académica, pues gracias a ella que me abrió las puertas para realizar la licenciatura en medicina que siempre había querido, me

brindó todas las herramientas necesarias para formarme como profesional de la salud. Desde la oportunidad de tomar clases con profesores tanto con experiencia en el campo clínico como en la parte de investigación, ya que no sólo nos inculcaron las bases académicas de cada especialidad si no que también nos despertaron aquella curiosidad por buscar más allá de lo que venía en los libros.

La forma en que está estructurado el plan de estudios, es decir en el sistema modular, hace ser al alumno autónomo, responsable y disciplinado para la transmisión de todos los conocimientos.

Otra de las ventajas de la UAM es que a comparación de otras universidades del país, hay un inicio temprano a la exposición a los campos clínicos, donde empezamos desde una clínica familiar, donde tenemos el primer contacto con el paciente de forma prematura para desenvolver todas las habilidades de propedéutica, tener las bases de la exploración física, historia clínica que es primordial para los siguientes trimestres donde rotamos en hospitales de segundo y hasta tercer nivel de atención, en estas instituciones es donde terminamos de consolidar nuestros conocimientos cada vez más especializados. Aprendemos a tratar a los pacientes más allá de un diagnóstico, a crear una mejor relación médico-paciente.

De las cosas más importantes que la universidad procura, es no sólo formarnos como profesionistas si no que realmente intenta crear un impacto social, de ayuda a la sociedad y espero de la misma forma retribuir a la comunidad como una mejor médico y persona.

## Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). (10 de Julio de 2023). *World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean*. Obtenido de <https://www.emro.who.int/health-topics/stroke-cerebrovascular-accident/index.htm>
2. Silva-Islas CA, Cháñez-Cárdenas ME, Barrera-Oviedo D, Ortiz-Plata A, Pedraza-Chaverri J and Maldonado PD. (2019). Diallyl Trisulfide protects rat

- brain tissue against damage induced by ischemia-reperfusion through the Nrf2 pathway. *Antioxidants*. 8:410 1-22.
3. Werring, S. J. (2020). Stroke: causes and clinical features. *Acute neurology*, 48:9 561-566
  4. CENETEC. Diagnóstico y tratamiento inicial de la Enfermedad Vascul ar Cerebral Isquémica Aguda en el segundo y tercer nivel de atención. Guía de Práctica Clínica: Evidencias y Recomendaciones. México, CENETEC; 2022.
  5. Musuka TD, W. S. (2015). Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical. *Canadian Medical Association Journal*, 187 (12): 887-893.
  6. Campbell, C. V. (2020). Stroke. *The Lancet*, 396, 129-142.
  7. Shi, H. J. (2015). S-allyl cysteine activates the Nrf2-dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 133 (2) 298-308.
  8. Oliveira-Filho, J. (24 de Julio de 2023). *UpToDate*. Obtenido de <https://www.uptodate.com/contents/initial-assessment-and-management-of-acute-stroke>
  9. Bruce C.V. Campbell, D. D. (2019). Ischemic Stroke. *Nature*, 5:70 1-22.
  10. Shaheen E Lakhan, A. K. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 7:97.
  11. Peters O, Back T, Lindauer U, Brusch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U, 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (2): 196-205
  12. Alessio Alifieri, S. S. (2011). Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke. *The Journal of Physiology*, 589: 4125-4136.
  13. Lei Liu, L. L. (2019). Critical Role of Nrf2 in Experimental Ischemic Stroke. *Frontiers in Pharmacology*, 10:53 1-31.
  14. Shah, Z. A., Li, R. C., Ahmad, A. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Biswal, S., et al. (2010). The flavanol (-)-epicatechin prevents stroke damage through

- the Nrf2/HO1 pathway. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 1951–1961
15. Zhang, W., Wei, R., Zhang, L., Tan, Y., and Qian, C. (2017). Sirtuin 6 protects the brain from cerebral ischemia/reperfusion injury through NRF2 activation. *Neuroscience* 366, 95–104.
  16. Numagami Y. and Ohnishi S. T. (2001) S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J. Nutr.* 131, 1100S–1105S.
  17. Ashafaq M., Khan M. M., Shadab Raza S. et al. (2012) S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutr. Res.* 32, 133–143.
  18. Engel, O., Kolodziej, S., Dirnagl, U., Prinz, V. (2011). Modeling Stroke in Mice Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. *J. Vis. Exp.* (47). 1-5.
  19. Corona T. (2010). Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez. *Rev Invest Clin*; 62 (6): 501-502