



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Efecto del extracto de ajo envejecido y S-  
alilcisteina en la regulación de Erk 1/2 y Akt en  
un modelo de Isquemia cerebral *in vivo*”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
KAREN IVONNE ITURRALDE RODRÍGUEZ

DIRECTORA  
Dra. MÓNICA ESPINOZA  
ROJO

CODIRECTORA  
Dra. PENÉLOPE AGUILERA  
HERNÁNDEZ

CHILPANCINGO, GUERRERO. ENERO DE 2011.

**“Efecto del extracto de ajo envejecido y S-alilcisteina en la regulación de Erk 1/2 y Akt en un modelo de Isquemia cerebral *in vivo*”.**




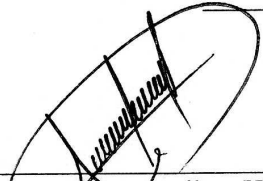
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**APROBACIÓN DE TESIS**


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 5 días del mes de noviembre de dos mil diez, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Efecto del extracto de ajo envejecido y S-alilcisteína en la regulación de Erk 1/2 y Akt en un modelo de Isquemia cerebral *in vivo*”**, presentada por la alumna Karen Ivonne Iturralde Rodríguez, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

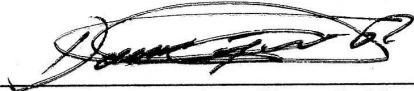
El Comité Tutorial

  
Dra. Mónica Espinoza Rojo  
Dirección de tesis

  
Dra. Penélope Aguilera Hernández  
Codirección de tesis

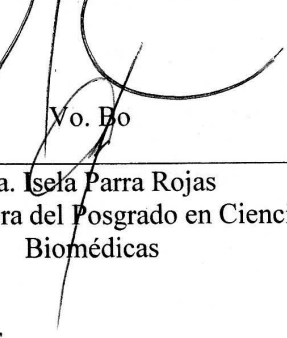
  
Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

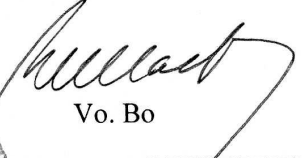
  
Dr. Alfonso Bernabé Carreño

  
Dr. Donaciano Flores Robles

Vo. Bo

Vo. Bo

  
Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

  
Dra. Berenice Illades Aguiar  
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



“Efecto del extracto de ajo envejecido y la S-allylcysteina en la regulación de Erk 1/2 y Akt en un modelo de Isquemia cerebral *in vivo*”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Guerrero en colaboración con el Laboratorio de Neuropatología Vascular perteneciente al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” México, D.F.

Bajo la Dirección de  
Dra. Mónica Espinoza Rojo

Y la Codirección de  
Dra. Penélope Aguilera Hernández.

Con la Asesoría de  
Dra. María Elena Moreno Godínez  
Dr. Alfonso Bernabé Carreño  
Dr. Donaciano Flores Robles

Durante el periodo en la q la C. Karen Ivonne Iturralde Rodríguez cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió el apoyo de la beca CONACyT con el número de becario 222256. Además, se le proporciono la beca de Movilidad Estudiantil gracias al Banco Santander Serfin durante el periodo de agosto-diciembre de 2009

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi directora de Tesis, Dra. Mónica Espinoza Rojo, gracias por creer en mí, por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado, por todo el apoyo y los conocimientos brindados.

A mi codirectora, Dra. Penélope Aguilera Hernández por ser todo un ejemplo a seguir, por los consejos y la paciencia otorgada en este proyecto.

A mis sinodales, Dra. María Elena Moreno Godínez, Dr. Donaciano Flores Robles, Dr. Alfonso Bernabé Carreño, por todas sus valiosas sugerencias y el tiempo dedicado en la revisión del trabajo.

A la Bióloga Paola Ramírez Macedo y al QBP Héctor Manuel Cornejo Ortega, por toda la ayuda brindada durante mi estancia en la Maestría.

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	24
REFERENCIAS.....	31

## RESUMEN

La enfermedad cerebro vascular isquémica es una patología con altos índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Durante la isquemia cerebral, se activa el factor inducible por hipoxia (HIF), el cual es sensible a estrés oxidante, HIF activa a Erk1/2 y Akt, como mecanismo de sobrevivencia celular, sin embargo, la sobreactivación de estas vías se ha relacionado con muerte celular. El extracto de ajo envejecido (EAE) posee propiedades antioxidantes, que regulan el estado redox y consecuentemente la activación de estas y otras vías de señalización. En un modelo de isquemia transitoria por oclusión de la arteria cerebral media (OACM) se demostró que la administración de EAE al inicio de la reperfusión reduce el área de infarto hasta un 70%. Esta protección se correlaciona con una disminución del estrés oxidante; probablemente asociado a las propiedades antioxidantes de uno de sus principales componentes, la S-alilcisteína. En el presente trabajo se propuso evaluar el efecto del EAE y SAC sobre la activación de Erk1/2 y Akt en un modelo de isquemia cerebral. Para lo que se indujo isquemia por OACM a ratas macho de la cepa Wistar durante 2 horas. Se administró el EAE (360 mg/Kg peso; *i.p.*) o SAC (300 mg/Kg peso; *i.p.*) al inicio de la reperfusión y las ratas se sacrificaron a las 2 y 4 horas. Los niveles de Erk1/2 y Akt total y fosforilada se determinaron por ensayos de inmunodetección en fase sólida en extractos de corteza frontoparietal. La administración del EAE provocó un incremento en la expresión de Erk 1/2 en condiciones normales, el mismo efecto fue observado con isquemia/reperfusión, al administrar la SAC en animales con la patología, notamos una disminución en la expresión de la cinasa, estos efectos se observaron en un tiempo de 2I/2R. Los niveles de fosforilación de Erk 1/2 no presentaron cambios a 2I/2 y 4 horas de reperfusión. El daño al igual que el EAE y la SAC no presentaron alteraciones en el nivel total y de fosforilación de Akt. Sugerimos que en el modelo de OACM en ratas de la cepa Wistar a 2I/2R el EAE no ejerce efecto sobre la activación de Erk 1/2 y Akt ya que la activación de las cinasas se presenta en los primeros minutos de daño.

**Palabras Clave.** Isquemia/reperfusión, extracto de ajo envejecido, S-alilcisteína, Erk 1/2, Akt

## ABSTRACT.

Ischemic cerebrovascular disease is pathology with high rate of morbidity and mortality worldwide. During cerebral ischemia activates the hypoxia-inducible factor (HIF), which is sensitive to oxidative stress, HIF activates Erk1/2 and Akt as mechanism of cell survival, however, overactivation of these pathways has been associated with cell death. Aged garlic extract (AGE) has antioxidant properties, which regulate the redox state and consequently the activation of these and other signaling pathways. In a model of transient ischemia by occlusion of middle cerebral artery (MCAO) was determined that administration of AGE at the beginning of reperfusion reduces infarct area to 70%. This protection is correlated with decreased oxidative stress, probably associated with the antioxidant properties of its main components, the S-allylcysteine. In the present study was evaluated the effect of AGE and SAC on the activation of Erk1/2 and Akt in a model of cerebral ischemia. Ischemia by MCAO ischemia was induced in male rats of the Wistar strain for 2 hours. AGE was administered (360 mg/Kg weight *i.p.*) or SAC (300 mg/Kg weight *i.p.*) at the start of reperfusion and the rats were sacrificed at 2 and 4 hours. The levels of Erk1/2 and total and phosphorylated Akt were determined by immunoblotting assays in solid phase in frontoparietal cortex extracts. The administration of AGE caused an increased expression of Erk 1/2 in normal conditions, the same effect was observed with ischemia/reperfusion, by administering the SAC in animals with the disease, we observed a decrease in the expression of the kinase, these effects were observed in a time of 2I/2R. Phosphorylation levels of Erk 1/2 did not change 2I/2 and 4 hours of reperfusion. Damage like the AGE and the SAC no alterations in the total level of Akt phosphorylation. We observed that AGE does not affect the activation of Erk 1/2 and Akt, because the activation of kinases occurs in the first minutes of injury

**Keywords.** Ischemia/reperfusion, aged garlic extract, S-allylcysteine, Erk 1/2, Akt



## I. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad cerebral isquémica se encuentra dentro de las primeras cinco causas de muerte a nivel mundial. La isquemia es una patología en la cual existe una disminución del flujo sanguíneo en una región cerebral. Para evitar la muerte neuronal, este evento debe ir seguido tras un periodo breve, de la restauración del flujo sanguíneo, el cual se denomina, reperfusión.

Debido a la reducción del aporte sanguíneo, los principales combustibles del cerebro, oxígeno y glucosa, disminuyen significativamente (Nuñez-Figueroa *et al.*, 2007). La isquemia cerebral (IC) se torna grave en el núcleo isquémico, donde la irrigación sanguínea es prácticamente nula, mientras que en la periferia la disminución del flujo es menor, gracias al aporte sanguíneo de arterias colaterales y se establece un anillo denominado área de penumbra, en el cual la presencia de la sobreexpresión del glutamato, la alteración intracelular del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), pérdida de la permeabilidad de la membrana y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) influyen negativamente al provocar una falla energética. Así mismo, la reoxigenación durante la reperfusión espontánea o trombolítica proporciona oxígeno como un sustrato de numerosas reacciones enzimáticas de oxidación principalmente en la mitocondria, provocando un ambiente oxidante para la célula (Arango-Davila, *et al.*, 2004; Chan, 2001).

En el proceso de isquemia/reperfusión (I/R), gran parte del daño se debe a estrés oxidante (EO), la producción de EROs y de nitrógeno causan daño al DNA, a las proteínas y a los lípidos, que finalmente conducen a muerte por apoptosis (Martindale y Holbrook, 2002; Lakhani *et al.*, 2009; Scherz-Shouval y Elazar., 2010). Entre las EROs destacan superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), mientras que las especies reactivas de nitrógeno incluyen óxido nítrico, dióxido de nitrógeno y trióxido de dinitrógeno.

Na *et al.*, (2008) observaron que el factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2) es responsable de la regulación de elementos de respuesta a antioxidantes que

incrementan la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes de fase II (Shah *et al.*, 2007), como la NAD quinona oxidoreductasa-1, la glutatión S-transferasa, la ligasa de glutamato y cisteína (GCLC), y la hemo-oxigenasa 1. Además, observaron que la proteína Erk 1/2 participa en la activación de Nrf2, el cual al participar en la expresión de genes de enzimas antioxidantes promueve la remoción de EROs en el entorno. La fosforilación de Erk 1/2 en IC podrían disminuir el ambiente oxidante a través de la inducción del factor Nrf2.

En un proceso isquémico Erk1/2 es activada (Jiang *et al.*, 2002), por el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Hardingham *et al.*, 2001), o por la activación de factores de crecimiento, que responden al EO (Martindale, y Holbrook., 2002) regulando la supervivencia celular.

Erk 1/2, participa en procesos de apoptosis (Miao *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2002). Además se ha observado que esta proteína participa ejerciendo un efecto protector al regular la expresión de la proteína Bcl-2. Esta es una proteína antiapoptótica que participa en supervivencia frente a daño isquémico. Erk 1/2 induce la expresión de Bcl-2 a través, de la activación del factor de transcripción CREB. Además, Erk1/2 puede activar la proteína cinasa SRK, un potente activador de CREB (Jiang *et al.*, 2002). Se ha demostrado en ratones isquémicos que el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1) activa a Erk1/2, con lo cual, la cinasa fosforila a la proteína Bad (proteína pro-apoptótica) en la serina<sup>112</sup> provocando su liberación de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, y creando un sitio de unión en Bad para la proteína chaperona 14-3-3. Bad es atrapada en el citosol interrumpiendo su participación en la apoptosis, por ejemplo, al inhibir la activación de la caspasa-3. Además, se ha observado que RSK, puede actuar directamente sobre la fosforilación de Bad brindando un mayor efecto protector ante el daño isquémico (Zhu *et al.*, 2002).

Por otro lado en isquemia, la proteína cinasa Akt, puede ser activada por receptores de glutamato tipo NMDA debido a la acumulación de  $Ca^{2+}$  (Jiang *et al.*, 2002; Miao *et*

*al.*, 2005; Barrera–Ocampo *et al.*, 2008), y por factores de crecimiento como TGF- $\beta$  (Zhu *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2002).

Akt al igual que Erk1/2, puede fosforilar a las proteínas Bad y Bim, inactivando su función pro-apoptótica, y de esta forma favoreciendo la sobrevivencia celular (Datta *et al.*, 1997). La proteína Akt también se ha visto implicada en la activación del factor Nrf2, y su consecuente unión a elementos de respuesta a antioxidantes proporcionando una defensa ante el EO. En células epiteliales mamarias MCF10A, Nrf2 bajo el estímulo de la epigallocatequina 3-galato, indujo la expresión de enzimas antioxidantes, posiblemente a través de la activación de Akt y Erk 1/2 (Na *et al.*, 2008). Adicionalmente se ha demostrado que Akt participan en la vía de señalización que activa al factor inducible de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) (Li *et al.*, 2007). HIF-1 $\alpha$  posee varios genes blanco que se activan en IC. Se ha visto que ejerce un efecto benéfico al regular la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular el cual participa en angiogénesis (Li *et al.*, 2007); además, HIF-1 $\alpha$  se asocia con un incremento en la expresión de los mRNAs de GLUT-1 y GLUT-3, cabe destacar que en isquemia existe un ambiente hipoglucémico, y que el aumento en la expresión de los transportadores de glucosa se relaciona con protección celular al favorecer una mayor captación de glucosa (Gómez-Martínez, *et al.*, 2010; Wilson y Poellinger, 2002).

Las células poseen un sistema de defensa al inducir la expresión de enzimas antioxidantes, que se activan en situaciones de daño. En I/R, la generación de EROs rebasa la capacidad de dichas enzimas, por lo cual es importante encontrar un compuesto que participe eliminando el ambiente negativo redox o que logre promover la expresión de genes que codifiquen para enzimas antioxidantes, como por ejemplo, la epigallocatequina 3-galato que induce la expresión de antioxidantes a través de la activación de Erk 1/2 y Akt (Na *et al.*, 2008). Las propiedades curativas del ajo (*Allium sativum*) han sido observadas a lo largo de la historia debido precisamente a su potente acción antioxidante que neutraliza las EROs, así como incrementando la producción de enzimas antioxidantes como la catalasa, la glutatión

peroxidasa, e inhibiendo la liperoxidación lipídica en IC (Borek C, 2001). El ajo tiene un alto contenido de compuestos azufrados que pueden provocar malestares gastrointestinales, principalmente la alicina, que le da su sabor y olor característicos. El extracto de ajo envejecido (EAE) no posee las características irritantes pero si conserva su poder antioxidante, debido a que en el proceso de añejamiento se concentran dos de sus principales componentes, la S-alilcisteína (SAC) y la S-alilmercaptocisteína (Borek C., 2001; Cruz *et al.*, 2007; Borek C, 2006). Se ha demostrado que el EAE disminuye la presión arterial y protege las células de los efectos nocivos de la IC, aumentando la supervivencia debido a su alto nivel de antioxidantes (Borek, 2006). Utilizando un modelo de ratas, se demostró que el EAE reduce el volumen de infarto y que el tratamiento con SAC actúa sobre las EROs. La SAC disminuye la muerte neuronal tras la IC y aumenta de la supervivencia de células en el hipocampo, en un 30% (Borek, 2006). En un estudio realizado por Aguilera, *et al.* (2010), se observó que la administración del EAE vía intraperitoneal (*i.p*) al inicio de la reperusión en ratas macho de la cepa Wistar y sometidas a 2 horas de IC disminuye el daño hasta en un 70%; así mismo, se determinó que el efecto protector del EAE es transitorio. Gómez-Martínez, *et al.*, (2010) demostraron que el EAE y la SAC en IC, es promueven la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3, lo cual podría estar relacionado con una mayor captación de glucosa y por lo tanto con disminución del daño. Además observaron que la terapia participa en la inducción de la subunidad catalizadora de la ligasa de glutamato y cisteína (GCLC) que interviene en la síntesis de glutatión, factor clave para la remoción de EROs.

Se desconoce si el EAE ejerce su efecto neuroprotector al regular la activación de moléculas clave para supervivencia celular como Erk 1/2 y Akt. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del EAE y la SAC en la expresión y activación de Erk1/2 y Akt en un modelo de I/R *in vivo*.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Materiales**

Aged garlic extract Kyolic<sup>®</sup> (EAE) fue obtenido de Wakunaga of America Co., Ltd (Mission Viejo, CA, USA). Anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti Akt/PKB, dominio PH de Millipore (Cat. 05-591). Anticuerpo anti fosfotirosina. Anticuerpo policlonal de conejo anti phospho-ERK 1/2 (Thr2002/Tyr204) de Chemicon Internacional (Cat. AB3826). Anticuerpo monoclonal de ratón anti MAP kinase (ERK1+ERK2) de ZYMED laboratorios (Cat. 13-6200). Anticuerpo de burro anti IgG (H+L) de ratón conjugado con peroxidasa y anticuerpo de burro anti IgG (H+L) de conejo conjugado con peroxidasa, ambos de Jackson ImmunoResearch laboratorios. Sustrato de quimioluminiscencia (Immobilon Western Chemiluminiscent HRP substrate) de Millipore Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA).

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 270-350 g de masa corporal procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 horas luz/oscuridad) y tuvieron libre acceso a alimento y agua (Dieta comercial, Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc, Richmond, IN).

### **Modelo de Isquemia cerebral**

Se indujo IC focal transitoria por oclusión de la arteria cerebral media (OAMC) empleando el método propuesto por Longa *et al.* (1989). Las ratas se anestesiaron en una cámara de halotano al 2%, posteriormente se realizó una incisión a la altura de la horquilla esternal para localizar la arteria. La oclusión de la ACM se logró insertando un microfilamento de nylon (17 mm longitud y 0.24 mm de diámetro).

Después de 2 horas de isquemia, el filamento se removió y las ratas fueron sacrificadas a diferentes tiempos de reperfusión (2 y 4 horas).

### **Evaluación del déficit neurológico.**

La evaluación del déficit neurológico se realizó 30 minutos antes de la reperfusión. Las pruebas que se efectuaron son: la flexión de la extremidad anterior, motilidad espontánea, reflejo de agarrar, la prueba de barras horizontales, y la prueba de dirección del movimiento. Los hallazgos neurológicos se calificaron en una escala de cinco puntos. Cero fue asignado para la ausencia y 1 para la presencia de deterioro en cada una de las pruebas; la suma de las puntuaciones obtenidas en cada prueba se utilizó para establecer el grado de déficit neurológico (adaptado de Longa *et al.*, 1989; Modo *et al.*, 2000).

### **Tratamiento**

Se administró una dosis de 360 mg/kg de EAE (1.2 mL/Kg *i.p.*) y de SAC (300 mg/Kg *i.p.*) 2 horas después de la isquemia y antes de iniciar la reperfusión. Los animales se sacrificaron por decapitación a las 2 y 4 horas después de la reperfusión. Posteriormente, se realizó la extracción del cerebro para obtener las muestras de corteza frontoparietal y se mantuvieron en congelación (-20°C)

### **Extracción de proteínas y cuantificación**

Las muestras de corteza se homogenizaron mecánicamente con un pistilo de teflón en 1 mL de amortiguador de lisis 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) conteniendo inhibidores de proteasas (1:100) y fosfatasas (1:100). La cuantificación de proteínas se realizó en 20 µL del homogenizado por el método de *Lowry et al.* (1951). Se emplearon 100 µg de proteína (aproximadamente 600 µL del homogenizado) para determinar la expresión total de Erk 1/2 y Akt, para ello se mezclaron 1:1 con amortiguador de carga (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris HCl) y se colocó en ebullición durante 5 minutos. La muestra se guardó a -20°C hasta su uso.

### **Ensayo de inmunoprecipitación para Akt.**

Se realizó inmunoprecipitación empleando columnas siguiendo las instrucciones del fabricante (SIGMA). Las muestras homogenizadas se agregaron en una columna con 4µL de anticuerpo anti-Akt y se completó un volumen final con 600 µL de amortiguador 1X IP. Se incubó toda la noche a 4°C. Después de la incubación, se agregaron las perlas de la proteína G al lisado celular, posteriormente se incubaron por 2 horas a 4°C, mezclando la muestra por inversión. Se realizó una centrifugación a 12.000 x g durante 30 segundos a 4° C en 700 µl amortiguador de 1X IP (6 lavados). El último lavado, se realizó con amortiguador 0,1X IP.

### **Preparación de la muestra de Inmunoprecipitación para SDS-PAGE**

Se centrifugó la columna a 12.000 x g durante 30 segundos a -4° C. Se añadieron 60 µl del amortiguador de muestra 1X Laemelli. Se mezcló suavemente. Posteriormente, la muestra se transfirió a un bloque de calefacción precalentado a 95°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 12.000 x g durante 30 segundos. El líquido obtenido se guardó a 20°C hasta el momento de su uso.

### **Nivel de fosforilación de Erk1/2 y Akt por Western blot.**

Las muestras (100 µg de proteína) se corrieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se realizó empleando voltaje constante (150 Voltios). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa empleando corriente constante (350 miliamperes) durante 1 hora. Las proteínas inespecíficas de la membrana fueron bloqueada con leche al 1%/Tween-20 al 0.01% en PBS. Los anticuerpos primarios (Erk 1/2 total, Akt total, anti phospho-Erk1/2 o anti phospho-Akt y Actina) se incubaron toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con 50 mL de leche al 0.25%/Tween-20 al 0.01% en PBS y tres con leche al 0.25% en PBS. Se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo secundario a 4°C (anti IgG conjugado con peroxidasa). Se realizaron los lavados de la forma antes mencionada. La señal específica se detectó por quimioluminiscencia.

### **Consideraciones éticas y de bioseguridad.**

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a las normas de ética y de seguridad del “Instituto Nacional de Salud, Guía para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio”, así como con “Guía Local sobre el Uso Ético de Animales de Experimentación” y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental -Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

### **Análisis estadístico.**

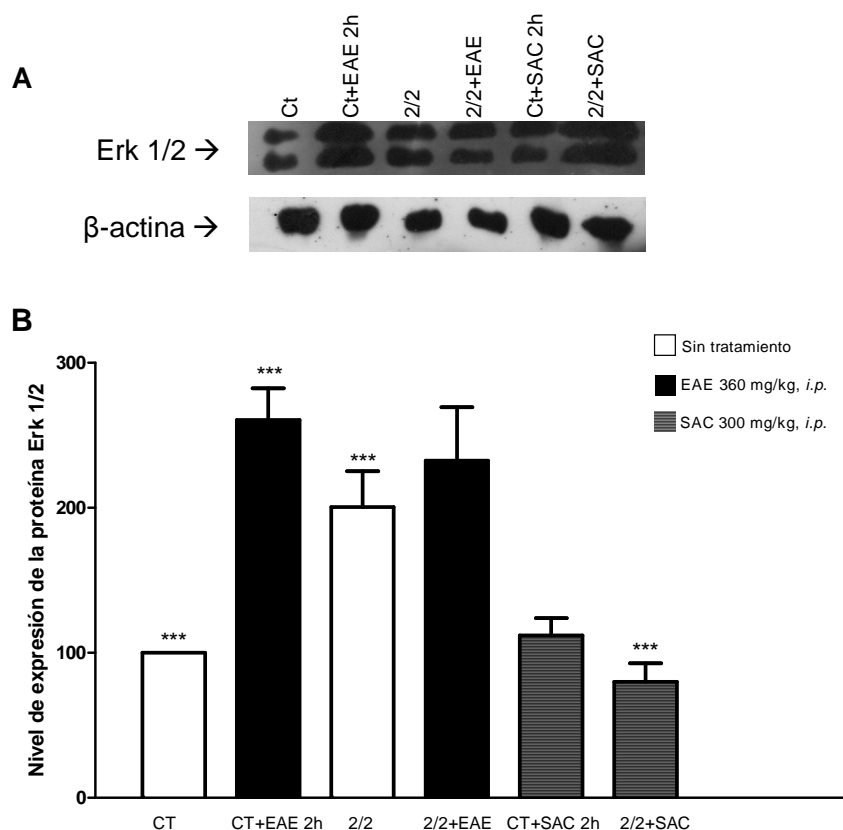
Se obtuvo media +/- desviación estándar de los resultados y se realizaron el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguido de la prueba de Tuckey. Un valor  $P < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.



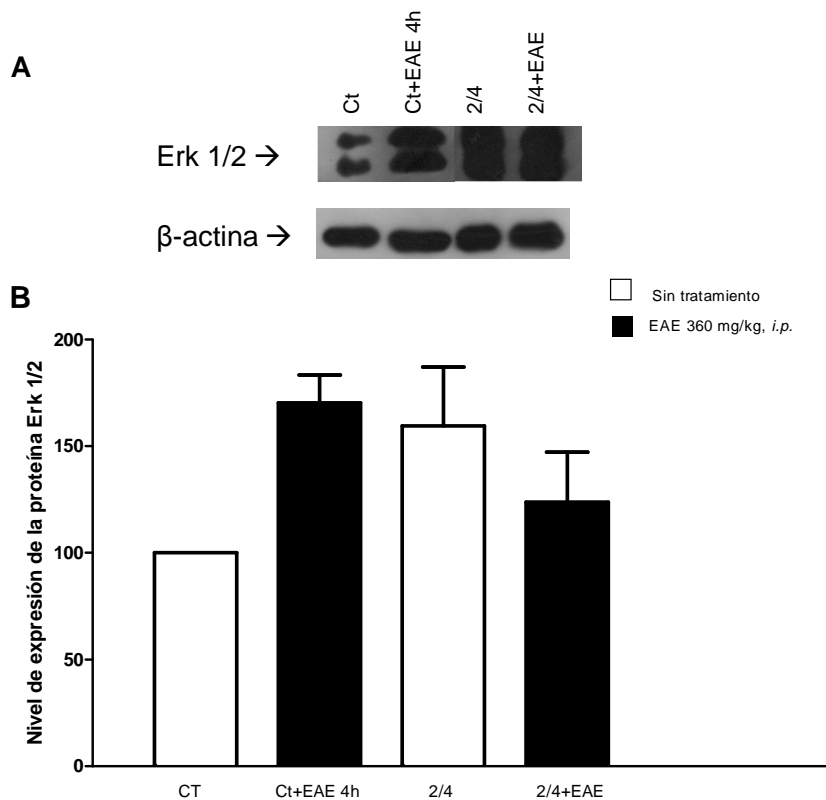
### III. RESULTADOS

#### El EAE incrementa la expresión de Erk 1/2 en IC.

Para determinar el efecto de la I/R y el tratamiento con antioxidantes a diferentes tiempos se midió la expresión de Erk 1/2 por Western blot, los animales se sometieron a 2 horas de IC, antes de la reperfusion se administró el EAE o la SAC, se sacrificaron después de 2 horas (Fig. 1A, 1B). Se emplearon dos grupos: 1) con animales sacrificados después de 2 horas de reperfusion (Fig. 1A, 1B) y 2) sacrificados a las 4 horas de reperfusion (Fig. 2A, 2B).



**Figura 1.** Efecto del EAE y la SAC sobre la expresión de Erk 1/2 a las 2 horas. En el panel 1A se observa la expresión de Erk 1/2 en condiciones normales (CT: carril 1); Expresión de Erk 1/2, bajo tratamiento con EAE y SAC, sin IC (carril 2 y 5 respectivamente); Expresión de Erk 1/2 en ratas 2I/2R (carril 3); con daño 2I/2R y tratamiento con EAE (carril 4); con daño y tratamiento con SAC (carril 6). En el panel B se muestra el análisis densitométrico de la figura 1A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tuckey \*\*\* $p < 0.0001$ .

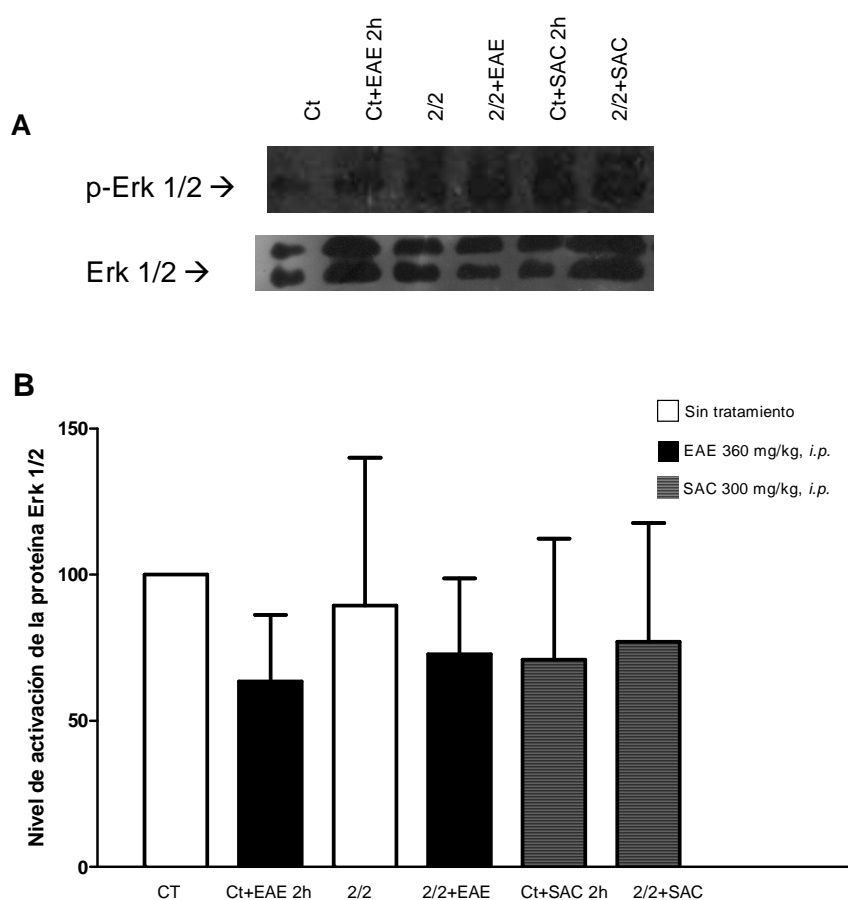


**Figura 2.** Western blot analizando la expresión de Erk 1/2 y el efecto del EAE y la SAC. En el panel 2A se observa la expresión de Erk 1/2 en condiciones normales (CT: carril 1); Expresión de Erk 1/2, bajo tratamiento con EAE, sin IC (carril 2); Expresión de Erk 1/2 en ratas 2/4R (carril 3); con daño 2/4R; Expresión de Erk 1/2 en animales con el daño y tratamiento con EAE (Carril 4). Panel B muestra el análisis densitométrico de la figura 2A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.

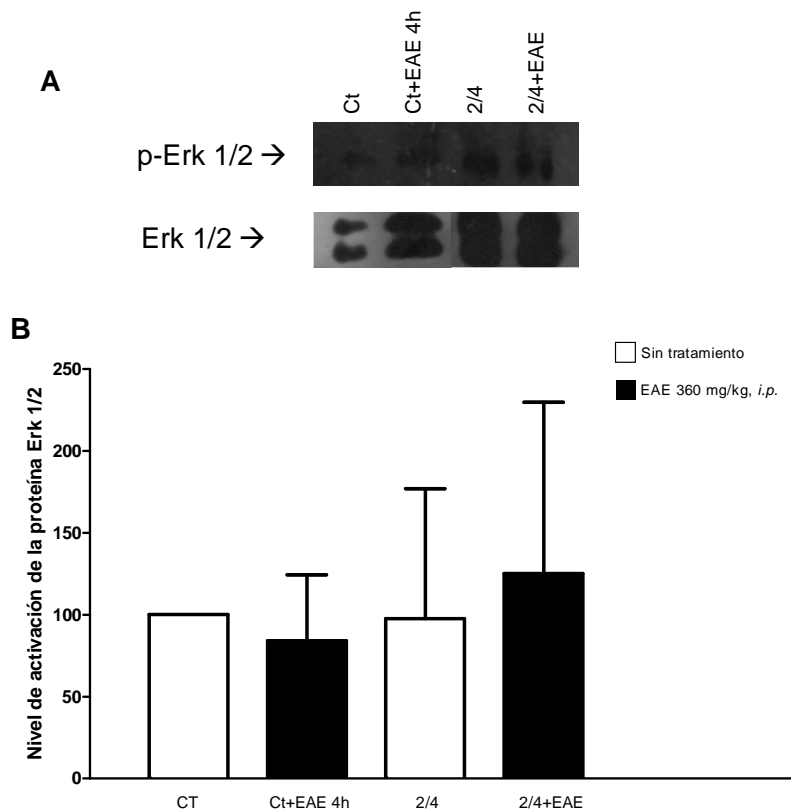
Observamos que en los animales control tratados durante 2 horas con EAE se incrementa la expresión de Erk 1/2 ( $p < 0.001$ ), la I/R también provocó un incremento en la expresión de la cinasa ( $p < 0.0001$ ). Al administrarse el EAE en ratas sometidas a OACM, se observó que la expresión de Erk 1/2 no se modifica con respecto a los animales con daño sin tratamiento. Por otra parte, los animales tratados con SAC presentaron una disminución en la concentración de Erk 1/2 ( $p < 0.0001$ ) con respecto a los animales sometidos a la IC sin tratamiento (Fig. 1A, 1B). Para determinar el si el tiempo es un factor importante sobre el aumento en la expresión de Erk 1/2, decidimos evaluar el papel que tendría la terapia en la expresión de Erk 1/2 con 4 horas de reperusión. Como se muestra en la Figura 2A, 2B la expresión de Erk 1/2 no demostró un cambio significativo después de este tiempo de reperusión.

### El tratamiento con el EAE y la SAC no alteran el nivel de fosforilación de Erk 1/2.

En la IC la activación de las cinasas Erk 1/2 se encuentran implicadas en eventos de protección al inactivar proteínas proapoptóticas. Para determinar si el EAE y su componente mayoritario, la SAC, ejerce un efecto en el nivel de activación de Erk 1/2 decidimos evaluar la fosforilación de estas cinasas en condiciones normales y bajo tratamiento por ensayos de Western blot.



**Figura 3.** Fosforilación de Erk 1/2 con I/R bajo el tratamiento con SAC y EAE. En el panel 3A se observa la fosforilación de Erk 1/2 en condiciones normales, animales sanos (CT: carril 1); Fosforilación de Erk 1/2 en animales sanos administrando EAE y SAC y sacrificados después de 2 horas de los tratamientos (carril 2 y 5 respectivamente); Fosforilación de Erk 1/2, (carril 3); en animales con daño (2I2R) y tratamiento con EAE (carril 4); y SAC (carril 6). Panel B muestra el análisis densitométrico de la figura 3A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.



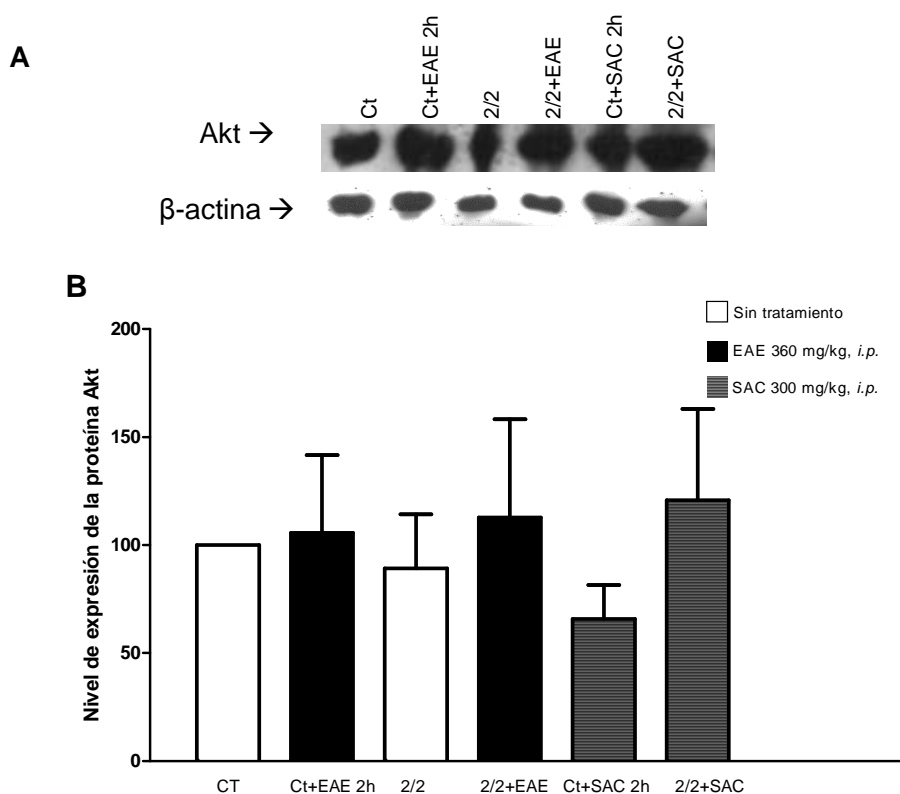
**Figura 4.** Activación de Erk 1/2 evaluando el tratamiento del efecto del EAE. Panel 4A, fosforilación de Erk 1/2 en condiciones normales (CT: carril 1); Fosforilación de Erk 1/2, bajo tratamiento con EAE, sin IC (carril 2); Fosforilación de Erk 1/2 en ratas con daño, 2I/4R (carril 3); Efecto del EAE en animales con daño 2I/4R (carril 4). Panel B muestra el análisis densitométrico de la figura 4A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.

A 2I/2R no existen cambios significativos en la activación de Erk 1/2 en los animales control, así como en aquellos en los que se indujo la patología. Tampoco se observaron cambios al administrar el tratamiento. Se observó el mismo efecto con el tratamiento con el EAE y la SAC (Fig. 3A, 3B).

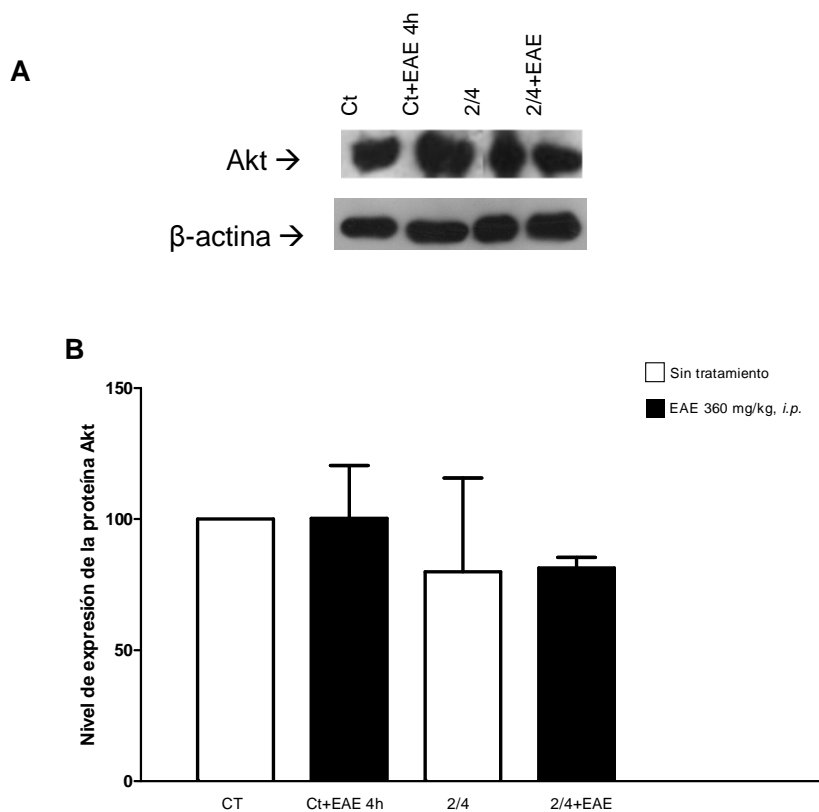
Para comprobar si la activación de Erk 1/2 disminuye con el tiempo, decidimos evaluar la fosforilación de la cinasa con 4 horas de reperusión. En nuestro estudio observamos que después de 4 horas de reperusión no existen cambios en la fosforilación de Erk 1/2, ni tampoco se ve afectada al administrarse el EAE (Fig. 4A, 4B).

### El EAE y la SAC no afectan la expresión de Akt a 2I/2R y 2I/4R.

Para determinar si el tratamiento con EAE y SAC ejercen cambios en la expresión de Akt (Fig. 5A, 5B), muestras de corteza frontoparietal de ratas sometidas a 2 horas de ischemia y 2 horas de reperfusión, se analizaron por medio de Western blot. En otro grupo de estudio, se analizó el efecto del EAE con 4 horas de reperfusión (Fig. 6A, 6B). Se observó que el EAE y la SAC no producen un efecto significativo en la expresión de Akt en los tiempos que se emplearon en el estudio.



**Figura 5.** Expresión de Akt en IC bajo el tratamiento de EAE y SAC. En el panel A se observa la expresión de Akt en ratas con condiciones normales (CT: carril 1); Akt en animales sanos bajo el tratamiento de EAE y SAC (carril 2 y 5 respectivamente); Akt en ratas con daño, 2I/2R (carril 3); tratamiento con EAE (carril 4); y SAC (carril 6). El panel B se muestra el análisis densitométrico de la figura 1A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.

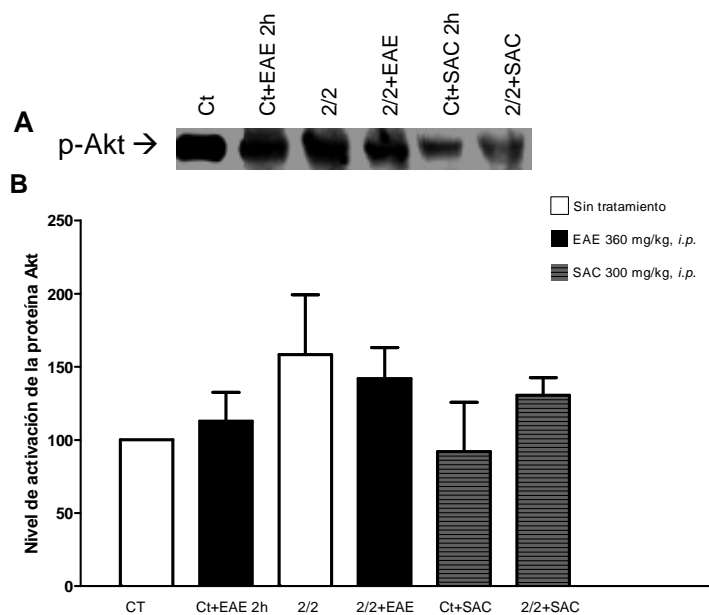


**Figura 6.** Efecto del EAE en la expresión de Akt, en isquemia. En el panel A se observa la expresión de Akt en condiciones normales (CT: carril 1); Expresión de Akt en animales sin daño analizando la expresión de Akt con EAE (carril 2); Expresión de Akt en ratas con 2I/4R (carril 3); Expresión de Akt con 2I/4R y tratamiento con EAE (carril 4). El panel B se muestra el análisis densitométrico de la figura A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.

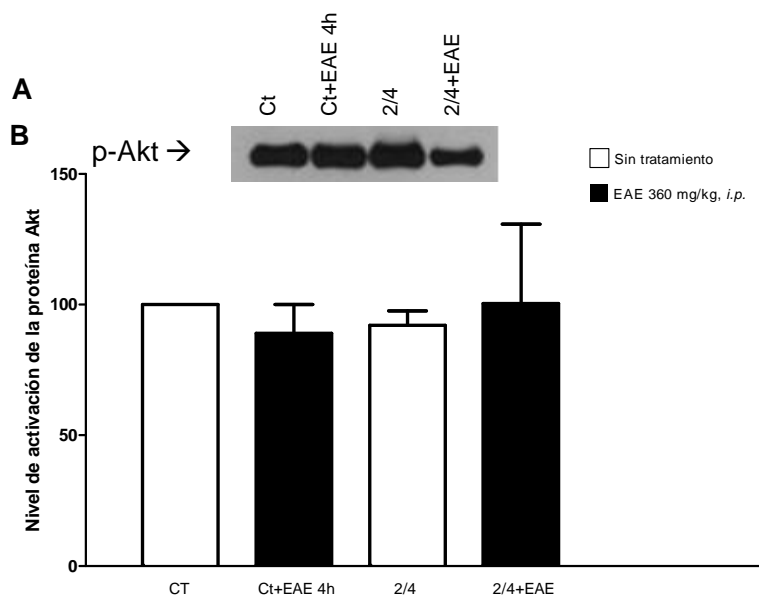
La evaluación del grupo de estudio al cual se le provocó el daño isquémico mostró que no existen cambios significativos en la expresión de Akt comparados con el grupo control. Estos resultados se mantuvieron al administrar las terapias a las 2 y 4 horas de reperfundión.

### **Evaluación de la fosforilación de Akt con EAE y SAC.**

Anteriormente se ha demostrado que las EROs participan en la activación de Akt (Wang et al., 2000), basándonos en estas evidencias nosotros decidimos evaluar el efecto antioxidante del EAE y la SAC sobre la fosforilación de esta proteína. Los resultados indicaron que las terapias no poseen ningún efecto en el nivel de fosforilación de Akt en ratas sometidas a 2I/2R (Fig. 7A, 7B) y 2I/4R. (Fig. 8A, 8B).



**Figura 7.** Activación de Akt con EAE y SAC con 2I/2R. En el panel A se observa la fosforilación de Akt en animales sanos (CT: carril 1); fosforilación de Akt bajo tratamiento con EAE y SAC, sin daño (carril 2 y 5 respectivamente); activación de Akt con 2I/2R (carril 3); Animales con daño 2I/2R y EAE (carril 4); y con SAC (carril 6). En el panel B se observa el análisis densitométrico de la figura A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.



**Figura 8.** Activación de Akt con 2I/4R utilizando EAE. En el panel 8A podemos observar el nivel de fosforilación de Akt en condiciones normales (CT: carril 1); con EAE sin IC (carril 2); Akt con daño por I/R (carril 3); 2I/4R y tratamiento con EAE (carril 4). El panel B muestra el análisis densitométrico de la figura A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100% el resultado obtenido del animal sano. ANOVA de una vía.

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La isquemia es una patología de interés mundial debido a los altos índices de mortalidad y morbilidad que se presentan anualmente; aunque los eventos moleculares implicados son identificados no existe una terapia efectiva. En la actualidad solo se cuenta con un tratamiento aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos. Este es la administración del activador tisular de plasminógeno, el cual es un agente fibrinolítico capaz de lisar la fibrina del trombo. Sin embargo su eficacia depende de que se administre dentro las primeras 3 horas en que se presenten los síntomas de la IC (Nicole O *et al.*, 2001).

En I/R, gran parte del daño se produce por EO (Lakhan *et al.*, 2009). El EAE contiene compuestos liposolubles que incluyen la SAC, S- alilmercaptocisteína, el sulfuro de dialilo, el sulfuro de trialil, el disulfuro de dialilo y polisulfuros de dialilo, que muestran efectos antioxidantes, al igual que los compuestos fenólicos como la alixina, el glutamato N-fructosilo, la arginina, el N-fructosilo y el selenio (Borek 2001). Específicamente se ha determinado que el tratamiento con SAC disminuye los niveles de peroxidación lipídica mitocondrial (evitando la liberación de citocromo C) así como el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, restaura el contenido de ATP y disminuye la concentración de Ca<sup>2+</sup>, así como el edema cerebral en un modelo de IC focal en rata (Atif *et al.*, 2009).

En este mismo modelo, Aguilera *et al.*, (2010) encontraron que el EAE brinda protección después de 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión al actuar como acarreador de EROs.

Por lo tanto el EAE debido a su propiedad antioxidante puede regular las concentraciones aumentadas de EROs, en IC estas especies alteran moléculas importantes en la sobrevivencia y proliferación celular como son las proteínas Erk 1/2 y Akt, sin embargo se desconoce el mecanismo específico por el cual lo hacen. Se conoce que la activación de Erk 1/2 puede participar en la activación de la cisteína



proteasa calpaina, implicada en apoptosis, lo cual se observó al detectar productos de proteólisis de fodrina, una proteína del citoesqueleto (Wang *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2008; Blomgren K *et al.*, 1995).

Contrario a esto, se ha reportado que Erk 1/2 participa en neuroprotección en isquemia, al ser activada por factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 1, el cual favorece la activación de Erk 1/2. Esta cinasa participa en la fosforilación de la Rsk1, dicha interacción favorece la protección de las células al suprimir la activación de proteínas implicadas en apoptosis como la caspasa 3 y la proteína Bad (Zhu *et al.*, 2002).

En esta controversia se desconoce cuáles son los eventos que determinan si la vía Erk activará la muerte celular o la sobrevivencia. Sin embargo se sabe que la cinética de activación de la enzima (en qué momento y durante cuánto tiempo se activa) es un factor clave en este proceso (Martindale y Holbrook., 2002). En situaciones en las que Erk promueve la supervivencia, la activación se produce transitoria y rápidamente. Por ejemplo, en células de hepatocitos expuestas a 600  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la activación de Erk 1/2 se observa en un lapso de 30 a 60 minutos, y la activación de Akt después de 30 minutos de exposición (Ikeyama *et al.*, 2000). Wang *et al.* (2003) trabajando en un modelo de hipoxia-isquemia con la corteza parietal (incluyendo hipocampo) y el diencefalo (tálamo, hipotálamo y estriado), observaron un incremento en la fosforilación de Erk 1/2, en la fracción nuclear después de 30 minutos y hasta 1 hora después de hipoxia-isquemia.

Por otro lado Erk 1/2 induce muerte celular cuando su activación es tardía y prolongada. Al estimular células HT22 (línea celular de hipocampo) y cultivos de neuronales corticales con glutamato (5 mM), se observa una sobreactivación de Erk 1/2 de 6 a 9 horas después del tratamiento, evento que se relacionó con muerte celular inducida por toxicidad. Al utilizar el inhibidor U012 (10  $\mu$ M) de MEK-1/2, se observa que se previene la toxicidad causada por el glutamato. El glutamato induce el incremento de EROs (esto se correlaciona con el hecho de que el glutamato participa en la eliminación de glutatión). La activación de Erk 1/2 requiere de la participación del metabolito del ácido araquidónico, la 12-lipooxigenasa, la cual es un

blanco de acción de EROs y favorece la formación de peróxidos, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y finalmente la muerte celular (Stanciu *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1998).

En nuestro modelo de estudio, observamos que cuando se administra el EAE aumenta la expresión de las proteínas Erk 1/2 en condiciones normales, como se mencionó, dichas proteínas participan en procesos de diferenciación y proliferación celular (Fukunaga, y Miyamoto., 1998). Sumi *et al* (2001), reportaron que el tratamiento con EAE en cultivos celulares de neuronas corticales puede tener efectos neurotróficos al aumentar la sobrevivencia celular. Considerando este efecto, sugerimos que en condiciones normales, el EAE activa la expresión de Erk 1/2 al activar genes que participan en su regulación como la proteína activadora 1 (AP-1) (Tsai *et al.*, 2007). La participación del EAE como regulador de la expresión de genes ha sido documentado por Sumi *et al* (2001), quien reportó el aumento en los niveles de transcripción de cuatro genes en cultivos de neuronas de hipocampo, aunque no lograron identificar en su totalidad de que genes se trataban, define que un gen pertenecía a la proteína relacionada con  $\alpha 2$ -microglobulina. Gómez-Martínez *et al* (2010) demostraron que el tratamiento de EAE y SAC en un modelo de OACM en rata, incrementa la expresión de la GCLC y de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT 3, reduciendo el daño provocado por isquemia probablemente al favorecer una mayor captación de glucosa.

En nuestro modelo de estudio, la IC incrementa la expresión de Erk 1/2, quizás en respuesta al ambiente oxidante que produce durante esta condición. Sin embargo al analizar la expresión de la cinasa con el daño y el tratamiento no encontramos cambios. Por lo que el EAE no ejerce un efecto sobre la expresión de Erk 1/2 en nuestro modelo de estudio, podría ser que se requieran dosis más altas de tratamiento y tiempos diferentes de análisis, ya que cuando utilizamos la SAC a una concentración 1000 veces mayor, observamos que el tratamiento con este componente mayoritario regula el nivel de expresión de Erk 1/2 hasta condiciones normales, puede ser que a estos tiempos la SAC participa regulando diversas moléculas en IC, como lo demuestra Atif *et al* (2009) en donde utilizando un modelo de IC por OACM y administrando 300 mg/Kg de SAC 15 minutos antes del daño y 2

horas después de la oclusión, notaron que la SAC restauraba el contenido los niveles de glutatión, de ATP y los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, además de que disminuía los niveles de citocromo C, de la lipoperoxidación lipídica, y los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aunque se desconoce el papel directo de SAC sobre la expresión de Erk 1/2, la regulación podría ser a través de la disminución de EROs, que se ha visto participan en la sobreactivación de la vía.

En el tiempo de 2l/4R no logramos detectar cambios en la expresión de Erk 1/2, esto puede ser debido a que el mayor efecto del EAE se presenta dentro de las primeras 2 horas de reperfusión, sin embargo, al estar buscando un blanco de acción del EAE propusimos estudiar un lapso de tiempo que abarcara las 4 horas de reperfusión ya que a largo plazo se pretende ampliar el tiempo de acción del EAE, y necesitábamos observar el efecto del mismo sobre la activación de la cinasa.

En lo que se refiere a la activación de las Erk 1/2, el EAE no es capaz de regular el nivel de activación cuando existe daño, al menos en los periodos de tiempo que se propusieron en nuestro modelo de estudio, estos resultados coinciden con los reportados por Wu *et al* (2008), quienes en un modelo de IC global, utilizan el alfa-tocoferol que funciona como un acarreador de EROs (4 µl intracerebroventricular) el cual no induce cambios en la expresión de Erk 1/2 a 1 y 6 horas después de la isquemia; sin embargo determinaron que el mayor efecto en la fosforilación ocurre dentro de los primeros 15 minutos y después de 24 horas de daño. Esto sugiere que el uso de antioxidantes si ejerce un efecto en la activación de la cinasa, sin embargo esté se presenta en los primero minutos después de la administración del compuesto, en nuestro estudio el análisis de la fosforilación de Erk 1/2 se realizó después de 2 horas de reperfusión, por lo que el efecto del EAE probablemente no se detectó oportunamente.

En cuanto a la expresión y activación de Akt en nuestro modelo de estudio, la cinasa no presentó cambios significativos al analizarse con el daño y los tratamientos, por lo que se sugiere que las terapias no ejercen un efecto sobre la cinasa en los tiempos estudiados, debido a que se ha visto que las EROs participan en la activación de Akt en los primero 5-30 minutos después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 µM) (Wang *et al.*,

2000), nosotros esperábamos encontrar una sobreactivación de la cinasa con el daño, y al administrar el tratamiento de EAE y SAC la sobreactivación de Akt se regulara. Song *et al* (2008), observaron que la activación de la cinasa aumenta después de 30 minutos de isquemia y 1 hora de reperfusión en corteza y a los 30 minutos de reperfusión en estriado. Por lo que en nuestro estudio el efecto de los tratamientos y del daño sobre Akt pudo no haber sido detectado a tiempo. Sin embargo los tiempos utilizados de 2 horas de isquemia y 2 horas de reperfusión para el análisis de las cinasas se basan en estudios previos en donde se observó que el EAE posee un efecto protector al reducir el área de infarto en este periodo (Aguilera *et al.*, 2010).

Diversas moléculas identificadas como blanco de acción de Akt tienen una función anti-apoptótica. Akt, fosforila a la proteína Bad, y de esta manera inhibe la translocación de Bad a la mitocondria, ya que Bad fosforilada se asocia a la proteína 14-3-3 en el citosol (Datta *et al.*, 1997). La formación del complejo Bad-14-3-3 interrumpe la interacción con el citocromo C, Smac/DIABLO y la activación de caspasas, disminuyendo consecuentemente la muerte por apoptosis (Miyawaki *et al.*, 2008). Un ejemplo similar es que Akt ejerce en presencia de factor-1-que induce la fosforilación de factores de transcripción (FKHRL1), el cual en asociación con la proteína 14-3-3 queda retenido en el citoplasma, evitando su translocación nuclear y la expresión de genes implicados en muerte celular, como el gen del ligando Fas (Brunet *et al.*, 1999). Aquí destaca la importancia de mantener regulada la vía de Akt, ya que su desregulación está implicada en procesos de muerte celular.

Además se ha observado en un modelo de IC por OACM, que la inhibición de Akt provoca una disminución en la fosforilación de dos proteínas que participan en procesos apoptóticos: la glicógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  y la proteína MDM2 (del inglés murine doble minute 2). Demostrando que una disminución en la activación de estas proteínas se relaciona con un incremento en el área de infarto relacionado con muerte celular por apoptosis. Otra observación interesante, en este mismo modelo experimental es que al inhibir a Akt, el nivel de la proteína inflamatoria COX-2 aumenta, así como los niveles de anión superóxido, mientras que la expresión de la

superóxido dismutasa disminuye (Song *et al.*, 2008). Cabe destacar que, estos estudios mostraron tales efectos con 30 minutos de isquemia y 1 hora de reperfusión, regresando a sus niveles basales después de 24 horas.

Cuando nosotros trabajamos con la SAC, la fosforilación de Akt no mostró un cambio significativo, estos resultados podrían deberse a que la SAC podría participar eliminando el EO en los primeros 20 minutos, disminuyendo de esta forma la activación de Akt. Numagami y Ohnishi (2001), usando un modelo de isquemia global en rata inducido por oclusión bilateral de la arteria carótida común, la administración preisquémica de SAC (300 mg/Kg) mejoró el rendimiento motor, redujo el contenido de agua y redujo el tamaño del infarto. Numagami y Ohnishi (2001), trabajaron con un modelo de isquemia global transitoria, analizando el curso temporal de la formación de EROs mediante espectroscopia resonancia paramagnética electrónica. El primer pico de radicales se produjo a los 20 minutos de isquemia y 5 minutos, mientras que el segundo pico se presentó después de 20 minutos de isquemia y 20 minutos después de reperfusión. Aunque la SAC no tuvo efecto en el primer pico, sí se logró observar un efecto 20 minutos después de la administración, esto lo determinaron al medir la cantidad de productos reactivos de ácido barbitúrico como un índice de la peroxidación lipídica.

La activación de Erk 1/2 y Akt en nuestro estudio no presentó cambios significativos al analizarse con la patología y los tratamientos, debido a que la activación de las mismas pudo presentarse en periodos menores a los planteados, sin embargo un factor que pudo influir en la detección de los efectos del tratamiento, podría ser debido a que trabajamos con extractos totales los cuales contienen tanto células neuronales como células gliales, incluyendo astrocitos, que poseen una mayor capacidad de resistencia al daño provocado por la isquemia (Rossi *et al.*, 2007). Durante las primeras fases de la isquemia los astrocitos son capaces de captar el glutamato que las neuronas liberan hacia la hendidura sináptica, lo cual brinda protección a las neuronas contra el ambiente excitotóxico, Sin embargo, debido a

que la conversión de glutamato a glutamina por la glutamina sintetasa en los astrocitos es un proceso dependiente de ATP, y se sabe que en isquemia existe una depleción energética, durante la isquemia severa no se puede reciclar eficientemente el glutamato, por lo que se acumula en el citoplasma de los astrocitos. Si la isquemia persiste, los astrocitos finalmente se despolarizan y liberan el glutamato acumulado, elevando el daño ya existente causado por excitotoxicidad (Rossi *et al.*, 2007).

Las perspectivas de este trabajo es analizar el efecto de la isquemia y reperfusión por separado, así como trabajar con tiempos que abarquen los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos de daño. Esperando encontrar niveles elevados de fosforilación de las cinasas en los primeros 60 minutos de I/R debido a la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En resumen, durante la I/R cerebral las vías de señalización de Erk 1/2 y Akt no presentaron cambios significativos en la fosforilación con los tiempos analizados de 2I/2R y 2I/4R. Aunque se sabe que el EAE es un amortiguador de EROs, en nuestro modelo el efecto protector parece no participar sobre la fosforilación de las cinasas, a los tiempos estudiados. Sin embargo encontramos una disminución significativa en la expresión de Erk 1/2 al trabajar con SAC con 2I/2R, indicando que SAC puede presentar un efecto protector asociado con la regulación de la expresión de Erk 1/2.

## V. REFERENCIAS

- Aguilera P, Cháñez-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(3-4), 241-247.
- Ahmad MS, Pischetsrieder M, Ahmed N. (2007). Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur J Pharmacol*. 561 (1-3), 32-38.
- Arango-Davila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica *Rev Neurol*. 39, 156-165.
- Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. (2009). S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res*. 10(1265), 128-137.
- Barrera-Ocampo AA, Céspedes-Rubio AE, Cardona-Gómez GP. (2008). Mecanismo potencial de neuroprotección y plasticidad sináptica inducidas por el estradiol a través de PI3K/GSK3beta en la isquemia cerebral. *Rev Neurol*. 46, 32-39.
- Borek C. (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*. 1, 1010-1015.
- Borek C. (2006) Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. *J Nutr* 1, 810-812.
- Blomgren K, Kawashima S, Saido TC, Karlsson JO, Elmered A. and Hagberg H. (1995). Fodrin degradation and subcellular distribution of calpains after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res*. 684, 143-149.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96(6),857-868.
- Chan PH. (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21, 2-14.
- Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González DJ, Hernández-Pando R, Maldonado PD, Martínez-Martínez CM, et al. (2007). Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293, 1691-1698.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Fukunaga K, Miyamoto E. (1998). Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol.*16(1):79-95.

Gómez-Martínez, CD., Espinoza-Rojo, M., Chánez-Cárdenas, ME., Maldonado, PD., Órtiz-Plata, A., Aguilera, P. Tesis - El extracto de ajo envejecido y la S-alilcisteína inducen la expresión de los transportadores GLUT-1, GLUT-3 y GCLC en isquemia cerebral. 2010.

Hamanaka RB, Chandel NS. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci.* 35(9), 505-513.

Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H. (2001) A calcium microdomain near NMDA receptors: On switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nature Neurosci.* 4, 565–566.

Ikeyama S, Kokkonen G, Shack S, Wang XT, Holbrook NJ. (2002). Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *FASEB J.* 16(1), 1917–1926.

Jiang Z, Zhang Y, Chen X, Yeung-Lam P, Yang H, Xu Q, et al. (2002). Activation of Erk1/2 and Akt in astrocytes under ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.*294, 726–733.

Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 17, 1-11.

Li, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1997). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron.* 19(2), 453-463.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20 (1) 84-91.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 (1), 265-75.

Martindale JL, Holbrook NJ. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 192(1), 1-15.

Miao B, Xiao-Hui Y, Dong-Sheng P, Quan-Guang Z, Guang-Yi Z. (2005). Neuroprotective Effects of Preconditioning Ischemia on Ischemic Brain Injury through Down-regulating activation of JNK1/2 via N-Methyl-D-aspartate Receptor-mediated Akt1 Activation. *Biochem J* 280 (23), 21693–21699.

Miyawaki T, Mashiko T, Ofengeim D, Flannery RJ, Noh KM, Fujisawa S, et al. (2008). Ischemic preconditioning blocks BAD translocation, Bcl-xL cleavage, and large channel activity in mitochondria of postischemic hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(12):4892-4897.



- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods*. 194, 99-109.
- Murphy MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 417(1), 1-13.
- Na HK, Kim EH, Jung JH, Lee HH, Hyun JW, Surh YJ. (2008). (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 476(2), 171-177.
- Numagami Y, Ohnishi ST. (2001). S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr*. 131, 1100-1105.
- Nuñez-Figueroa Y, Bueno-Pavón V, Montero-Alarcón C, Valdés-Martínez O, Tacoronte-Morales JE, Cabrera-Suarez H. (2007). Potencial aplicación de ratones albinos suizos como biomodelo de isquemia unilateral permanente. Ventajas sobre el Gerbils de Mongolia. *Lat. Am. J. Pharm*. 26 (4),485-489.
- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*.10(11),1377-1386.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z. (2010). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1-9.
- Shah ZA, Li RC, Thimmulappa RK, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, Doré S. (2007). Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury. *Neuroscience*. 147(1), 53-59.
- Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JW, DeFranco DB. (2000). Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem*. 275(16), 12200-12206.
- Song YS, Narasimhan P, Kim GS, Jung JE, Park EH, Chan PH. (2008). The role of Akt signaling in oxidative stress mediates NF-kappaB activation in mild transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28(12), 1917-1926.
- Sumi S, Tsuneyoshi T, Matsuo H, Yoshimatsu T. (2001). Isolation and characterization of the genes up-regulated in isolated neurons by aged garlic extract (AGE). *J Nutr*. 2001 131(3), 1096S-1099S.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol*. 141, 1423–1432.

Tsai CW, Chen HW, Yang JJ, Sheen LY, Lii CK. (2007). Diallyl disulfide and diallyl trisulfide up-regulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase via an AP-1-dependent pathway. *J Agric Food Chem.* 55(3), 1019-1026.

Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ. (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem.* 275(19), 14624-14531.

Wang X, Michaelis EK. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.* 30, 2-12.

Wang X, Zhu C, Qiu L, Hagberg H, Sandberg M, Blomgren K. (2003). Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem.* 86(2), 351-362.

Wilson WJ, Pollienger L. (2002). The dietary flavonoid quercetin modulates HIF-1 alpha activity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(1), 446-450.

Wu HW, Li HF, Wu XY, Zhao J, Guo J. (2008) Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 432(2), 83-87.

Zhu Y, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J. (2004). Neuroprotection by transforming growth factor- $\beta$ 1 involves activation of nuclear factor- $\kappa$ B through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and Mitogen activated protein kinase-extracellular-signal regulated Kinase1,2 signaling pathways. *Neuroscience.* 123, 897–906.

Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C (2002). Transforming growth factor-beta 1 increases Bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci.* 22(10), 3898-3909.