



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR  
NMDA POR EL EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO Y  
S-ALILCISTEÍNA EN UN MODELO  
DE ISQUEMIA CEREBRAL”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**JOSÉ ANTONIO RIVERA RODRÍGUEZ**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. MÓNICA ESPINOZA ROJO

CODIRECTORA DE TESIS: Dra. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2011

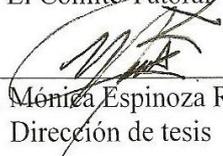


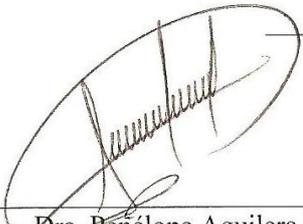
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**APROBACIÓN DE TESIS**

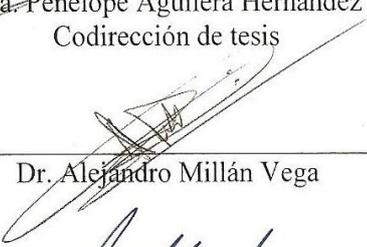
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 5 días del mes de noviembre de dos mil diez, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Regulación de la expresión del receptor NMDA por el extracto de ajo envejecido y S-alilcisteína en un modelo de isquemia cerebral”**, presentada por el alumno José Antonio Rivera 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.

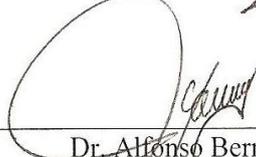
El Comité Tutorial

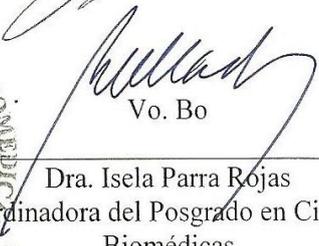
  
Dra. Mónica Espinoza Rojo  
Dirección de tesis

  
Dra. Penélope Aguilera Hernández  
Codirección de tesis

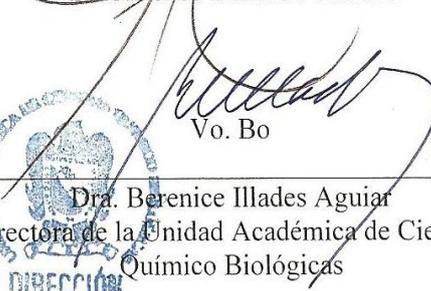
  
Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

  
Dr. Alejandro Millán Vega

  
Dr. Alfonso Bernabé Carreño

  
Vo. Bo

  
Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

  
Vo. Bo

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

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

Bajo la Dirección de  
Dra. Mónica Espinoza Rojo

Y codirección de  
Dra. Penélope Aguilera Hernández

Con la asesoría de  
Dra. Ma. Elena Moreno Godínez  
Dr. Alfonso Bernabé Carreño  
Dr. Alejandro Millán Vega

Durante el periodo en que el C. José Antonio Rivera Rodríguez cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca del CONACyT número de becario: 222260. Además, recibió el apoyo del Banco Santander al otorgarle la beca de Movilidad Nacional Santander durante el periodo de agosto-diciembre del 2009.

## *Agradecimientos*

*Al ser todo poderoso, que ha iluminado mi camino y nunca me ha dejado solo; por haberme permitido escalar un peldaño más. Gracias Dios por poner en mi camino tantos ángeles llamados "amigos".*

A la **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, mi mentora desde hace mucho tiempo y de quien he aprendido mucho en el transcurso que me ha permitido estar en su laboratorio. Gracias por fomentar en mí el deseo de superación.

A la **Dra. Penélope Aguilera Hernández**, investigadora-académica extraordinaria. Su constancia en desarrollar un trabajo excelente, siempre ordenada y bien organizada, inteligente, y sobre todo su capacidad humana es lo un estímulo para muchos que como yo admiramos esas capacidades.

Gracias a mis dos directoras de tesis, por su paciencia y comprensión.

A mis sinodales: **Dra. Ma. Elena Moreno Godínez**, **Dr. Alfonso Bernabé Carreño**; **Dr. Alejandro Millán Vega**, por su disposición y valioso tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A mis amigos de la generación 2008-2010 de la Maestría en Ciencias Biomédicas (**Adrián García**, **Jorge García**, **Karen Iturralde**, **Magali Lagunas**, **Betzabeth Moreno**, **Salvador Muñoz**, **Arturo Ramírez**, **Ma. Guadalupe Rivera**, **Nathalia Serna**, **Idanya Serafín**, **Jorge Sotelo**) quienes siempre estuvieron al pendiente de mí y yo de ustedes, y de los cuales he aprendido mucho, todos ellos con cualidades diferentes y virtudes únicas; recuerdo con una gran sonrisa todos los bellos momentos que pasamos juntos, de cada uno de ustedes me llevo algo guardado, y espero que siempre haya un espacio en nuestras vidas para recordarlas juntos.

Al **Q.B.P. Héctor Manuel Cornejo Ortega**, amigo y compañero de trabajo desde hace algunos años, por escucharme en esos momentos de desánimo, por tu apoyo y consejos, siempre te estaré agradecido. A la **Biol. Paola Macedo**, por su disposición y excelente trabajo en la Coordinación del posgrado.

*A todos aquellos de quienes recibí apoyo, amigos, compañeros y familiares, que estuvieron al pendiente de mi durante mi estancia en la Maestría, sé que nombrarlos a cada uno de ustedes me llevaría 3 tomos más para poder agradecer las atenciones que tuvieron conmigo, pero de todo corazón les digo...Gracias.*

## *Dedicatorias...*

A mi madre, **Josefina Rodríguez Sotelo**, por ser impulsora de este sueño que ahora se convierte en realidad; un triunfo que es más tuyo que mío, pues tú le has puesto alas a mis sueños y me has enseñado a volar.

A mi padre, **Antonio Rivera López**, porque no hay día que ponga en práctica lo que bien me enseñaste. Siempre estas presente en mis pensamientos. Este triunfo también es tuyo, porque siempre me has motivado a salir adelante, y quiero que siempre estés conmigo. Nunca lo olvides.

A mi hermana, **Marisol Rivera Rodríguez**, mi Psicóloga de cabecera, y en eso te has convertido literalmente; por escucharme y también orientarme en mis sueños. Que este sea un ejemplo de que en ti está el poder.

A mi abuelita, **María Rodríguez Sotelo**, porque no hay día que se olvide de mi. No hay palabras que plasmen el inmenso amor que siento por usted. Gracias por todos estos años de cuidados.

*A todos los que forman parte de mi familia, quienes por ellos soy, y por ellos he llegado a lograr este escalón en mi vida académica. Porque sé que siempre estarán ahí para apoyarme como lo han hecho hasta ahora.*

*José Antonio Rivera Rodríguez.*

**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL  
RECEPTOR NMDA POR EL EXTRACTO DE AJO  
ENVEJECIDO Y S-ALILCISTEÍNA EN UN MODELO  
DE ISQUEMIA CEREBRAL”**

<b>ÍNDICE</b>		<b>Página</b>
<b>I. RESUMEN</b>	.....	<b>1</b>
<b>II. ABSTRACT</b>	.....	<b>2</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	.....	<b>3</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	.....	<b>8</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	.....	<b>13</b>
<b>VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b>	.....	<b>26</b>
<b>VII. REFERENCIAS</b>	.....	<b>31</b>

## I. RESUMEN

**Antecedentes.** La isquemia cerebral (IC) induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO pueden inducir la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes entre los que destaca el del receptor de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (RNMDA). La sobreactivación del RNMDA se ha involucrado en IC. El extracto de ajo envejecido (EAE) y su componente mayoritario S-alilcisteína (SAC), tienen propiedades antioxidantes que se han asociado a su capacidad neuroprotectora en modelos experimentales de IC. El EAE y la SAC podrían regular la expresión del RNMDA en IC probablemente al disminuir ERO. **Objetivos.** Evaluar el efecto del EAE y de SAC en el nivel de expresión de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA en un modelo *in vivo* de isquemia/reperfusión cerebral. **Material y métodos.** Ratas macho Wistar fueron inducidas a IC durante 2 horas. Las ratas fueron tratadas con solución salina (400 mL; *i.p.*), EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) o SAC (300 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la reperfusión y posteriormente sacrificadas a diferentes tiempos de reperfusión. Se realizó extracción de ARN total de estriado (ST) y corteza frontoparietal (CZ) y se sintetizó ADN complementario. El ADN complementario fue amplificado por PCR en tiempo real, se utilizaron sondas TaqMan para NR1 y NR2B, los resultados fueron normalizadas con el amplificado de ARN ribosomal 18S. El nivel de expresión de proteína de NR1 y NR2B fue determinado a través del análisis en inmunoblot. **Resultados.** La administración del EAE en CZ no indujo cambios en el nivel de expresión del ARNm de NR1 y NR2B; en ST el EAE disminuyó la expresión del ARNm de NR1 y NR2B. A su vez, SAC disminuyó dramáticamente la expresión del ARNm de NR1 y NR2B en CZ y ST. El EAE y SAC no ejercieron efecto en la concentración de las proteínas de NR1 y NR2B. **Discusión y conclusión.** La SAC reduce significativamente la expresión del mensajero de NR1 y NR2B en CZ y ST. Este efecto se puede considerar neuroprotector y suponemos que SAC ejerce este efecto al inhibir ERO, inactivando factores de transcripción que promueven la expresión de NR1 y NR2B.

**Palabras claves:** extracto de ajo envejecido, S-alilcisteína, Receptor de glutamato, NMDA, NR1, NR2B, isquemia cerebral, especies reactivas de oxígeno.

## II. ABSTRACT

**Introduction.** Cerebral ischemia (CI) induces the formation of reactive oxygen species (ROS). ROS can induces the activation of transcription factors that regulate expression of genes among wich the glutamate receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR). The overactivation of the RNMDA is involved in CI. Aged garlic extract (AGE) and its major component S-allylcysteine (SAC), have antioxidants properties that have been associated with its neuroprotective capacity in experimental models of CI. The AGE and SAC could regulate the expression of RNMDA in CI probably by decreasing ROS. **Objective.** Evaluate the effect of AGE and SAC in the level expression of NR1 and NR2B subunits of NMDAR in a model of CI. **Material and methods.** Wistar male rats were subjected to CI for 2 hours. The rats were treated with saline solution (400 mL; *i.p.*), AGE (360 mg/kg body *i.p.*) or SAC (300 mg/kg body; *i.p.*) at the beginning of reperfusion and the killed at different times of reperfusion. Total RNA was extracted from striatum (ST) and frontoparietal cortex (CZ), complementary DNA was synthesized and amplified by real-time PCR, TaqMan probes were used for NR1 and NR2B and normalized to 18S ribosomal RNA. The level of expression of NR1 and NR2B protein was determined by Western blot. **Results.** The administration AGE in CZ did not induce in changes in the level of expression mRNA of NR1 and NR2B; in ST the AGE decreased the mRNA expression of NR1 and NR2B. In turn, SAC dramatically decreased expression of NR1 and NR2B mRNA in CZ and ST. The AGE and SAC had no effect on the concentration of NR1 and NR2B protein. **Discusion and conclusions.** The SAC, reduces the expression of NR1 and NR2B messenger in CZ and ST. This effect can be considered neuroprotective and assume that SAC exerts this effect by inhibiting ROS and inactivating transcription factors that promote the expression of NR1 and NR2B.

**Key words:** aged garlic extract, S-allylcysteine, glutamate receptor, NMDA, NR1, NR2B, cerebral ischemia, reactive oxygen species.

### III. INTRODUCCIÓN

El accidente cerebro vascular se caracteriza por la brusca disminución de la circulación de sangre al cerebro y puede ser de tipo isquémico o hemorrágico. El 72.94% de los accidentes cerebro vasculares observados en la práctica clínica son del tipo isquémico, mientras que el 26.97% son del tipo hemorrágico. La isquemia cerebral (IC) resulta de la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral, debido a un émbolo o trombosis en una arteria cerebral importante, que en la mayoría de los casos es la arteria cerebral media. Esta situación conlleva a una inmediata reducción de la actividad neurológica y muerte celular en la región directamente irrigada por la arteria que fue obstruida (Cabrera *et al.*, 2008). El retorno del flujo sanguíneo (reperusión) es determinante para la recuperación de las funciones celulares, sin embargo tras largos periodos de isquemia, la reperusión también tiene efectos secundarios negativos, agravando la lesión cerebral.

La IC constituye un problema de salud pública en nuestro país, debido a la alta prevalencia. La IC genera una notable incapacidad física y consecuentemente laboral, y es responsable de un importante gasto sanitario por el número de recursos que consume en los sistemas de salud. La IC ocurre en todos los grupos de edad y en ambos sexos. En nuestro país en los últimos años se ha ubicado dentro de las 10 principales causas de muerte (Sistema nacional de información en salud 2008).

El proceso de isquemia/reperusión (I/R), induce la muerte neuronal por diversos mecanismos: 1) la pérdida de la actividad eléctrica neuronal, como consecuencia de la alteración de los procesos dependientes de ATP; 2) la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, que incrementa el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular y activa procesos nocivos para la viabilidad celular; 3) la liberación masiva de aminoácidos excitadores con la consecuente sobreactivación de sus receptores, produciendo muerte celular por excitotoxicidad; 4) la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), produciendo un estado de estrés oxidante; 5) la activación de la respuesta inflamatoria; y 6) el deterioro mitocondrial asociado con la muerte celular por apoptosis (Dirnagl *et al.*, 1999; Durukan y Tatlisumak., 2007; Nishzawa., 2001).

El daño neuronal en IC ha sido asociado con la excitotoxicidad inducida por la sobreactivación de los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (RNMDA) como consecuencia de la liberación de altos niveles de glutamato al espacio extracelular (Lipton y Rosenberg., 1994; Cai y Rhodes., 2001; Nishizawa., 2001).

El RNMDA es un canal iónico permeable a  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  que participa en la transmisión sináptica y en diversas funciones fisiológicas como el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Awobuluyi *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). Se expresa principalmente en neuronas, sin embargo se ha descrito que también se expresa en astrocitos, oligodendrocitos, osteoclastos y linfocitos, aunque su función no ha sido esclarecida (Papadia y Hardingham 2007). Estructuralmente es un tetrámero constituido por tres tipos de subunidades: NR1, NR2 (2A-2D) y NR3 (3A/3B). Un receptor típico contiene dos subunidades NR1, las cuales tienen un sitio de unión a glicina, y dos subunidades NR2 con el sitio de unión al glutamato (Awobuluyi *et al.*, 2007). La distribución de las subunidades del RNMDA dentro del sistema nervioso central (SNC) es diferencial. La expresión de NR1 es prácticamente ubicua, mientras que las distintas proteínas NR2 presentan un patrón de síntesis específico, que varía en las distintas regiones del SNC y durante el desarrollo. NR2B predomina en el prosencéfalo; NR2A en el prosencéfalo y en el cerebelo; mientras que la subunidad NR2D se distribuye ampliamente en el prosencéfalo, tálamo y cordón espinal; y NR2C no se detecta en el hipocampo ni en la corteza cerebral (Stephenson 2001; Papadia y Hardingham 2007). NR1 es la subunidad esencial para dar la funcionalidad al RNMDA, además de ser la subunidad que presenta el nivel de expresión más alto de todas (Kohr G., 2006; Miao *et al.*, 2005). Existen ocho variantes de procesamiento para el ARNm de NR1 (NR1-1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -4a y 4b) que difieren entre sí por la presencia o ausencia de una secuencia de 21 aminoácidos (N1: exón 5) en la región N-terminal, y dos variantes más con un procesamiento en el carboxilo terminal (C1: exón 21) (C2: exón 22). La región N1 es importante en la regulación de las propiedades del receptor, ya que modifica su sensibilidad a espermina, al pH y al zinc. A pH fisiológico, las variantes que contienen el exón 5 se encuentran activas, mientras que las que carecen de este son parcialmente bloqueados (Cull-Candy *et al.*,

2001). La identidad de la subunidad NR2 determina muchas de las propiedades biofísicas y farmacológicas del RNMDA incluyendo la sensibilidad al  $Zn^{2+}$ ,  $H^+$ , poliaminas, probabilidad de apertura, tiempo de desactivación e interacciones con moléculas de señalización intracelular. La subunidad NR2A y NR2B generan una alta conductancia de apertura del canal, y poseen alta sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$ , mientras que NR2C y NR2D se caracterizan por baja conductancia del canal y una reducida sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$ . La subunidad NR3 confiere una permeabilidad reducida al  $Ca^{2+}$  y su expresión en la superficie neuronal es reducida (Cull-Candy y Leszkiewicz., 2004).

La activación del RNMDA contribuye a la entrada de  $Ca^{2+}$ , el cual actúa como segundo mensajero e inicia una serie de eventos, tales como activación de proteínas cinasas y factores de transcripción que participan en la regulación de procesos como memoria y aprendizaje (Hardingham y Bading., 2003). Sin embargo, la sobreactivación del RNMDA como ocurre en la IC, tiene efectos adversos ya que contribuye a la activación de enzimas proteolíticas que degradan al citoesqueleto (Furukawa *et al.*, 1997) y a la generación de radicales libres (Culmsee *et al.*, 2004).

Durante la diferenciación neuronal, la transcripción del RNMDA es regulada por la activación de su promotor, bloqueado inicialmente por la interacción de su elemento RE1 (elemento represor 1) con el represor REST/NRSF (elemento represor del silenciamiento de la transcripción/factor silenciador restrictivo de neuronas Bai *et al.*, 2003). También se han descrito mecanismos positivos para la expresión del gen NR1, los cuales implican factores transcripcionales de la familia Sp1, MAZ (proteína con dedos de zinc asociada a Myc), MEF2C (Factor-2C potenciador de unión específico de miocitos), NF- $\kappa$ B (Factor nuclear kappa B), HIF-1 $\alpha$  (Factor Inducible por Hipoxia-1 alfa) factores de crecimiento de la familia NGF (Factor de crecimiento neuronal) (Okamoto *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). En la región promotora de NR1 también se ha descrito tres sitios de reconocimiento para el factor transcripcional CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP) (Lau y Zukin., 2007). Las regiones promotoras de las subunidades NR2 han sido poco caracterizadas, existen secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción Sp1 e islas Cp. (Liu *et al.*, 2004). Las regiones promotoras de las subunidades NR2 están poco caracterizadas. De forma

similar a NR1, en el promotor de NR2A existen secuencias diana para los factores de transcripción de tipo Sp1 e islas CpG (Liu *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2002)

En IC se ha observado que la activación moderada del RNMDA induce neuroprotección contra la excitotoxicidad (Miao *et al.*, 2005). En cultivos de neuronas corticales, la exposición breve (desde los 30 min) a concentraciones excitotóxicas de NMDA provoca una inhibición rápida y específica de la expresión de la subunidad NR1. Este proceso de regulación está mediado a nivel transcripcional, y no involucra procesos de endocitosis ni degradación de la proteína (Gascón *et al.*, 2005). Por otro lado, la administración selectiva de antagonistas del RNMDA en ratas Sprague-Dawley durante la exposición a hipoxia hipobárica ha dado resultados benéficos contra de los daños ocasionados por la hipoxia, en los que la degeneración neuronal fue disminuida (Hota *et al.*, 2008).

Estos estudios apoyan que compuestos que tienen un efecto en la regulación de la expresión o actividad del RNMDA podrían tener un efecto terapéutico en IC. Sin embargo, debido a la gran variedad de procesos fisiológicos en los que el RNMDA participa, es importante la modulación adecuada de su expresión.

Se ha demostrado que el ajo (*Allium sativum*), en sus diferentes presentaciones [extracto de ajo envejecido (EAE), extracto acuoso y aceite de ajo] reduce significativamente el daño celular ocasionado en enfermedad de Alzheimer (Chauhan y Sandoval., 2007) e IC (Aguilera *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2003; Saleem *et al.*, 2006). El EAE posee un alto potencial terapéutico asociado a las propiedades antioxidantes de sus componentes; de las cuales destacan las propiedades de la S-alilcisteína (SAC) el componente mayoritario. Además se ha establecido mediante estudios clínicos y toxicológicos que la administración de EAE no tiene efectos adversos (Amagase *et al.*, 2001).

En el modelo de IC inducido por oclusión de la arteria cerebral media (OACM), el efecto protector del EAE involucra la restitución de la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa, así como la disminución del daño por nitración (Aguilera *et al.*, 2010). El EAE tiene un efecto neuroprotector transitorio en IC, asociado a la disminución de

las ERO; sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción por el cual induce la protección.

La SAC se considera un buen candidato terapéutico en diversas patologías debido a sus variados efectos farmacológicos. Particularmente, se ha demostrado que tiene un efecto protector en IC (Numagami y Ohnishi., 2001; Atif *et al.*, 2009). Además, inhibe de manera dosis dependiente la activación del NF- $\kappa$ B, inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y radicales libres en varios tipos celulares (Ide y Lau., 2001; Geng *et al.*, 1997). Así mismo, la SAC, disminuye el daño inducido por IC al inhibir la vía de señalización de ERK (Kim *et al.*, 2006).

El nivel de ERO es crucial para la activación de procesos biológicos, por ejemplo, un nivel bajo de la producción de ERO mitocondriales son necesarios para inducir la proliferación y diferenciación celular. Un nivel mayor en la producción de ERO conlleva a adaptación a condiciones de estrés, esta respuesta incluye la transcripción de genes de enzimas con actividad antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. Sin embargo, niveles altos de ERO marcan el inicio de procesos de muerte celular como la senescencia y la apoptosis. Niveles muy altos de ERO pueden causar daños rápidos e irreversibles al ADN, proteínas y lípidos. Los altos niveles celulares de ERO han sido asociados con cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, IC, neurodegeneración (Hamanaya y Chandel., 2010).

La participación de las ERO en la regulación de procesos fisiopatológicos ha dado la pauta para el desarrollo de estudios enfocados a analizar el papel molecular específico de los antioxidantes en diferentes modelos de enfermedades. Debido a que en IC las ERO inducen la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , NGF, que regulan promotores del RNMDA y a que la disminución en su expresión está asociada a la neuroprotección en IC, sugerimos que el efecto antioxidante del EAE y la SAC podrían estar alterando la expresión del RNMDA. Es por ello que en el presente trabajo evaluamos el efecto del EAE y SAC sobre el nivel de expresión de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### ***Animales de laboratorio***

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, de 280-350 g de peso (aproximadamente 16 semanas de edad). Los animales fueron divididos aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales (n= 4). Para cada análisis se usaron grupos independientes. Los animales fueron colocados en jaulas de acrílico con libre acceso a agua y alimento. Durante el estudio las ratas fueron mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (12 horas luz/oscuridad). Todos los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo a la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud".

### ***Diseño experimental***

Se hicieron grupos con una *n* de 4 animales por grupo. Las ratas fueron sometidas a IC, mediante oclusión de la arteria cerebral media (OACM) durante 2 horas, posteriormente se realizó la reperusión y fueron sacrificadas a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 10, 24 y 48 horas) con la finalidad de evaluar el efecto de la reperusión en la expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B. Debido a que el EAE protege a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión (2I/2R) (Aguilera *et. al.*, 2010); se evaluó el efecto del EAE y SAC en el nivel de expresión de NR1 y NR2B a estos tiempos de isquemia/reperusión (I/R); para ver el efecto a nivel de proteína otro grupo de ratas se sometió a 2 horas de isquemia y 4 horas de reperusión (2I/4R) estos grupos recibieron el tratamiento correspondiente. De cada uno de los grupos, se tuvo su control (CT). Todas las ratas fueron decapitadas y se diseccionó el cerebro para poder extraer CZ y ST.

### ***Tratamientos***

Las ratas fueron tratadas al inicio de la reperusión. Se aplicó una dosis de 360 mg/kg de EAE (1.2 mL/kg; *i.p*). Se utilizó una presentación comercial Aged garlic extract Kyolic® de Wakunaga de America Co., Ltd. (Mission Viejo, CA, USA). Se empleó una dosis de SAC de 300 mg/kg de peso; *i.p*. Para su síntesis se empleó material de vidrio el cual fue colocado 24 horas antes a 110°C. En un

matraz de bola de 250 mL se colocaron 30 mmoles de cloruro de L-cisteína en 90 mL de etanol absoluto y se mantuvo con agitación constante. Se adicionaron 0.11 moles de sodio metálico hasta disolverse completamente (aproximadamente 30 min.). Posteriormente, se adicionaron 31 mmoles de bromuro de alilo y se dejó reaccionar durante 1 hora. Al precipitado se le adicionó agua fría hasta obtener una solución. El exceso de etanol absoluto se evaporó, y cada uno de los componentes de la mezcla se precipitó con ácido acético concentrado. El precipitado se filtró y se lavo con etanol frío. Como control, se administró solución salina (1.2 mL/kg de peso; *i.p.*). Los animales fueron divididos aleatoriamente en grupos (n=4), para cada análisis.

### ***Modelo experimental de isquemia cerebral inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (OACM)***

La isquemia cerebral focal transitoria fue producida por la OACM, empleando el método descrito por *Longa et al., (1989)*. Los animales fueron anestesiados en una cámara de halotano (2%). Posteriormente, un monofilamento de nylon fue introducido a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm); en este punto el filamento ocluye el origen de la arteria cerebral media. Después de 2 horas, el filamento fue retirado para permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión). Las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos de perfusión (0, 1, 2, 3, 4, 10, 24, 48 horas).

### ***Pruebas conductuales para determinar el déficit neurológico***

El estado neurológico de cada rata fue determinado empleando 5 pruebas conductuales: 1) *Flexión de la pata contralateral* a la lesión, las ratas se suspenden por la base de la cola y la postura de los miembros delanteros es observada; las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, mientras que los animales con daño doblan la pata contralateral a la lesión; 2) *Motilidad espontánea*, los animales se colocan en una superficie plana (0.5 metros de diámetro); los animales normales inician el movimiento antes de 10 segundos; 3) *Reflejo de agarrar*, las ratas se suspenden de la cola y un cable se coloca delante de los miembros delanteros; los animales normales se agarran

simultáneamente con ambas patas; 4) *Prueba de la barra horizontal*, a las ratas que son capaces de asirse del cable en la prueba anterior, se les determina el tiempo que pueden mantenerse colgadas; los animales normales soportan más de 3 segundos; y 5) *Conducta de giro*, las ratas se sostienen por la base de la cola, permitiéndoles moverse libremente al apoyar las patas delanteras; mientras, se observa la dirección del movimiento durante 30 segundos. Los animales dañados realizan al menos 5 vueltas en sentido contralateral a la lesión. A cada prueba conductual se le asignó un valor de 0 si el animal presentaba una conducta normal, y de 1 si presentaba daño. La suma de los valores obtenidos en las 5 pruebas fue utilizada como déficit neurológico. La evaluación se realizó 30 minutos antes de la reperfusión. Las ratas con déficit neurológico mayor a 2 invariablemente presentan un daño por isquemia inducido por la OACM (Modificada de Longa *et al.*, 1989; Menzies *et al.*, 1992; Modo *et al.*, 2000).

#### ***Evaluación del nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA.***

*Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc).* Se utilizó material libre de ARNasas; para ello se empleó material de plástico nuevo y el material de vidrio fue tratado durante 15 minutos con agua oxigenada y enjuagado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Las ratas fueron decapitadas y se hizo disección del cerebro, se extrajo la corteza frontoparietal (CZ) y el estriado (ST) del lado ipsilateral a la lesión (hemisferio izquierdo). Se emplearon aproximadamente 50 mg tejido de cada región cerebral, al que se les agregó 1 mL de Tripure (Roche) y se homogeneizó mecánicamente empleando un pistilo de teflón. La concentración de ARN total fue determinada por espectrofotometría a 260 nm. La síntesis del ADNc se realizó a partir de 5 µg de ARN total, el cual se mezcló con 2.5 µM de hexámeros al azar y se incubó durante 7 minutos a 65°C; transcurrido este tiempo se mezcló con amortiguador para reverso transcriptasa 5X (0.25 M Tris-HCl, 0.5 M KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM DTT) (Promega), 1 mM de desoxinucleótidostrifosfatados, 40 U de ARNsin y 200 U de reverso transcriptasa M-MLV. La reacción fue incubada durante 1 hora a 37°C.

RT-PCR en tiempo real. El análisis de la expresión de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y ST, se realizó empleando ensayos prediseñados por Applied Biosystems, los cuales contienen oligonucleótidos sentido y antisentido en concentraciones no limitantes y una sonda TaqMan® MGB 6-FAM específicos (Applied Biosystem, California USA). Como control interno del ensayo se determinó la expresión del ARN ribosomal de la subunidad 18S, utilizando una sonda TaqMan®VIC. Cada experimento se realizó por duplicado y todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado; se incluyó un control negativo sin ADNc. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el proveedor: 1 ciclo de 10 min. a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y 1 min. a 60°C. El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo  $\Delta$ CT (Livak y Schmittgen., 2001). Se utilizó un termociclador 7500 Real Time PCR system de Applied Biosystems.

***Evaluación del nivel de expresión de las proteínas de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA.***

Extracción de proteínas totales. Las muestras de CZ y ST 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 de fosfatasa (1:100). Se tomaron 10  $\mu$ L del homogenizado que fueron utilizados para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry *et al.*, 1951. A los 490  $\mu$ L restantes se les agregó 490  $\mu$ L de amortiguador de lisis 2X (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0.5%, SDS 0.1%). Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 10 000 g durante 10 min. a 4°C. Se tomó 500  $\mu$ L del sobrenadante y se mezcló con 500  $\mu$ L del amortiguador de carga (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris HCl). Las muestras se sometieron a ebullición durante 5 min. y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Ensayos de réplica en Inmunoblot para las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA. Las muestras (100  $\mu$ g de proteína) se separaron por peso molecular en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8%. La electroforesis se realizó aproximadamente durante 1 hora empleando voltaje constante (100 voltios).

Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (0.45 micras de poro) empleando corriente eléctrica constante (350 miliamperes) durante 1 hora. Para evitar interacciones inespecíficas, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 1% en PBS. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (anti NR1, Upstate, Catalogo 05-432), (anti NR2B, Invitrogen, catálogo 71-8600) durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo, las membranas fueron lavadas siete veces con 50 mL de leche descremada al 1%/Tween-20 al 0.01% en PBS durante 10 min. cada uno en agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti IgG conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Laboratorios Inc. Cat 715-035-150 o Cat 711-035-152) durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron siete veces con 50 mL de leche descremada al 1%/Tween-20 al 0.01% en PBS durante 10 min. en agitación constante y a temperatura ambiente. La señal específica se reveló por quimioluminiscencia (Millipore).

#### ***Análisis estadístico.***

Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar, y se aplica por un análisis de varianza de factorial completo. Posteriormente, se emplea la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usando el programa Prisma 3.01 Graph Pad. Un valor de  $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativo.

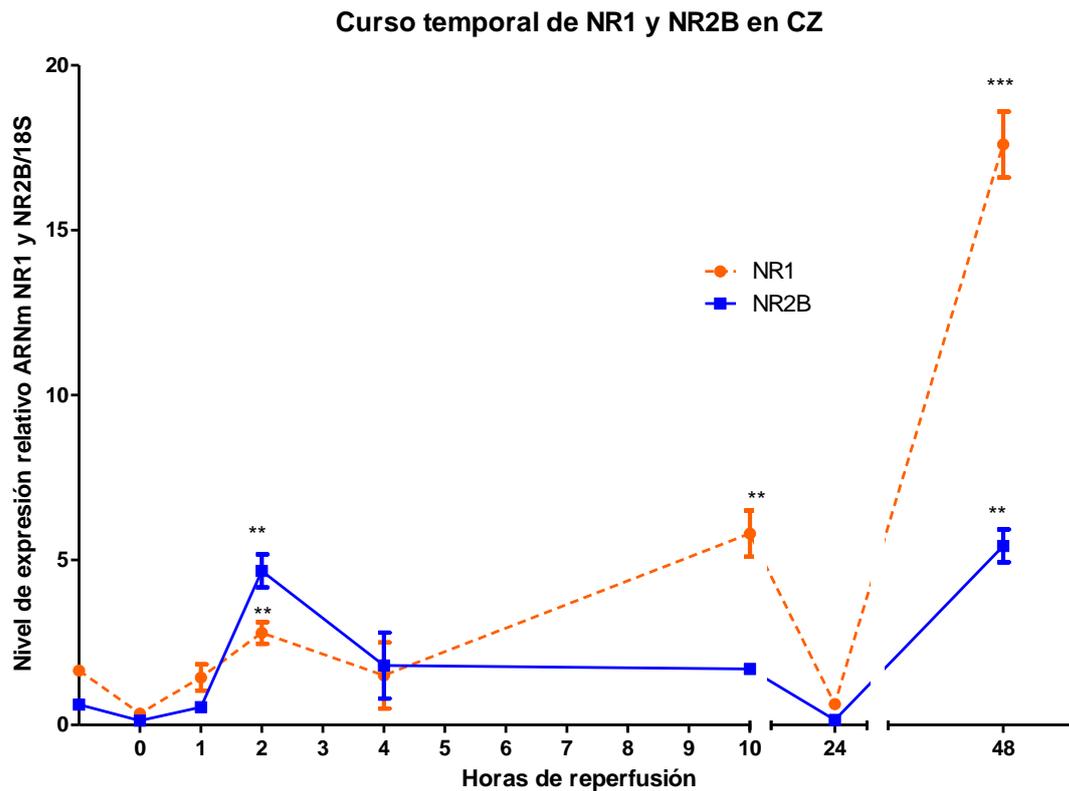
## V. RESULTADOS

### **Efecto de la isquemia y la reperfusión en la expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ**

Para determinar la expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA en I/R en CZ y ST, las ratas fueron sometidas a 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión: 0, 1, 2, 3, 4, 10, 24 y 48 horas.

Encontramos que las 2 horas de IC no altera la expresión del ARNm de NR1 en CZ. Sin embargo, durante la reperfusión observamos 3 cambios importantes: el primero fue un incremento del ARNm de NR1 de  $2.79 \pm 0.03$  veces (Tukey,  $p < 0.05$ ) a las 2 horas de reperfusión; posteriormente, a 4 horas de reperfusión la expresión de este ARNm se mantuvo en  $1.8 \pm 1.2$  veces; se observó un segundo pico de expresión a las 10 horas de reperfusión ( $5.8 \pm 0.7$  veces; Tukey,  $p < 0.05$ ), el cual disminuyó a las 24 horas, a  $0.6 \pm 0.1$  veces. Un aumento de mayor magnitud, fue detectado a las 48 horas de reperfusión ( $17.6 \pm 0.9$  veces; Tukey  $p < 0.0001$ ) (Figura 1).

Un comportamiento similar lo encontramos para el ARNm de la subunidad NR2B. Dos horas de IC no incrementan el nivel de expresión del ARNm. A 2 horas de reperfusión el ARNm de NR2B se incrementó  $4.06 \pm 0.5$  veces (Tukey  $p < 0.05$ ). El nivel de expresión se mantuvo ligeramente elevado  $1.70 \pm 0.1$  veces hasta las 10 horas, para posteriormente a las 24 horas volver a niveles basales  $0.15 \pm 0.02$  veces. Finalmente se observó un incremento de  $5.43 \pm 0.5$  veces (Tukey,  $p < 0.05$ ) a las 48 horas (Figura 1).

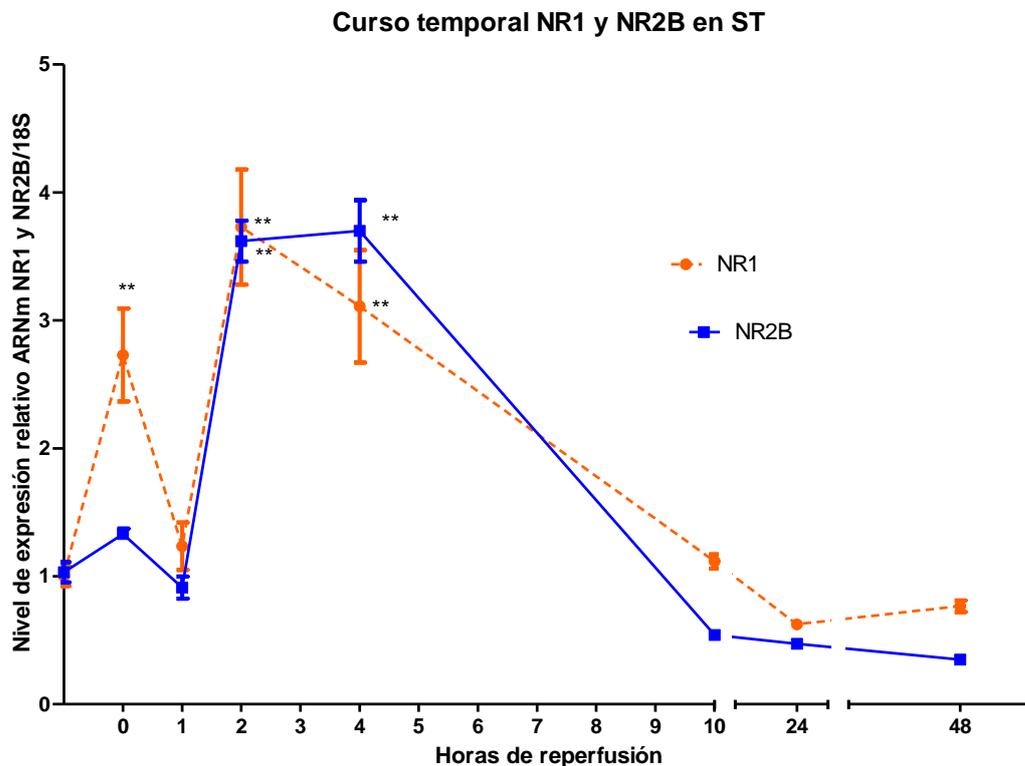


**Figura 1. Efecto de la reperfusion en el nivel de expresion del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ.** El nivel de expresion del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA se determino empleando sondas TaqMan en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y a diferentes tiempos de reperfusion (0, 1, 2, 4, 10, 24 y 48 horas). Se normalizo con la expresion del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresion se empleo el metodo  $\Delta\Delta CT$ . El nivel de expresion se muestra como numero de veces con respecto al grupo control (CT). Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes. Anova, Tukey, \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

### **Efecto de la isquemia y la reperfusion en la expresion del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en ST**

El nivel de expresion de NR1 y NR2B en ST a 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de reperfusion se muestra en la (Figura 2). Encontramos que a 2 horas de IC incrementa el nivel de expresion del ARNm de NR1 de ( $2.9 \pm 0.4$  veces; Tukey,  $p < 0.05$ ). Mientras que a 1 hora de reperfusion la expresion disminuye a valores basales, para volver a incrementar a 2 horas ( $3.73 \pm 0.4$  veces), y a 4 horas de reperfusion ( $3.96 \pm 0.4$  veces Tukey,  $p < 0.05$ ). El nivel de expresion disminuyo a 10, 24 y 48 horas de reperfusion ( $1.82 \pm 0.1$ ;  $0.97 \pm 0.1$ ;  $1.3 \pm 0.1$  veces) respectivamente.

El nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR2B no mostró cambios significativos al tiempo 0 y a 1 hora de reperfusión, el incremento en la expresión fue detectado a 2 ( $3.62 \pm 0.1$  veces) y 4 horas ( $3.7 \pm 0.2$  veces) de reperfusión (Tukey,  $p < 0.05$ ). A 10, 24 y 48 horas de reperfusión el nivel de expresión se mantuvo estable, sin cambios significativos con respecto al control ( $0.71 \pm 0.03$ ;  $0.56 \pm 0.01$ ;  $0.4 \pm 0.03$  veces) respectivamente.



**Figura 2. Efecto de la reperfusión en el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en ST.** El nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B del RNMDA se determinó empleando sondas TaqMan en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y a diferentes tiempos de reperfusión (0, 1, 2, 4, 10, 24 y 48 horas). Se normalizó con la expresión del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método  $\Delta\Delta CT$ . El nivel de expresión se muestra como número de veces con respecto al grupo control (CT). Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes. Anova, Tukey, \*\* $p < 0.05$ .

**Efecto del EAE en la expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y ST.**

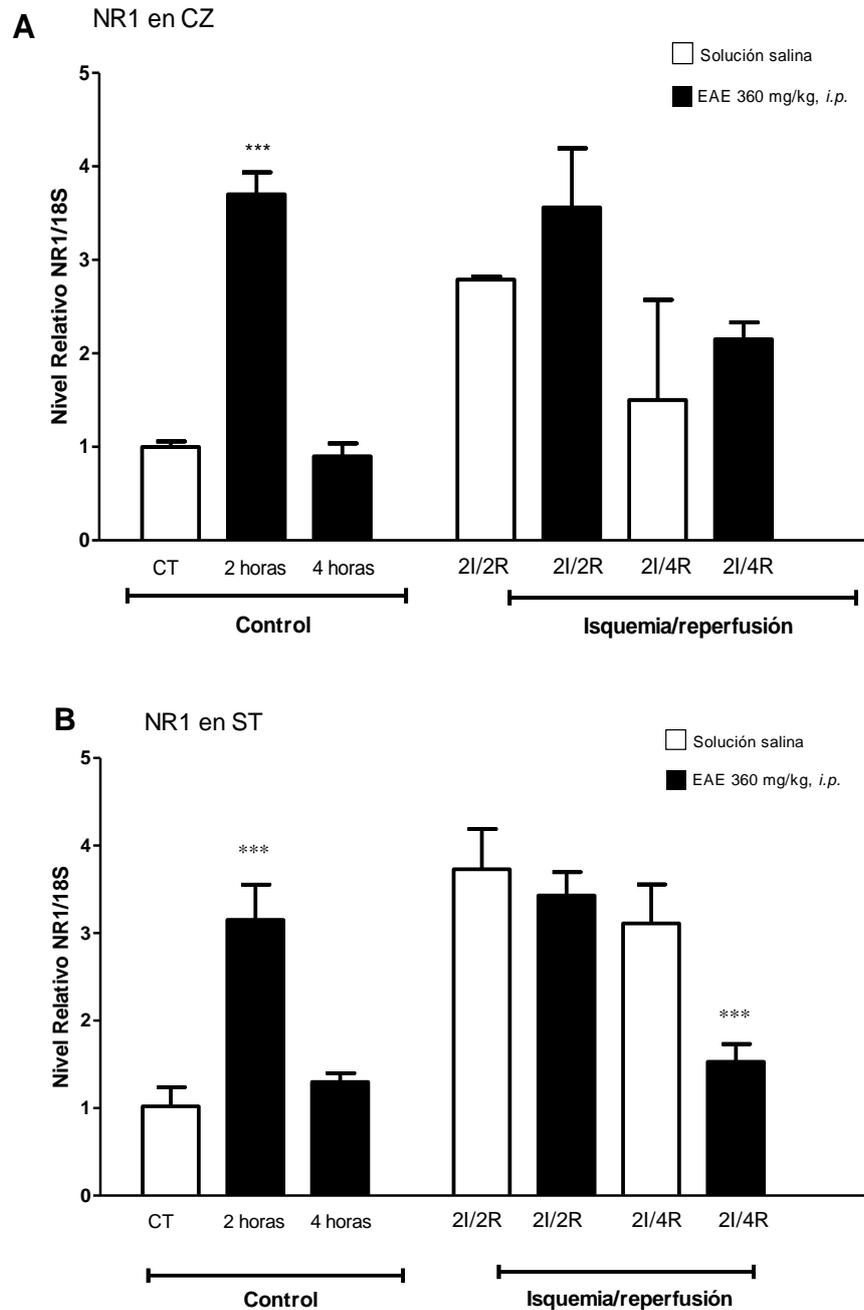
Debido a que el EAE tiene un efecto neuroprotector durante 2I/2R, pero no a tiempos posteriores (Aguilera *et al.*, 2010), y a que en este estudio encontramos un incremento significativo en la expresión del mensajero a 2I/2R para NR1 en CZ. Decidimos evaluar el efecto del EAE en la expresión del ARNm de la subunidad NR1 a 2I/2R y 2I/4R.

Observamos que la administración del EAE en ratas control durante 2 horas incrementó el nivel de expresión del ARNm en CZ y ST (Figura 3 A-B y Tabla 1). Sin embargo, en las ratas isquémicas que recibieron el tratamiento de EAE a 2I/2R y 2I/4R no mostraron cambios estadísticamente significativos en el nivel de la expresión del ARNm de NR1, comparado con las ratas que no recibieron el tratamiento (Figura 3 A y Tabla 1).

En ST encontramos que la administración del tratamiento con EAE a 2I/4R, disminuye el nivel de expresión del mensajero de NR1 (Figura 3 B y Tabla 1).

	CT	CT 2 horas EAE	2I/2R	2I/2R EAE	2I/4R	2I/4R EAE
<b>CZ</b>	1 ± 0.05	3.7 ± 0.2***	2.7 ± 0.03	3.5 ± 0.6	1.5 ± 1.07	2.1 ± 0.1
<b>ST</b>	1 ± 0.2	3.1 ± 0.4***	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.4	1.5 ± 0.2**

**Tabla 1. Efecto del EAE en la expresión del ARNm de NR1.** Nivel relativo de expresión del ARNm de la subunidad NR1 en CZ y ST (n=4). CT=control sano; CT 2 horas EAE= control sano que recibió el tratamiento de EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*); 2I/2R= 2 horas de isquemia/2 horas de reperusión; 2I/2R EAE= 2 I/2R más tratamiento con EAE; 2I/4R= 2 horas de isquemia/4 horas de reperusión; 2I/4R EAE= 2I/4R más tratamiento con EAE. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Anova, Tukey \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.0001

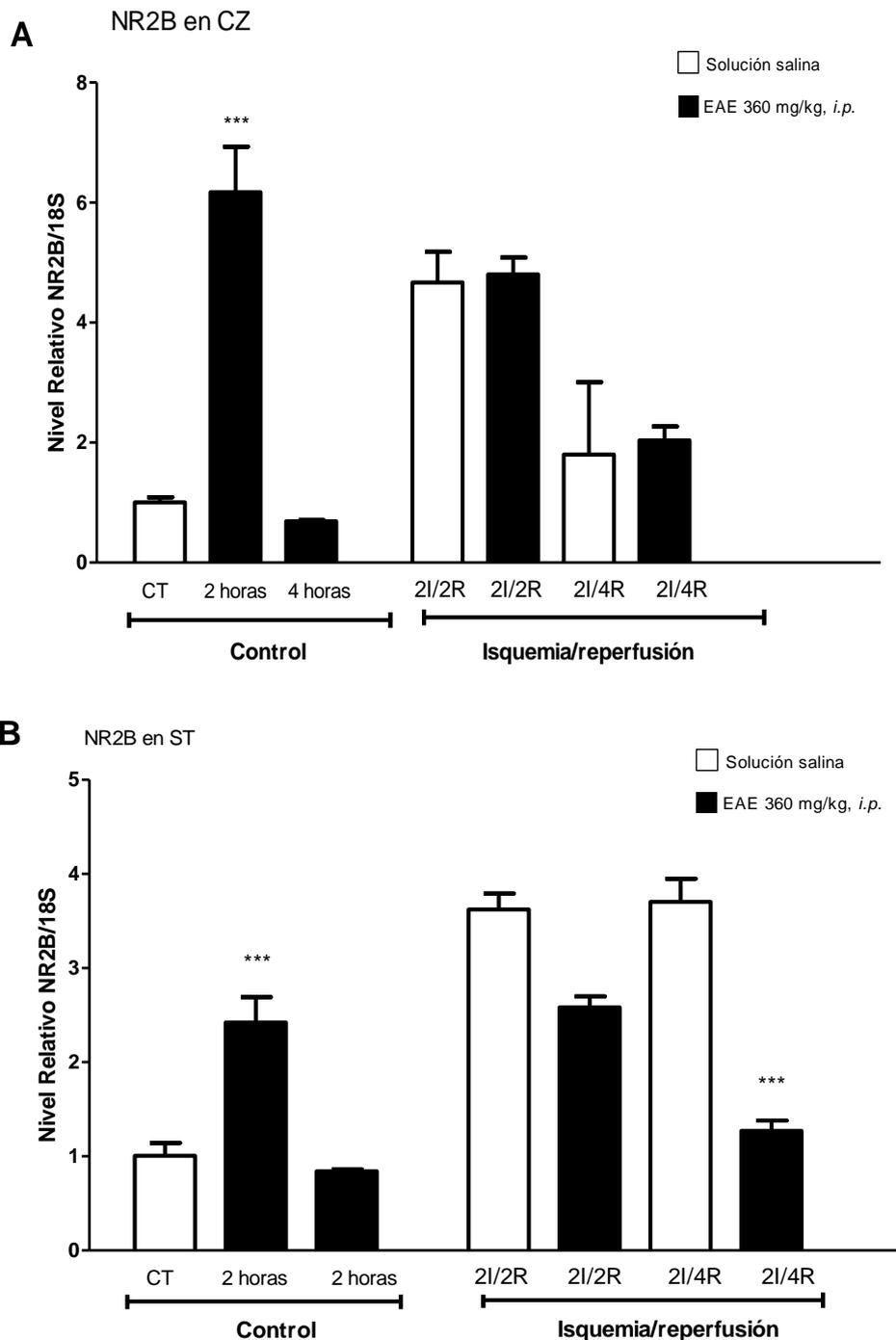


**Figura 3. Efecto del EAE en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR1 en CZ y ST.** Nivel del ARNm de NR1 en CZ (panel 3A) en ratas control (CT); ratas control con tratamiento con EAE por 2 y 4 horas (2 horas) y (4 horas); en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperfusion (2I/2R) sin y con tratamiento; ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 4 horas de reperfusion (2I/4R) sin y con tratamiento. En el panel 3B se utilizaron los mismos grupos que en el panel 3A, pero la determinación del nivel del ARNm de NR1 se realizó en ST. Se administró EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la reperfusion. Se normalizó con la expresión del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método  $\Delta\text{CT}$ . El nivel de expresión se muestra como número de veces con respecto al grupo control (CT). Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes. Anova, Tukey \*\*\* $p < 0.001$

Un patrón similar en el nivel de expresión del ARNm fue detectado para NR2B. De la misma manera que en la subunidad NR1, en el grupo control tratado con EAE se observó un incremento significativo en el nivel de expresión del mensajero. Encontramos que la administración del EAE en CZ a 2I/2R y 2I/4R, no tuvo ningún efecto significativo en el nivel de expresión del mensajero (Figura 4 A); sin embargo, en ST la administración del EAE disminuyó significativamente el nivel de expresión del mensajero en comparación con los grupos no tratados (Figura 4B). (Tabla 2).

	CT	CT 2 horas EAE	2I/2R	2I/2R EAE	2I/4R	2I/4R EAE
<b>CZ</b>	1.0 ± 0.08	6.1 ± 0.7***	4.6 ± 0.5	4.8 ± 0.2	1.8 ± 1.2	2.0 ± 0.2
<b>ST</b>	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.2***	3.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1***	3.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1***

**Tabla 2. Efecto del EAE en la expresión del ARNm de NR2B.** Nivel relativo de expresión del ARNm de la subunidad NR2B en CZ y ST (n=4). CT=control sano; CT 2 horas EAE= control sano que recibió el tratamiento de EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*); 2I/2R= 2 horas de isquemia/2 horas de reperusión; 2I/2R EAE= 2 I/2R más tratamiento con EAE; 2I/4R= 2 horas de isquemia/4 horas de reperusión; 2I/4R EAE= 2I/4R más tratamiento con EAE. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Anova, Tukey \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.0001



**Figura 4. Efecto del EAE en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR2B en CZ y ST.** Nivel del ARNm de NR2B en CZ (panel 4A) en ratas control (CT); ratas control con tratamiento con EAE por 2 y 4 horas (2 horas) y (4 horas); en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión (2I/2R) sin y con tratamiento; ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 4 horas de reperusión (2I/4R) sin y con tratamiento. En el panel 4B se utilizaron los mismos grupos que en el panel 4A, pero la determinación del nivel del ARNm de NR2B se realizó en ST. Se administró EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la reperusión. Se normalizó con la expresión del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método  $\Delta$ CT. El nivel de expresión se muestra como número de veces con respecto al grupo control (CT). Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes. Anova, Tukey \*\*\* $p < 0.001$

**Efecto de SAC en la expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y ST.**

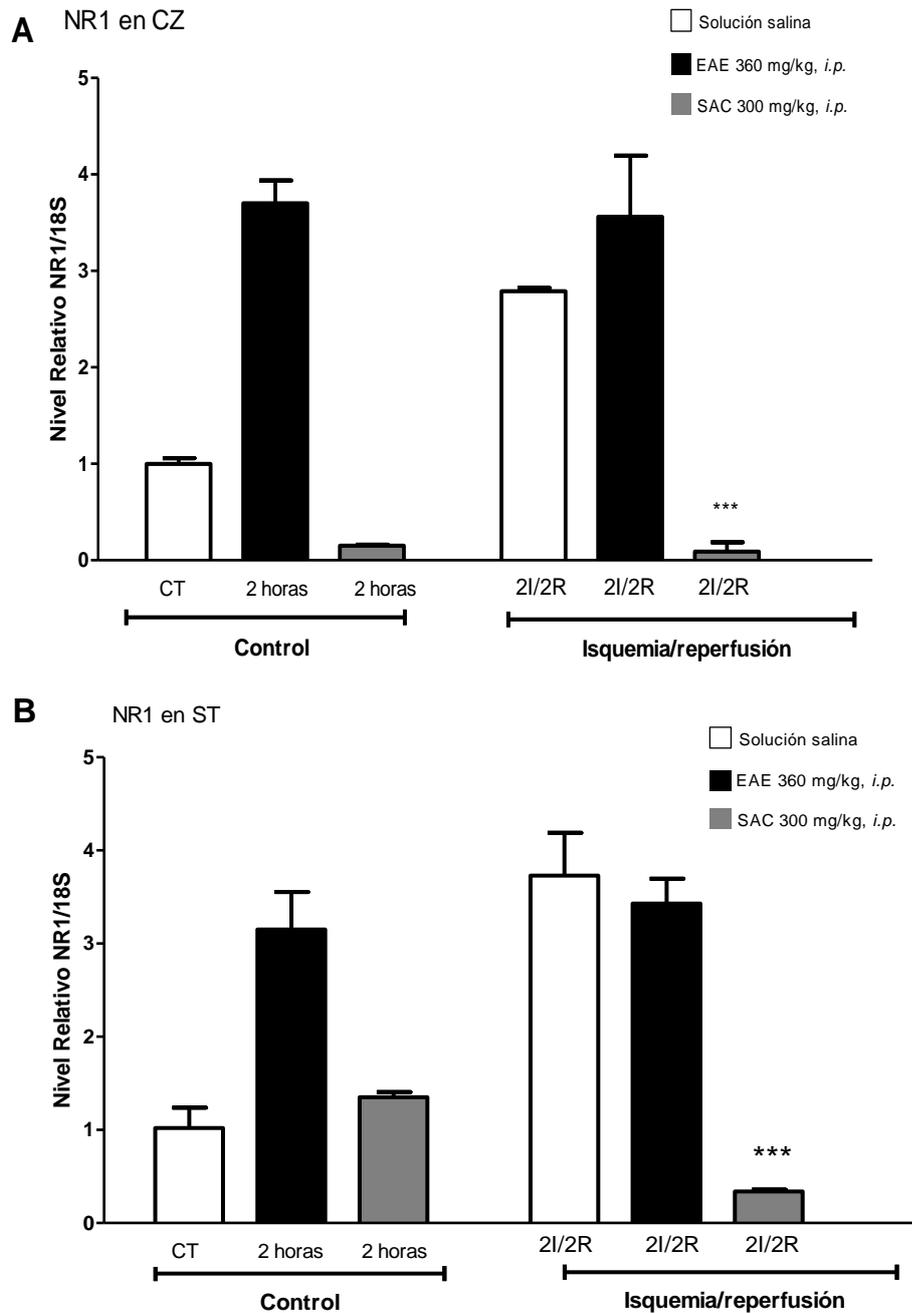
La administración de SAC en las ratas isquémicas con 2I/2R disminuyó significativamente la expresión del ARNm de NR1 por debajo de los niveles basales en CZ y ST comparado con las ratas isquémicas que recibieron el tratamiento con EAE (Tabla 3, Figura 5). De igual manera, la administración de SAC en ratas isquémicas con 2I/2R disminuyó significativamente la expresión del ARNm de la subunidad NR2B en CZ y ST comparado con las ratas que no recibieron tratamiento y con las tratadas con EAE a 2I/2R (Tabla 4, Figura 6).

	2I/2R	2I/2R EAE	2I/2R SAC
<b>CZ</b>	2.7 ± 0.03	3.5 ± 0.6	0.09 ± 0.09***
<b>ST</b>	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.2	0.3 ± 0.01***

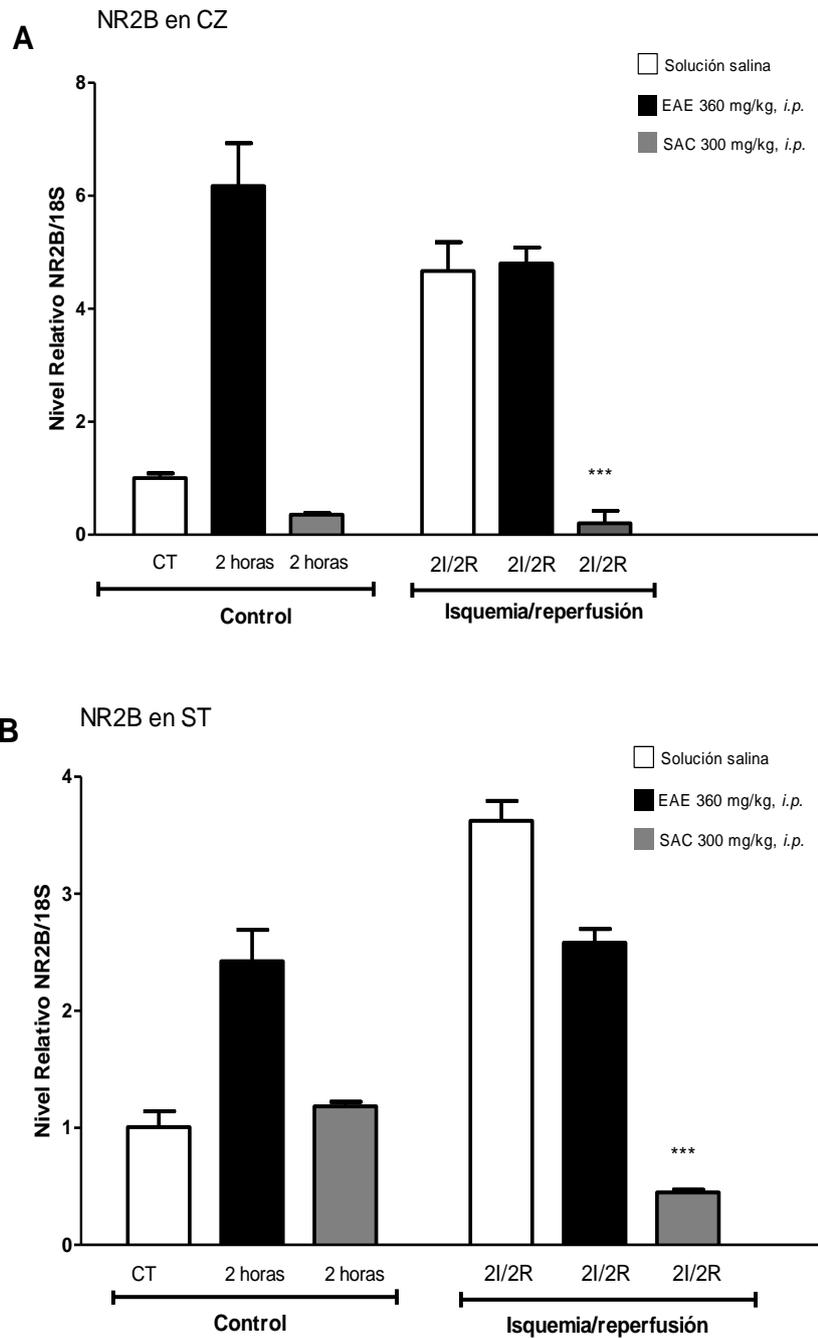
**Tabla 3. Efecto de SAC en la expresión del ARNm de NR1.** Nivel relativo de expresión del ARNm de la subunidad NR1 en CZ y ST (n=4). 2I/2R= 2 horas de isquemia/2 horas de reperfusión; 2I/2R EAE= 2I/2R más tratamiento con EAE (360mg/kg de peso *i.p.*); 2I/2R SAC= 2I/2R más tratamiento con SAC (300mg/kg de peso *i.p.*). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Anova, Tukey \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.0001

	2I/2R	2I/2R EAE	2I/2R SAC
<b>CZ</b>	4.6 ± 0.5	4.8 ± 0.2	0.2 ± 0.2***
<b>ST</b>	3.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	0.4 ± 0.02***

**Tabla 4. Efecto de la SAC en la expresión del ARNm de NR2B.** Nivel relativo de expresión del ARNm de la subunidad NR2B en CZ y ST (n=4). 2I/2R= 2 horas de isquemia/2 horas de reperfusión; 2I/2R EAE= 2I/2R más tratamiento con EAE (360mg/kg de peso *i.p.*); 2I/2R SAC= 2I/2R más tratamiento con SAC (300mg/kg de peso *i.p.*). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar. Anova, Tukey \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.0001



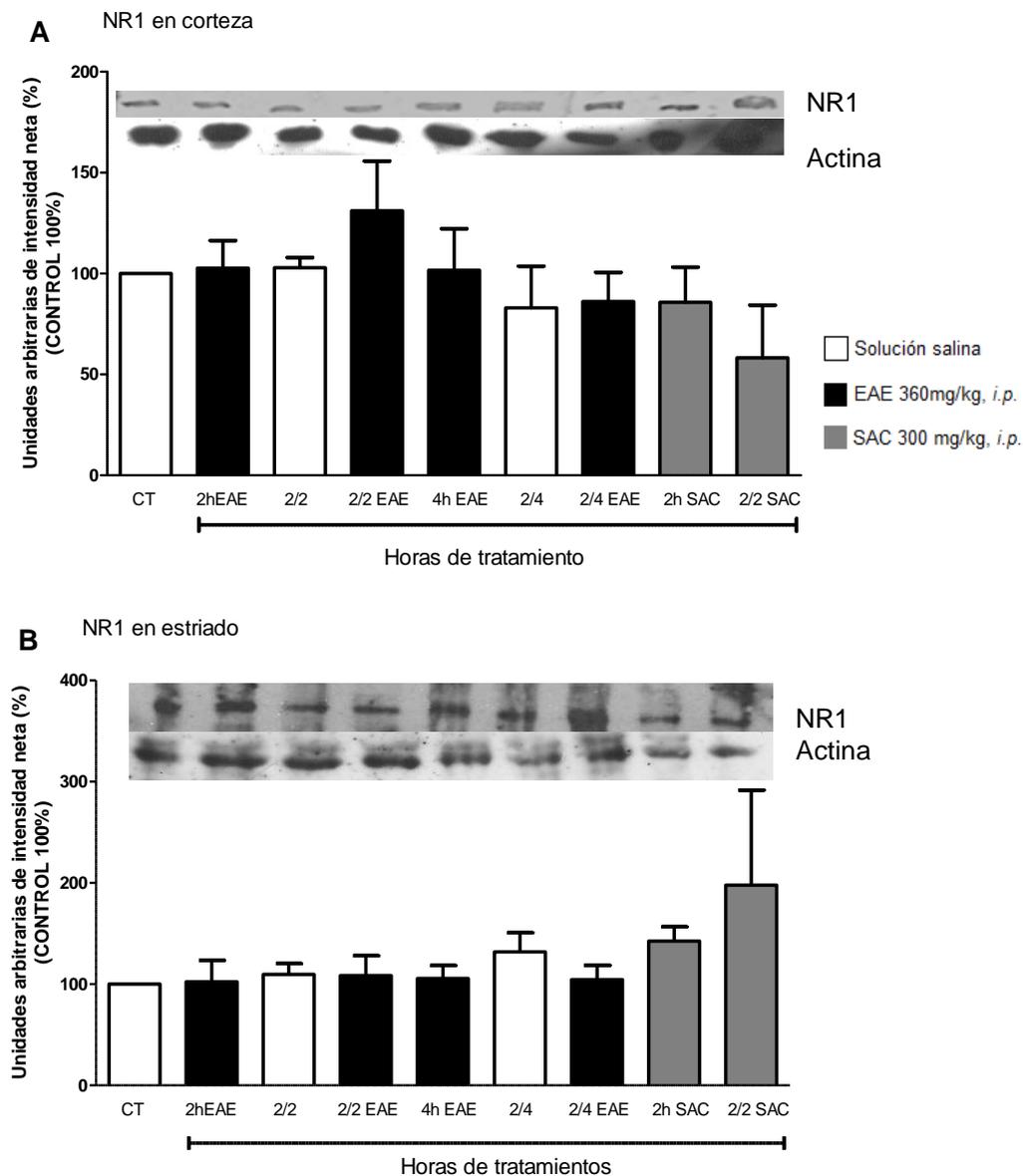
**Figura 5. Efecto de la SAC en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR1 en CZ y ST.** Nivel del ARNm de NR1 en CZ (panel 5A) en ratas control (CT); en ratas control con tratamiento con EAE por 2 horas (2 horas); ratas control con tratamiento con SAC por 2 horas (2 horas); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperfusión (2I/2R) sin y con tratamiento con EAE; ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperfusión (2I/2R) sin y con tratamiento con SAC. En el panel 5B se utilizaron los mismos grupos que en el panel 5A, pero la determinación del nivel de ARNm de NR1 se realizó en ST. Se administró EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) ó SAC (300 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la reperfusión. Se normalizó con la expresión del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método  $\Delta$ CT. El nivel de expresión se muestra como número de veces con respecto al grupo control (CT). Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes. Anova, Tukey \*\*\* $p < 0.001$



**Figura 6. Efecto de la SAC en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR2B en CZ y ST.** Nivel del ARNm de NR2B en CZ (panel 6A) en ratas control (CT); en ratas control con tratamiento con EAE por 2 horas (2 horas); ratas control con tratamiento con SAC por 2 horas (2 horas); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperfusion (2I/2R) sin y con tratamiento con EAE; ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperfusion (2I/2R) sin y con tratamiento con SAC. En el panel 6B se utilizaron los mismos grupos que en el panel 6A, pero la determinación del nivel de ARNm de NR1 se realizó en ST. Se administró EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) ó SAC (300 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la reperfusion. Se normalizó con la expresión del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método  $\Delta$ CT. El nivel de expresión se muestra como número de veces con respecto al grupo control (CT). Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes. Anova, Tukey \*\*\* $p < 0.001$

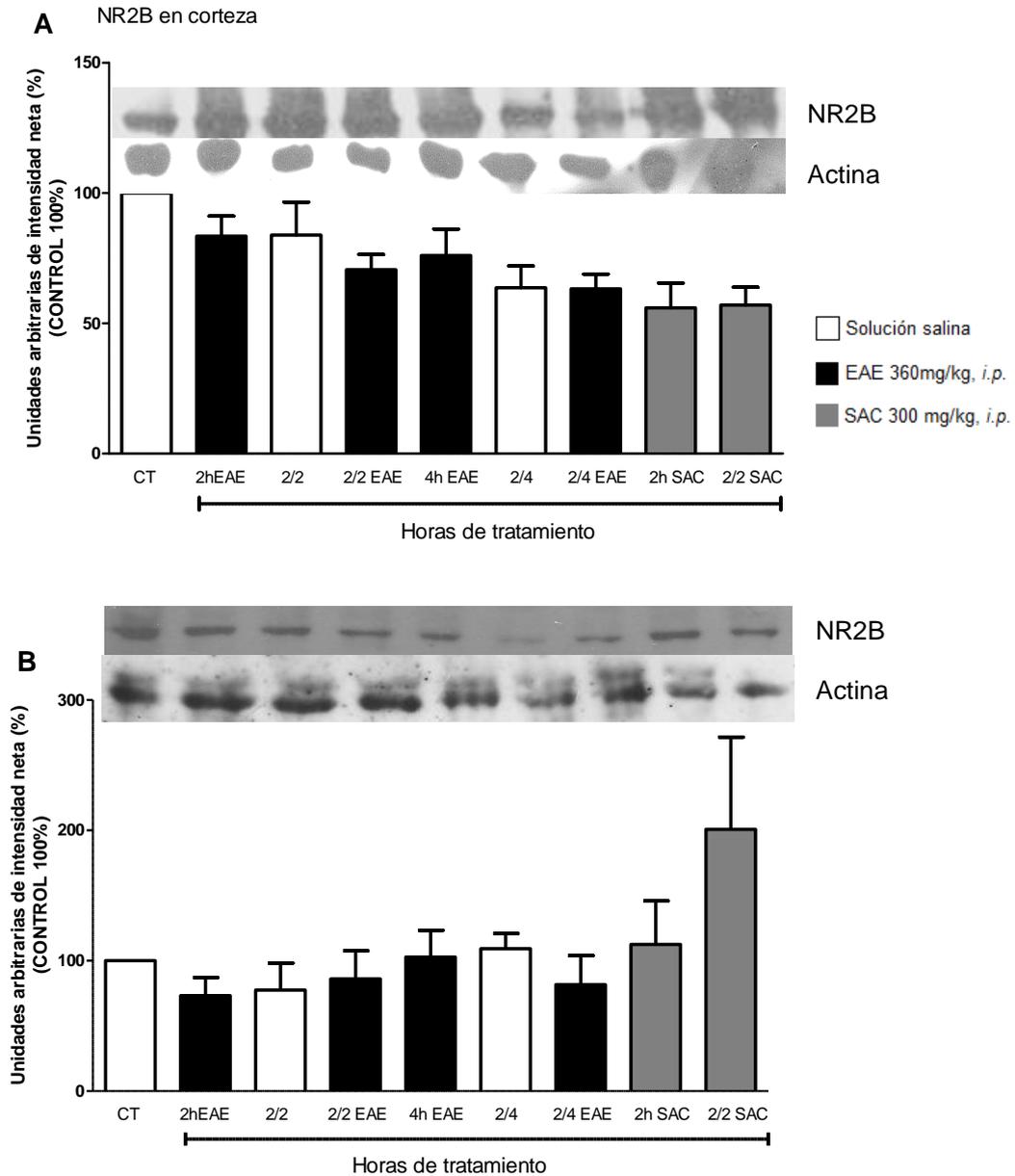
### **Efecto del EAE y SAC en la expresión de las proteínas de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y ST.**

Analizamos la posible regulación de las proteínas NR1 y NR2B por el tratamiento con EAE y SAC utilizando anticuerpos monoclonales para NR1 (figura 7) y policlonales para NR2B (figura 8) en CZ y ST mediante inmunoblot. Los resultados del análisis densitométrico de cada uno de los grupos de estudio y su análisis estadístico, indicaron que la administración del EAE y SAC no induce cambios estadísticamente significativos en la expresión de las proteínas con respecto al grupo control.



**Figura 7. Efecto del EAE y la SAC en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR1 en CZ y ST.** Nivel de expresión de la proteína NR1 en CZ (panel 7A) en ratas control (CT); en ratas con tratamiento con EAE por 2 horas (2hEAE); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de perfusión (2I/2R) sin y con tratamiento con EAE (2I/2R EAE); ratas control con tratamiento con EAE por 4 horas (4hEAE); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 4 horas de

reperusión (2I/4R) sin y con tratamiento con EAE (2I/4R EAE); ratas control con tratamiento con SAC por 2 horas (2hSAC); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión con tratamiento con SAC (2I/2R SAC). En el panel 7B se utilizaron los mismos grupos que en el panel 7A, pero la determinación del nivel de expresión de la proteína NR1 se realizó en ST. Se administró EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) ó SAC (300 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la reperusión. Se normalizó con la expresión de la proteína actina. Cada valor representa el promedio de cuatro experimentos independientes.



**Figura 8. Efecto del EAE y la SAC en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR2B en CZ y ST.** Nivel de expresión de la proteína NR2B en CZ (panel 8A) en ratas control (CT); en ratas con tratamiento con EAE por 2 horas (2hEAE); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión (2I/2R) sin y con tratamiento con EAE (2I/2R EAE); ratas control con tratamiento con EAE por 4 horas (4hEAE); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 4 horas de reperusión (2I/4R) sin y con tratamiento con EAE (2I/4R EAE); ratas control con tratamiento con SAC por 2 horas (2hSAC); ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión con tratamiento con SAC (2I/2R SAC). En el panel 8B se utilizaron los mismos grupos que en el panel 8A, pero la determinación del nivel de expresión de la proteína NR1 se realizó en ST. Se

administró EAE (360 mg/kg de peso; *i.p.*) ó SAC (300 mg/kg de peso; *i.p.*) al inicio de la  
reperusión. Se normalizó con la expresión de la proteína actina. Cada valor representa el  
promedio de cuatro experimentos independientes.

## VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

### **La reperfusión incrementa el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y ST.**

La activación inapropiada del RNMDA se ha implicado en la etiología de diversas enfermedades como esquizofrenia, IC, dolor crónico y Parkinson debido a que la entrada excesiva de calcio a través del RNMDA puede causar muerte neuronal excitotóxica. De acuerdo a esta observación, el bloqueo del RNMDA en modelos animales de IC tiene un efecto neuroprotector (Cull-Candy *et al.*, 2001).

Nuestro estudio es el primero en describir una respuesta temporal temprana de la expresión de las subunidades NR1 y NR2B en un modelo de I/R en cerebro de rata adulta utilizando el método cuantitativo de RT-PCR en tiempo real.

Los resultados del presente estudio indican que la isquemia durante un periodo de 2 horas no provoca cambios en el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en la CZ. Mientras que en ST provocó un incremento en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad NR1 pero no en NR2B.

Resultados similares han sido reportados, Hota *et al.*, 2008 empleando un modelo de hipoxia hipobárica, encontraron que la expresión del ARNm de NR1 incrementa en neuronas del hipocampo gradualmente a partir de los 3 días (19%) y hasta los 14 días posteriores a la exposición a hipoxia hipobárica (139%). A pesar de que en ST no se detectó un incremento en el nivel de expresión del ARNm de NR2B, esto puede deberse a que el daño ocasionado por la isquemia no constituye un estímulo suficiente como para incrementar el nivel de expresión y sea necesario el incremento de ERO producidas por la reperfusión, para poder inducir el incremento de su expresión.

No todas las neuronas en el cerebro tienen la misma vulnerabilidad a la IC. Las neuronas del hipocampo, de la CZ, del ST y las células de Purkinje del cerebelo son más vulnerables estas neuronas se denominan “selectivamente vulnerables” (Hossmann., 1993). El incremento de NR1 en ST puede deberse a la cercanía con el hipocampo, una región con abundantes terminaciones glutamatérgicas y consecuentemente con abundantes RNMDA que quizás esta cercanía sea la causa del incremento en el ARNm.

Al evaluar en CZ la respuesta temporal de la expresión de las subunidades NR1 y NR2B mediada por la reperfusión cerebral, se detectaron incrementos en el nivel de expresión del mensajero de ambas subunidades a las 2 horas de reperfusión. En ST se incrementa el nivel de expresión de NR1 y NR2B a 2 y 4 horas de reperfusión. Sin embargo, a 10, 24 y 48 horas no hubo cambios significativos para ambas subunidades.

Se ha descrito que el estrés oxidativo contribuye a la etiología de diversos desórdenes, principalmente neurológicos (e. g. Alzheimer, Parkinson, IC), debido a que las neuronas son susceptibles al daño oxidativo producido por las ERO. En IC se producen grandes cantidades de ERO y ERN. (Hardingham y Lipton., 2010). Sin embargo, la producción de ERO es un proceso altamente controlado, y juega un papel importante en la regulación de la señalización celular. Cuando existe una producción excesiva de ERO en las mitocondrias pueden causar daño a proteínas, ADN y lípidos; mientras que la producción moderada regula la señalización celular permitiendo la activación de la expresión genética (Hamanaka y Chandel., 2010).

Peters *et al.*, (1998) demostraron que después de 20 min de reperfusión se observa el máximo en el incremento de la producción de ERO, esta producción se mantiene elevada por lo menos durante 3 horas. Al evaluar en CZ la respuesta temporal de la expresión de las subunidades NR1 y NR2B, mediada por la reperfusión cerebral, se detectaron incrementos en el nivel de expresión del mensajero de ambas subunidades a las 2, horas de reperfusión. Este incremento en el nivel de expresión puede deberse a la activación de factores de transcripción inducidos por el incremento de ERO en la reperfusión. Puesto que se ha reportado que las ERO activan factores de transcripción como el factor STAT3, el factor regulador de interferón 3, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y NF- $\kappa$ B (Dirnalg *et al.*, 1999; Liu *et al* 2004). En particular, el NF- $\kappa$ B es regulado por el estado redox de la célula y activado por ERO (Chan, 2001).

Los factores de transcripción se unen específicamente a secuencias consenso del ADN, en algunos casos a un tipo de secuencia consenso se pueden unir diferentes grupos de factores de transcripción, y un grupo de factores de transcripción puede interactuar con diferentes secuencias consenso. Por ejemplo, los factores transcripcionales Sp se pueden unir a motivos G-C y G-T. NF- $\kappa$ B y los

factores transcripcionales Sp pertenecen a diferentes familias de factores de transcripción sin embargo comparten motivos G-C. Sp1, 3 y 4 activan promotores, incluyendo motivos G-C del promotor de NR1. Sp1, 3 y 4 son activadores del promotor de NR1 y actúan interactuando con el sitio de NF- $\kappa$ B (Liu *et al* 2004). De tal manera que la activación de estos factores de transcripción sensibles a ERO podrían ser los responsables del incremento en el nivel de expresión de NR1 y NR2B en la reperusión.

**El tratamiento con EAE incrementa el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en ST.**

Se ha propuesto el uso de antioxidantes (e. g. EAE, SAC, Epigallocatequina gallate, quercetina, galangina, etc.) para contrarrestar el daño causado por ERO. A pesar de que son muchos los trabajos que evalúan al EAE, la mayoría de ellos son encaminados a demostrar que el control de los radicales libres producidos en I/R, debido a las propiedades antioxidantes del EAE, está asociado a su efecto neuroprotector (Aguilera *et al.*, 2010; Borek 2001; Durak *et al* 2004; Munday *et al.*, 1998), pero no se ha profundizado en determinar los mecanismos moleculares involucrados (e. g. la regulación de vías de señalización).

En el presente trabajo encontramos que en ratas control el tratamiento con EAE durante 2 horas, incrementa el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y en ST. En neuronas corticales se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de NR1 (Yeh *et al.* 2008). Agentes antioxidantes como quercetina y galangina inducen el incremento en el nivel de la proteína HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia e hipoxia (Park *et al.* 2008). Esto sugiere que en nuestro estudio el EAE podría favorecer un ambiente redox, al actuar como atrapadores de radicales libres y promover la síntesis NR1 y NR2B mediada por la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

La administración del EAE disminuyó el nivel de expresión del ARNm de NR1 y NR2B en ST. Dado que encontramos que la I/R induce el incremento de la expresión de estas subunidades, la administración de un antioxidante como el EAE, podría estar provocando la estabilización del estrés oxidativo producido por las ERO. De tal manera que el EAE podría estar bloqueando la activación de los factores de transcripción inducidos por ERO, teniendo como resultado una disminución en la expresión de NR1 y NR2B.

En la CZ no se encontró una respuesta al tratamiento con EAE. La diferencia en el nivel de expresión del ARNm y el tratamiento con EAE entre estas regiones cerebrales puede ser debida a que cada región cerebral está compuesta por diversos y diferentes tipos de neuronas, y cada tipo neuronal es diferente en su formación de circuitos y procesamiento de señales, esta diferencia puede estar basada en la singularidad de los receptores de superficie de membrana o de los neurotransmisores que se unen a sus receptores (Kirino *et al.*, 1985).

### **La SAC disminuye el nivel de expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2B en CZ y ST.**

La administración de SAC a 2I/2R disminuyó de manera dramática el nivel de expresión de NR1 y NR2B en CZ y ST. El EAE indujo una disminución del  $2.5 \pm 0.1$ ;  $1.2 \pm 0.1$  veces en el nivel de expresión del ARNm de NR2B en ST. Sin embargo la SAC provocó una disminución dramática en el nivel de expresión de NR1 ( $0.09 \pm 0.09$ ;  $0.03 \pm 0.01$  veces) en CZ y ST respectivamente; y de NR2B ( $0.2 \pm 0.2$ ;  $0.4 \pm 0.02$  veces) en CZ y ST respectivamente. La diferencia observada con el EAE y con la SAC podría atribuirse principalmente a dos factores: 1) las diferentes dosis de SAC y EAE empleados. La dosis utilizada de SAC (300mg/kg de peso) fue de 1000 veces mayor en comparación con la concentración de SAC que contiene el EAE (360mg/kg de peso) ya que la concentración de SAC que contiene el EAE es de aproximadamente 1  $\mu$ g por cada mg de EAE (Ahmad *et al.*, 2007). Utilizamos una alta concentración de SAC porque previamente se ha reportado su efecto neuroprotector en diversos modelos experimentales empleando esta dosis (Kim *et al.*, 2006; Numagami y Ohnishi 2001; Atif *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha demostrado que en un modelo de IC a través de la OACM, la administración de SAC (300 mg/kg de peso) es un potente agente neuroprotector en I/R, y modula los daños neuronales inducidos por las disfunciones mitocondriales en hipocampo (Atif *et al.*, 2009). 2) el efecto de los otros componentes del EAE (*e. g.*  $\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína; S-alilmercaptocisteína; ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolino-3-carboxílico; ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolino-1,3-dicarboxílico) podría estar modulando otras moléculas involucradas en la regulación de la expresión de estas subunidades y por lo tanto tener un efecto diferente al que se observa con la SAC.

La administración de agentes antioxidantes como el EAE y SAC regula el estrés oxidativo en la célula, por lo que es posible que estos antioxidantes estén regulando la actividad de factores transcripcionales que se ven involucrados en la inducción de la actividad del promotor de NR1 y NR2B.

**El EAE y SAC no regulan el nivel de expresión de las proteínas NR1 y NR2B en CZ y ST.**

El EAE y SAC a las concentraciones probadas no ejercieron efecto en la expresión de las proteínas NR1 y NR2B. Estos resultados no demuestran de manera concluyente que el EAE y SAC no ejerzan su efecto en la modulación de la expresión de estas proteínas debido a que: 1) el efecto en la concentración de la proteína podría estar ocurriendo a tiempos diferentes a los analizados. Por ejemplo, la vida media de NR1 presenta dos poblaciones, de 2 y 34 horas que corresponden, respectivamente, a las subunidades NR1 no ensambladas en tránsito desde el retículo endoplasmático y a las expresadas en la superficie celular formando complejos con las subunidades NR2 (Huh y Wenthold 1999). Probablemente el efecto de estos antioxidantes sobre la concentración de proteínas pueda verse reflejada solo cuando se realicen las mediciones a tiempos superiores a la vida media de las proteínas. 2) Es probable que estos compuestos no actúan directamente sobre las proteínas, y solo actúen a través de la regulación de la expresión de su ARNm. Mediante PCR en tiempo real detectamos la expresión de la variante que contiene el carboxilo terminal (C2: exón 22). Mientras que con el ensayo de WB detectamos todas las variantes de NR1. Esto sugiere que la SAC podría estar inhibiendo específicamente la expresión del ARNm de la variante C2, sin embargo, las otras variantes podrían seguir expresándose y es por ello que la proteína sigue estable. Esta variante es importante porque tiene un papel inhibitorio en tráfico de las subunidades NR1 (Horak y Wenthold 2009).

En este trabajo definimos que en IC, el EAE y su componente mayoritario, SAC, no afectan el nivel de proteínas de NR1 y NR2B, pero si el nivel de la expresión del ARNm, esto último dependerá de la región donde se presente el daño y del tiempo de reperfusión.

## VII. REFERENCIAS:

- Aguilera, P., Chánez Cárdenas M. E., Ortiz Plata A., León-Aparicio D., Barrera D., Espinoza Rojo M., Villeda-Hernández J., Sánchez García A., Maldonado P.D., (2010) Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine*, 17, 241-7.
- Ahmad, M. S., Pischetsrieder, M., Ahmed, N., (2007) Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur Jour Pharmacol*, 561, 32–38
- Amagase H., Petesch BL., Matsuura H., Kasuga, Itakura Y. (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131, 955S-62S.
- Atif, F., Yousuf, S., Kumar, S., Agrawal, K., (2009) S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res.* 1265, 128-137.
- Awobuluyi, M., Yang, J., Ye, Y., Chatterton, J. E., Godzik, A., Lipton, S. A. & Zhang, D. (2007) Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of NR1/NR3 N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol*, 71, 112-22.
- Bai, g., Zhuang, Z., Liu, A., Chai, Y., Hoffman, P. W. (2003) The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 86, 992-1005.
- Borek, C. (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr.* 131, 1010S-1015S.
- Cabrera, A., Martínez, O., Laguna, G., Juárez, R., Rosas, V., Loria, J., Medellín, R., Cerón R., Sánchez, F., Álvarez, L., Rumbo, U., (2008) Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med Int Mex*, 24, 98-103.
- Cai, Z., Rhodes, PG., (2001) Intrauterine hypoxia–ischemia alters expression of the NMDA receptor in the young rat brain. *Neurochem Re.* 26, 487–495.
- Cull-Candy, SG. & Leszkiewicz, DN., (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE*, 16.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335
- Culmsee, C., Junker, V., Kremers, W., Thal, S., Plesnila, N. & Krieglstein, J. (2004) Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke*, 35, 1197-202.
- Chauhan N. B., Sandoval J. (2007) Amelioration of early cognitive deficits by aged garlic extract in Alzheimer's transgenic mice. *Phytother Res*, 21, 629-40.
- Chan, P. H. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21, 2-14.
- Chen, Q., & Reiner, A. (1996) Cellular distribution of the NMDA receptor NR2Ar2B subunits in the rat striatum. *Brain Res*, 743, 346-352.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.
- Durak, I., Aytac, B., Atmaca, Y., Devrim, A., Erol, C., Oral, D. (2004) Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Lif Scienc*, 75, 1959-1966.

- Durukan A, Tatlisumak T. (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, 87, 179-97.
- Furukawa, K., Fu, W., Li, Y., Witke, W., Kwiatkowski, D., Mattson, M., (1997) The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J. Neurosci* 17, 8178-8186.
- Gascón, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Roda, JM., Renart, J., Rodríguez, A., Guerra, M. (2005) Transcription of the NR1 Subunit of the N-Methyl-D-aspartate Receptor Is Down-regulated by Excitotoxic Stimulation and Cerebral Ischemia. *JBC*, 280, 35018–35027.
- Geng, Z., Rong, Y. & Lau, B. H. (1997) S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med*, 23, 345-50.
- Gupta R, Singh M, Sharma A. (2003) Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res.* 48, 209-15.
- Hamanaya R. B., & Chandel, N. S. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochem Sci.* 35, 505-513.
- Hardingham, G., & Bading H. (2003) The yin and yang of the NMDA receptor signaling. *Trends Neurosci.* 26, 81-89.
- Hardingham, G., & Lipton, S. (2010) Regulation of neuronal oxidative and nitrosative stress by endogenous protective pathways and disease processes. *Author manuscript Antiox & Redox Sign*, Epub ahead of print.
- Hossmann, K.A. (1993) Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation*, 26 225-35.
- Hota S, Barhwal K, Singh SB, Sairam M, & Ilavazhagan G. (2008) NR1 and GluR2 expression mediates excitotoxicity in chronic hypobaric hypoxia. *J Neurosci Res.* 86, 1142–1152.
- Horak, M. & Wenthold, R. (2009). Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *J Biol Chem* 284, 9683-9691.
- Hossmann, K.A. (1993) Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation*, 26 225-35.
- Huh, K. H., and Wenthold, R. J. (1999). Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274, 151-157
- Ide, N. & Lau, B. H. (2001) Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J Nutr*, 131, 1020S-6S.
- Kim, J-M., Lee, J-C., Chang, N., Chun, H.S., Kim, W-K. (2006) S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Rad Res*, 40, 827-835.
- Kirino, T., Tamura, A., Keiji, S. (1985) Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Brain Res* 63, 39
- Kohr G. (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*, 326 439-46.
- Lau, C.G., Zukin, R. S., (2007) NMDA receptor trafficking in synaptical plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 8 413-426.

- Liu, A., Hoffman, P.W., Lu, W., Bai, G., (2004) NF- $\kappa$ B site Interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *JBC*. 279, 17449–17458.
- Liu, A., Zhuang, Z., Hoffman, P. W., and Bai, G. (2003). Functional analysis of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A promoter: multiple transcription starts points, positive regulation by Sp factors, and translational regulation. *J Biol Chem* 278, 26423-26434.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., (1994) Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med*, 330, 613–622
- Livak K.J., Schmittgen, T.D., (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C (T))</sup> method. *Methods*, 25, 402-8
- Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R., (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84–91.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Menzies, S., Hoff, J., Betz, A. (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*. 31, 100-6.
- Miao, B., Yin, X. H., Pei, D. S., Zhang, Q. G. & Zhang, G. Y. (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. *J Biol Chem*, 280, 21693-9.
- Modo, M., Stroemer, R., 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*. 104 99-109.
- Munday, J.S., James, K. A., Fray, L.M., Kirkwood, S.W., Thompson, K.G., (1998) Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Atheroscl*, 143, 399-404.
- Nishizawa, Y. (2001) Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci*, 69, 369-81.
- Numagami, Y., & Ohnishi, S. T. (2001) S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr*, 131, 1100S-5S.
- Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G., Lipton, S. A., (2002) Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*, 107 89–96.
- Papadia, S & Hardingham, G. (2007) The Dichotomy of NMDA receptor signaling. *The Neuroscientist*. 13, 6
- Park S, Bae I, Lee Y (2008). Flavonoids-Induced Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$ /2 $\alpha$  Is Mediated Through Chelation of Iron. *Journal of Cellular Biochemistry*. 103: 1989–1998.
- Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., Dirnagl, U. (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 196-205.
- Richter, M., Suau, P., and Ponte, I. (2002). Sequence and analysis of the 5' flanking and 5' untranslated regions of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A gene. *Gene* 295, 135-142.
- Saleem, S., Ahmad M., Ahmad A.S., Yousuf S., Ansari M.A., Khan M.B., Ishrat T., Islam F. (2006) Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia. *J Med Food*. 9, 527-44

Sistema Nacional de Información en Salud (2008). Consultado el 23 de enero de 2011, página web: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>

Stephenson, F A., (2001) Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets*, 2, 233-239.

Wu, H. Y., Yuen, E. Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Matsui, H., Yan, Z. & Tomizawa, K. (2005) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calpain in cortical neurons. *J Biol Chem*, 280, 21588-93.

Yeh, S-H., Hung, J-H., Gean, P-H., Chang, W-C. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protects cultured cortical neurons from lipopolysaccharide-induced cell death via regulation of NR1 Expression. *Jour Neurosci*, 28, 14259-14270.