



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL RESVERATROL EN EL DAÑO
CELULAR, LA PRODUCCIÓN DE EROS Y LA EXPRESIÓN DEL TGF-
β1 EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL EN RATA**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

YASECK TREJO QUIÑONES



MÉXICO, D.F. AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** REBECA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

VOCAL: **Profesor:** MARIA ELENA IBARRA RUBIO

SECRETARIO: **Profesor:** PENELOPE AGUILERA HERNANDEZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

2° SUPLENTE: **Profesor:** MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

ASESOR DEL TEMA: Dra. PENELOPE AGUILERA HERNANDEZ

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):Dr. PAVEL MONTES DE OCA BALDERAS

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): YASECK TREJO QUIÑONES

(nombre y firma)

A Iñaki, porque sin su compañía y aliento me habría resultado muy difícil volver a intentarlo.

A Los Chavos, porque sin ellos mi vida no tendría tanto color.

A mi familia, por ese apoyo incondicional.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1.	Resumen	6
2.	Abreviaturas	8
3.	Introducción	10
3.1.	Isquemia cerebral	10
3.1.1.	Definición de área de isquemia y penumbra	12
3.2.	Principales mecanismos de daño en la cascada isquémica	14
3.2.1.	Falla energética	14
3.2.2.	Onda de despolarización anóxica (DA).	14
3.2.3.	Excitotoxicidad	15
3.2.4.	Ruptura de la barrera hematoencefálica	18
3.2.5.	Inflamación	18
3.2.6.	Contribución de células gliales	19
3.2.7.	Cambios en neurotransmisores y sustancias neuroactivas	20
3.2.8.	Apoptosis	21
3.2.9.	Generación de radicales libres (estrés oxidante)	22
3.2.9.1.	Antioxidantes en la isquemia	28
3.2.9.2.	Resveratrol	29
3.2.9.3.	Efecto del resveratrol en la isquemia	32
3.3.	El factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) en cerebro	34
3.3.1.	Estructura del TGF-β	35
3.3.2.	Receptores del TGF-β	35
3.3.3.	Transducción de señales	36
3.3.4.	Participación del TFG-β en isquemia cerebral	38
4.	Justificación	40
5.	Hipótesis	41
6.	Objetivos	41
7.	Material y métodos	41
7.1.	Animales	41
7.2.	Modelo experimental: MCAO	42
7.3.	Pruebas conductuales	43
7.4.	Administración del resveratrol	43
7.5.	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte neuronal	43
7.5.1.	Perfusión con solución salina y paraformaldehído	43

7.5.2. Tinción con etidina	44
7.5.3. Tinción con fluoro-jade	44
7.5.4. Tinción con hoechst	45
7.5.5. Análisis de imágenes	45
7.5.5.1 Procesamiento de imágenes con el programa <i>“Cell Sens Dimension”</i>	46
7.5.5.2 Cuantificación empleando el programa <i>“Image J”</i>	46
7.6. Evaluación del nivel de expresión del ARNm por PCR cuantitativo	48
7.6.1. Extracción del ARN	48
7.6.2. Síntesis de ADNc	49
7.6.3. Reacción de la cadena de la polimerasa–transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR)	50
7.6.4. Análisis por el método $\Delta\Delta CT$	50
7.7. Diseño experimental	53
8. Resultados	53
8.1. El RSV disminuye la neurodegeneración en ratas sometidas a IR	53
8.2. El RSV diluido en etanol a una concentración baja disminuye la producción de ERO	55
8.3. El RSV aumenta la expresión del TGF- $\beta 1$ a 4 h de reperfusión y la disminuye a 24 h.	59
9. Discusión	61
10. Conclusión	68
11. Referencias	69
12. Anexos	76
12.1. Preparación de soluciones	76
12.2. Curva de validación qRT-PCR	78
12.3. Tabla de resultados obtenidos del análisis con FJ y etidina	81
12.4. Participación en congresos	82

1. RESUMEN

El infarto cerebral es la tercera causa de muerte en el mundo, y la primera causa de discapacidad en países industrializados (SINAIS 2008). En la actualidad, la terapia trombolítica es el único tratamiento aprobado para tratar el infarto cerebral isquémico agudo; sin embargo, existen riesgos secundarios asociados a la recuperación del flujo sanguíneo (reperusión), por ejemplo, el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). El resveratrol (RSV) es un polifenol abundante en diversos frutos y semillas. Su estructura es propicia para secuestrar ERO por los radicales hidroxilo localizados en los anillos aromáticos. Además, se ha reportado que tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticarcinogénicas (antiproliferativas) (Suenaga et al, 2008). El factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) es una citocina multifuncional involucrada en la proliferación, diferenciación, regulación de la matriz extracelular y en la supervivencia celular; también se ha mostrado que tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes y anticarcinogénicos (Suenaga et al, 2008). Ya que estas últimas propiedades coinciden con las del RSV, sugerimos que el TGF- β podría estar involucrado en algunos de los efectos que se han atribuido al RSV. En diferentes modelos animales de daño cerebral isquémico, se ha demostrado que el RSV administrado antes y/o durante la isquemia, o bien, en varias dosis durante la reperusión, tiene un efecto protector; no obstante, durante los primeros 30 minutos de la reperusión se produce la mayor cantidad de ERO por lo que consideramos importante caracterizar el efecto del RSV después de una dosis única administrada al inicio de la reperusión. **HIPÓTESIS.** La administración de RSV al inicio de la reperusión reduce la cantidad de ERO, así como la cantidad de células degeneradas durante la reperusión y aumenta los niveles del ARNm del TGF- β 1 en el modelo de isquemia cerebral inducido por 2 h de MCAO (Oclusión de la Arteria Cerebral Media, por sus siglas en inglés, *Middle Cerebral Artery Occlusion*). **MÉTODOS.** Para comprobar ésta hipótesis, se investigó el efecto protector del RSV en ratas sometidas a MCAO transitoria. Ratas macho Wistar (250-320 g) fueron asignadas al azar en 6 grupos experimentales: control (**CT**); control + vehículo (etanol al 50 % y 7 %) (**CT+VH**), control + RSV (**CT+RSV**); isquémico/reperfundido (**IR**), IR + vehículo (**IR+VH**) e IR + RSV (**IR+RSV**). El RSV (1 mg / kg, *i.v.*) se administró al inicio de la reperusión por la vena

caudal mientras la rata estaba anestesiada. Se utilizó fluoro-jade (FJ) para identificar neuronas degeneradas y se utilizó etidina para medir la producción de ERO en la corteza frontoparietal de ambos hemisferios. El número de células totales se obtuvo mediante el recuento de núcleos teñidos con Hoechst (HCT) (se consideró como el 100%). Para medir los niveles del ARNm del TGF- β 1, se extrajo el ARN total a partir de la corteza ipsilateral a la lesión y se realizó un RT-PCR en tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta$ Ct comparativo. **RESULTADOS.** Se encontró que en el hemisferio ipsilateral a la lesión, la isquemia cerebral indujo degeneración celular. La densidad de células positivas a FJ (CFJ+) aumentó un 96% en el grupo IR con respecto al CT. El tratamiento con RSV previno el daño inducido por la isquemia: el grupo IR+RSV (3.5%) no mostró diferencias significativas con el grupo CT (1.9%). El grupo IR+VH, en el que se administró etanol al 50%, el número de neuronas degeneradas bajó un 54% con respecto al grupo IR, lo que implica un efecto protector por parte del etanol. Por otro lado, las células marcadas con etidina mostraron una disminución de ERO del 9% (grupo IR+RSV) con respecto a un 45.6% del grupo IR. Sin embargo la administración del etanol al 50% aumentó los niveles de ERO un 87%, mostrando la capacidad prooxidante del etanol. Los niveles del ARNm del TGF- β 1 a las 24 h de reperusión disminuyó en todos los grupos y no hubo diferencias significativas entre ellos. Los niveles del ARNm del TGF- β 1 a las 4 h de reperusión aumentó en respuesta a la isquemia (68.7%, grupo IR), al vehículo (65.5%, grupo CT+VH) y al RSV (80%, grupo CT+RSV; 93%, grupo IR+RSV). Por otra parte, los niveles del ARNm de TGF- β 1 disminuyeron 41.2% en el grupo al que se le administró el etanol después de la isquemia (IR+VH). **CONCLUSIÓN.** La administración de RSV al inicio de la reperusión reduce la cantidad de ERO, así como la cantidad de células degeneradas a 24 h de reperusión y los niveles de ARNm del TGF- β 1 aumentan a 4 h de reperusión en el modelo de isquemia cerebral inducido por 2 h de MCAO. Por lo que el efecto del RSV podría estar asociado tanto a la disminución de ERO y a la sobreexpresión de TGF- β 1.

2. ABREVIATURAS.

Δp = Potencial Electroquímico

·OH = Radical Hidroxilo

ADN = Ácido desoxiribonucleico

ADNc = ADN complementario

ARN = Ácido ribonucleico

ARNm = ARN mensajero

ARNr = ARN ribosomal

ATP = Adenosine Triphosphate (Adenosin trifosfato)

CBF = Cerebral Blood Flow (Flujo sanguíneo cerebral)

CNS = Central Nervous System (Sistema nervioso central)

COX = Ciclooxygenasa

DA = Despolarización Anóxica

DAG = Diacilglicerol

DHBA = Dihydrobenzoic Acid (ácido dihidrobenzónico)

DPI = Despolarización en Periinfarto

ERO = Especies Reactivas de Oxígeno

EtOH = Etanol

GSH = Glutación

H₂O₂ = Peróxido de Hidrógeno

IA = Intra Arterial

IGF-1 = Insulin-like growth factor 1 (factor 1 de crecimiento parecido a insulina)

INNN = Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

IP₃ = Inositol Trifosfato

ISMADs = SMADs inhibitorios

LTP = Long Term Potentiation (Potenciación a largo plazo)

MCAO = Middle Cerebral Artery Occlusion (Oclusión de la arteria cerebral media)

MDA = Malondialdehído

mitoK⁺_{ATP} = Canal de Potasio Sensible a ATP en la mitocondria

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NO = Nitric Oxide (Óxido nítrico)

NOS = Nitric Oxide Synthase (Óxido nítrico sintetasa)

O₂⁻ = Anión superóxido

ONNO⁻ = Peroxinitrito

PIP₂ = Fosfatidil Inositol Bifosfato

PKC = Proteína Cinasa C

PTP = Permeability Transition Pore (Poro de transición mitocondrial)

RSV = Resveratrol

SD = Spreading Depolarization (Despolarización repetida)

SMAD = Proteínas homólogas de la proteína de *Drosophila*, Mothers Against Decapentaplegic (MAD) y de la proteína de *Caenorhabditis elegans* SMA (del gen *sma* por small size (pequeño))

SNC = Sistema Nervioso Central

SOD = Súper Óxido Dismutasa

SS = Solución salina

TβR = Receptor de TGF-β

TGF-β = Transforming Growth Factor Beta (Factor de crecimiento transformante Beta)

tPA = tissue Plasminogen Activator (Activador trombolítico de plasminógeno tisular)

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Isquemia cerebral

La patología vascular cerebral es una alteración neurológica, que se caracteriza por la aparición brusca, generalmente sin aviso, de síntomas que pueden variar dependiendo del área del cerebro afectada; entre los síntomas se pueden incluir trastornos en el lenguaje, confusión, cambios en la visión, rigidez y dificultad para controlar los músculos durante 24 horas o más, causando secuelas e incluso la muerte. La patología vascular cerebral destaca como la tercera causa más común de muerte y la principal causa de invalidez en países industrializados (Lakhan et al., 2009, Gabryel et al., 2012, Huang et al., 2004, Liu et al., 2011). En promedio, cada 4 minutos, alguien muere de un evento vascular cerebral (infarto cerebral) (Fundong et al., 2010), y se pronostica que 1/6 de los seres humanos sufrirán al menos un infarto cerebral en sus vidas (Seshadri et al., 2006).

Un infarto cerebral puede ser de tipo isquémico cuando una arteria se obstruye produciendo una interrupción o pérdida repentina del flujo sanguíneo cerebral (CBF, por sus siglas en inglés, *Cerebral Blood Flow*) o bien, ser el resultado de la ruptura de un vaso, es decir de tipo hemorrágico, dando lugar a un derrame. Los eventos de tipo isquémico comprenden cerca del 87% de los casos, y en su mayoría resultan de una oclusión trombótica o embólica de una arteria cerebral mayor (generalmente la arteria cerebral media, MCA, por sus siglas en inglés, *Middle Cerebral Artery*) o sus ramas (Durukan et al., 2007, Rink et al., 2011, Liu et al., 2011). El 10% de los casos son hemorragias intracerebrales, en los cuales se observa una acumulación de sangre dentro del parénquima cerebral producida por la rotura espontánea de vasos profundos la cual no es traumática; mientras que el 3%, son ataques hemorrágicos subaracnoideos, que ocurren cuando un aneurisma se rompe en la superficie del cerebro o cerca de éste y sangra en el espacio ubicado entre el cerebro y el cráneo (Cabrera, 2008).

Existen dos estrategias terapéuticas para disminuir el daño inducido por la isquemia cerebral: la finalidad de la primera es restaurar el CBF (reperusión) a la región comprometida a través del uso de trombolíticos, antitrombóticos y medicamentos antiagregantes (Gabryel et al, 2012). PROACT II es el primer ensayo multicéntrico aleatorizado de trombólisis en pacientes con infarto agudo de duración de menos de 6 horas causado por la MCAO en donde utilizaron la prourocinasa intraarterial (r-proUK); en éste se observó que el tratamiento con r-proUK IA (Intra Arterial) dentro de las 6 horas del ataque isquémico causado por la MCAO, mejoró significativamente los resultados clínicos a los 90 días (Furlan et al., 2003; Fisher et al., 2000). En otro estudio se utilizó Ancrod (un agente desfibrinogenizante derivado de víboras de Malasia) pero en un periodo de 3 horas (Fisher et al., 2000; Sherman et al., 2000); este tratamiento produjo un perfil de riesgo favorable para los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo. Sin embargo, sólo la administración del trombolítico denominado activador de plasminógeno tisular (tPA, por sus siglas en inglés, *Tissue Plasminogen Activator*) está aprobada como tratamiento por la FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*). Es una serina proteasa involucrada en la plasticidad neuronal y en la muerte celular cerebral inducida por excitotoxinas en isquemia. Ésta enzima, cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina, una proteasa activa (Docagne et al., 1999). El tPA rompe la cadena única del plasminógeno en dos cadenas unidas por un enlace disulfuro y la molécula resultante es denominada plasmina. Desafortunadamente, el uso del tPA es limitado a complicaciones de alto riesgo hemorrágico y a una ventana terapéutica muy corta (3 horas) (Docagne, 1999; Fisher, 2000).

A pesar de existir agentes terapéuticos capaces de disminuir el daño inducido por la isquemia, las terapias usadas han fallado en todos los estudios en donde se presentaban pacientes con un infarto de por lo menos 3 horas de duración, por diversas razones: el desajuste en la perfusión y difusión de la sangre, hemorragias, lesiones secundarias a la reperusión, etc; (Fisher et al., 2000). Por lo anterior, se ha puesto en evidencia la necesidad de encontrar una estrategia terapéutica complementaria, la cual debe tener como propósito incrementar la respuesta

citoprotectora endógena y/o reducir la activación de rutas metabólicas que ocasionan daño celular.

Lo anterior nos abre pauta para la segunda estrategia terapéutica, la neuroprotección, que hace referencia al efecto de cualquier sustancia o molécula química o biológica, con efectos protectores en el sistema nervioso que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de enfermedades o lesiones cerebrales. Los compuestos neuroprotectores evitan la muerte de las neuronas o su degeneración.

3.1.1. Definición de área de infarto y penumbra

Como consecuencia del accidente isquémico, pueden distinguirse dos zonas principales en la lesión: el área de infarto (región de isquemia severa) y la zona de penumbra (región que rodea el área de infarto y lo separa del tejido sano). En el área de infarto el CBF se encuentra por debajo del 25% al 10% por lo que se observa la pérdida de oxígeno y glucosa, con la resultante disminución de las reservas de energía. La isquemia severa puede resultar en necrosis neuronal y también puede provocar la pérdida de elementos celulares de apoyo (i. e. células gliales) dentro del área de infarto. Debido a que el tejido localizado dentro de la zona de penumbra está irrigado por arterias colaterales, el daño evoluciona lentamente y el tejido puede mantenerse viable por varias horas. Sin embargo, las células de esta región morirán si la reperusión (reingreso del CBF) no se restablece durante las próximas horas, ya que la circulación colateral es inadecuada para mantener la demanda neuronal de oxígeno y glucosa indefinidamente.

Se ha observado que en la zona de penumbra se activan mecanismos endógenos de neuroprotección. El concepto de neuroprotección en isquemia cerebral está altamente apoyado por la existencia de la penumbra. Existen diferentes regiones en la zona de penumbra: (i) la región de muerte neuronal selectiva, adyacente al infarto; (ii) la región de desnaturalización de proteínas, donde se da la inducción de

proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés, *heat shock protein*); (iii) la región que carece de perfusión y reperfusión, donde se expresa el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y (iv) la región más externa, inducida por una onda de despolarización anóxica que activa genes de expresión temprana (e. g. *c-fos*) (figura 1). En la zona de penumbra, se observa el decremento gradual del CBF, aunque menor que en el área de infarto, lo que conduce bajo ciertas condiciones a una forma retrasada de muerte celular por apoptosis, a un incremento en la activación de rutas moleculares y consecuentemente muchas alteraciones metabólicas. Por ello, la zona de penumbra es considerada como el área que puede ser recuperada con el empleo de una terapia neuroprotectora (Gabryel et al., 2012).

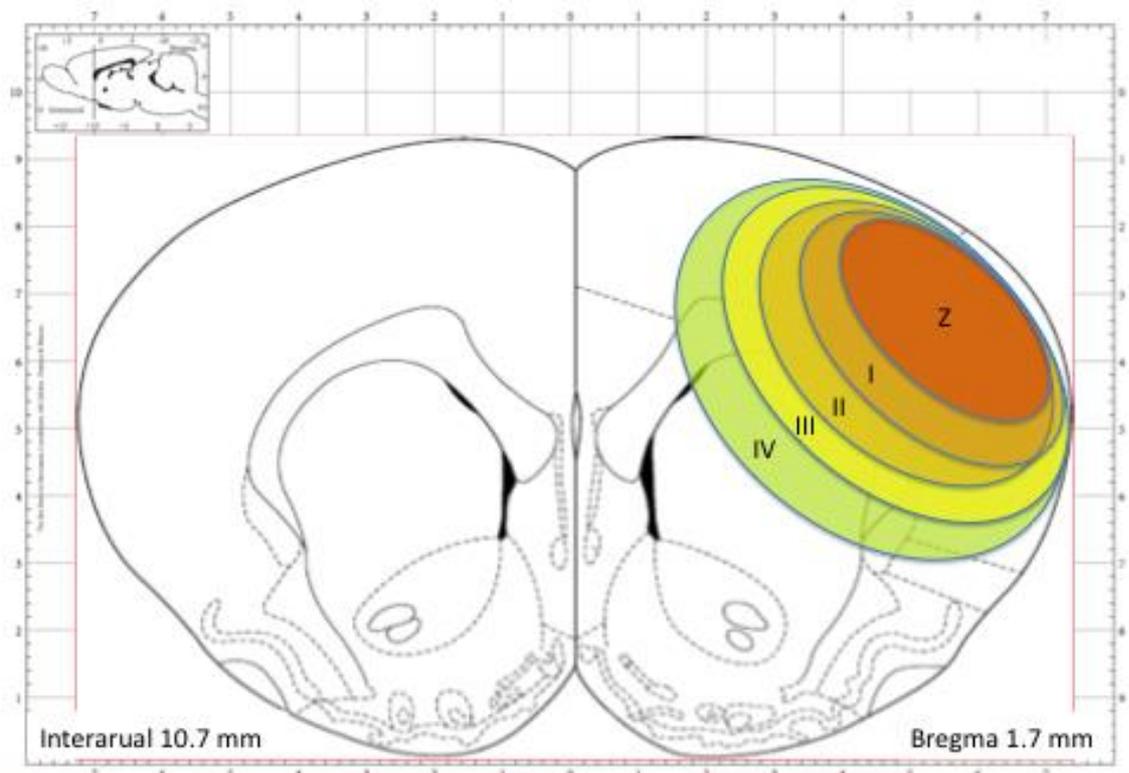


Figura 1. Esquema de la corteza frontoparietal y el daño causado por la isquemia

- Z Zona de Infarto
- I Zona de muerte celular selectiva
- II Zona de desnaturalización de proteínas
- III Zona sin perfusión
- IV Zona de ondas de despolarización anóxica

3.2. Principales mecanismos de daño en la cascada isquémica

Las características del daño causado por la isquemia cerebral dependen de la severidad y duración de la reducción del CBF. Los mecanismos principales causantes de daño en la cascada isquémica incluyen: falla de energía, elevación del nivel de Ca^{2+} intracelular, excitotoxicidad por glutamato, ondas de despolarización anóxica, generación de radicales libres, ruptura de la barrera hematoencefálica, inflamación y apoptosis (figura 2) (Durukan et al., 2007).

3.2.1. Falla energética. La primera consecuencia que tiene la reducción del CBF es el agotamiento de sustratos necesarios para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y producir energía. La privación de oxígeno y glucosa ocurre en cuestión de minutos y dado que las neuronas no tienen reservas energéticas, las consecuencias que acarrea pueden ser múltiples. Por un lado, causa acumulación de lactato por la activación de la glucólisis anaerobia. La acidosis láctica acelera la formación de radicales libres, interfiriendo con la síntesis de proteínas y empeorando el daño celular (Durukan et al., 2007; Huang et al., 2004). Por otro lado, la falla de energía provoca la perturbación de la actividad de proteínas dependientes de ATP (Adenosin Trifosfato por sus siglas en inglés, *Adenosine Triphosphate*) como las bombas de Na^+/K^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que participan en el mantenimiento de los gradientes iónicos y cuya pérdida induce ondas de despolarización (Durukan et al., 2007) (Figura 2).

3.2.2. Onda de despolarización anóxica (DA). En la isquemia cerebral, la falla de la bomba de Na^+/K^+ causada por el agotamiento de ATP, resulta en una onda de despolarización dispersiva (SD, por sus siglas en inglés, *Spreading Depolarization*) de neuronas y glía referida como despolarización anóxica (DA). La DA se propaga a través del infarto provocando la hinchazón dramática de neuronas y glía. Sin la reperfusión inmediata, las ondas de DA definen la región primaria de la muerte neuronal aguda, es decir el área de infarto. Las ondas de DA que se expanden a través de la zona de penumbra, la cual está metabólicamente comprometida que rodea el área de infarto,

se convierten en despolarización transitoria, llamada despolarización en periinfarto (DPI). La DPI ocurre espontáneamente durante varios días en la lesión. Cada DPI se inicia por la elevación en la concentración de K^+ ; por el glutamato, producto de despolarización mantenida en el área de infarto y por la necrosis en el área de infarto. La DPI se propaga desde el área de infarto hasta el tejido sano, siguiendo un gradiente decreciente de estrés metabólico, donde la repolarización ocurre relativamente rápido porque las fuentes de energía no están comprometidas. Es decir, la despolarización y propagación (e. g. SD) depende del grado del compromiso del metabolismo local: aunque las SDs que duran poco resisten en tejido sano, las SDs con mayor duración son dañinas en tejido metabólicamente comprometido. Además, la perfusión puede disminuir transitoriamente durante una SD provocando la expansión de la corteza hipoperfundida. De esta manera, la despolarización y la actividad hemodinámica de SDs recurrentes contribuye al crecimiento del infarto abarcando el área de penumbra, siendo el colapso de la homeostasis iónica, la marca de SD (Risher et al., 2010).

3.2.3. Excitotoxicidad. Con la falla de energía, el potencial de membrana se pierde y las neuronas y la glía se despolarizan, con la consecuente liberación excesiva de aminoácidos excitadores (i. e. glutamato y aspartato) al compartimento sináptico. La activación excesiva de receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) resulta en la desregulación retardada de Ca^{2+} , un proceso dependiente del Ca^{2+} externo. La mitocondria internaliza la mayoría del Ca^{2+} que entra a la célula durante la activación del receptor NMDA; cuando el Ca^{2+} citoplasmático libre sobrepasa su capacidad amortiguadora, se observa un daño mitocondrial irreversible (Nicholls et al., 2000). La generación de ERO por la mitocondria aumenta en las neuronas expuestas a glutamato, y la neuroprotección brindada por los antioxidantes sugiere que éstos radicales tienen un importante papel en la muerte celular y en la desregulación retardada de Ca^{2+} (Nicholls et al., 2000).

En una mitocondria con energía, el consumo de Ca^{2+} a través de la membrana interna es mediada por el uniporter de Ca^{2+} mitocondrial y/o el modo de absorción rápida, además el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, por sus siglas en

inglés, *voltage-dependent anion channel*) en la membrana externa puede modular el acceso de Ca^{2+} al espacio intermembranal.

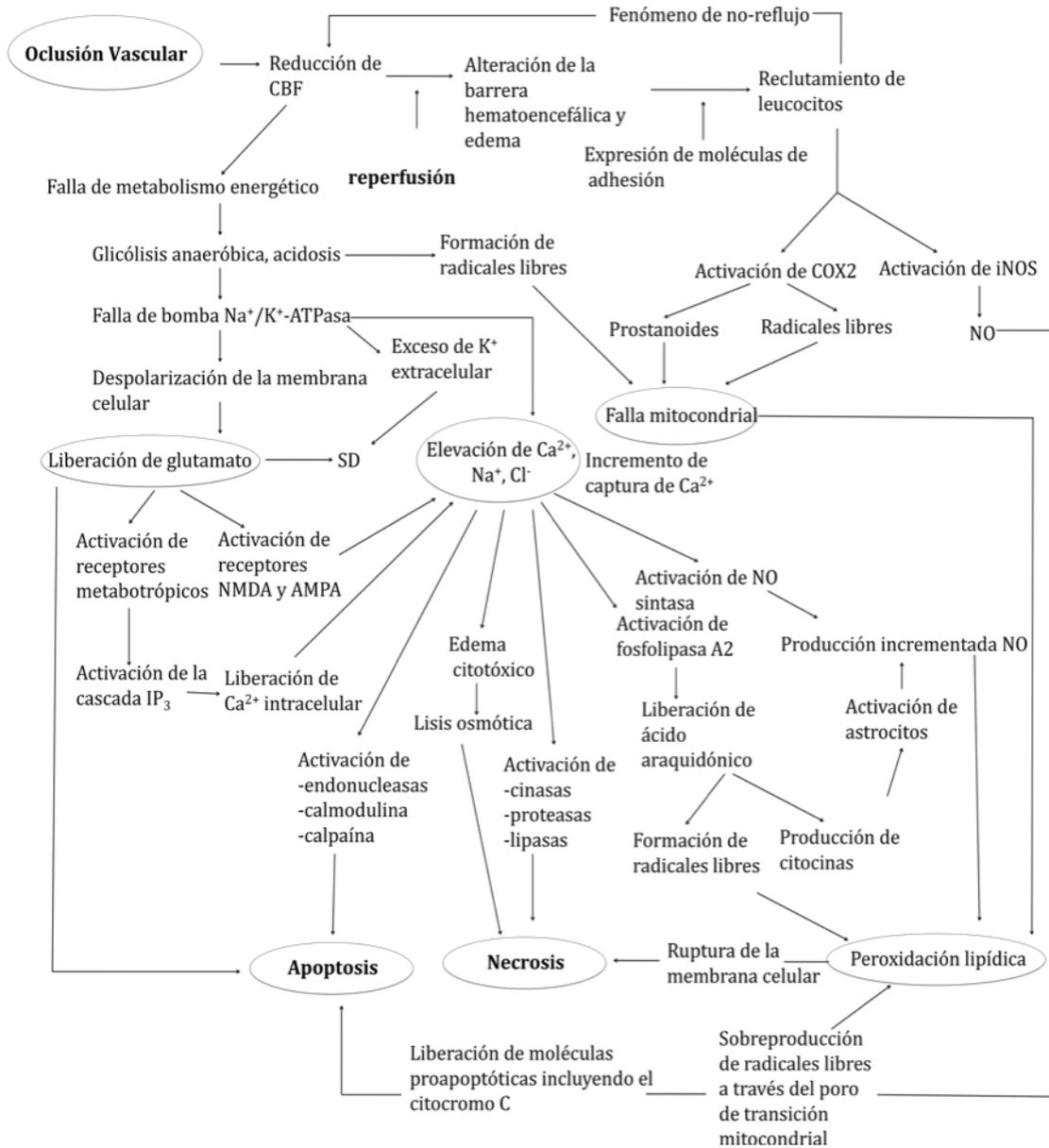


Figura 2. Representación de los principales eventos que ocurren después de la oclusión arterial y la reperusión subsecuente (figura modificada de Durukan et al., 2007).

La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria puede provocar la despolarización mitocondrial de dos maneras; la primera involucra la despolarización parcial, la cual ocurre como resultado del transporte de Ca^{2+} hacia la matriz y el consecuente

aprovechamiento del gradiente de protones. Ésta despolarización se revierte cuando la acumulación de Ca^{2+} se completa y se asemeja a la producida por el aumento en el recambio de ATP, esto refleja una población sana y activa de mitocondrias. En el segundo mecanismo, la acumulación excesiva de Ca^{2+} puede provocar la despolarización irreversible de la mitocondria con activación consecuente del poro de transición mitocondrial (PTP, por sus siglas en inglés, *Permeability Transition Pore*). El incremento en la permeabilidad mitocondrial debido a la formación del PTP ocurre bajo condiciones isquémicas y lleva a un aumento de ERO y a la liberación de moléculas apoptóticas.

La función primaria de la mitocondria es la generación de ATP, un proceso que requiere que el potencial electroquímico (Δp) se mantenga al 80% o al 90% de su máximo nivel. Un colapso extenso del Δp producido, por ejemplo, por la operación del PTP no sólo detendrá la síntesis de ATP sino que también resultará en la inversión de la actividad de ATP sintetasa, lo que puede provocar el rápido consumo del ATP citoplasmático. Además, la generación de ERO por la mitocondria es dependiente del alto potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y se incrementa en la mitocondria con la acumulación de Ca^{2+} .

El Ca^{2+} juega un papel único en la patofisiología isquémica al activar enzimas dependientes de Ca^{2+} que inducen la formación de radicales libres (e. g. formación de óxido nítrico por la sintetasa dependiente de calcio [NOS, por sus siglas en inglés, *Nitric Oxide Synthase*]), la inflamación (e. g. Activación TGF- β dependiente de SMAD), la activación de enzimas como la proteína cinasa C (PKC) (que requiere de calcio, diacilglicerol (DAG) y un fosfolípido para su activación a través de la fosfolipasa C) y tiene como consecuencia la disfunción mitocondrial y la apoptosis (por la δ PKC) cuando hay un exceso de ERO o la activación de las proteínas MAPK de supervivencia por la ϵ PKC cuando hay un nivel medio de ERO (Thompson et. al., 2012), la fosfolipasa A2 (que provocan la acumulación del Ca^{2+} en los líquidos inflamatorios [edema, exudado] y en el plasma), la fosfolipasa C (que cataliza la reacción química entre el 1-fosfatidil-1D-mio-inositol a,5-bifosfato (PIP_2) y el agua dando como resultado inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el DAG); la ciclooxygenasa (COX) (que produce prostaglandinas a

partir de ácido araquidónico), la calpaína (responsable de la proteólisis neutra calcio-dependiente en virtud de un dominio de unión a calcio homólogo a la calmodulina), proteasas (que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas usando la molécula de agua, implicadas en el sistema de complemento, vías de apoptosis, etc.) y endonucleasas (que cortan dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra del ADN, dando lugar a dos extremos). De esta manera, el incremento excesivo del Ca^{2+} intracelular, termina alterando respuestas celulares como la proliferación, la diferenciación celular, la apoptosis, las funciones endócrinas, la función de canales iónicos y la neurotransmisión. Además, se forman productos citotóxicos tales como radicales libres y leucotrienos, e inducción del proceso de inflamación, que en conjunto tienen como consecuencia la inducción de la muerte celular apoptótica y necrótica (Nicholls et al., 2000).

3.2.4. Ruptura de la barrera hematoencefálica. El daño del endotelio vascular durante la isquemia está asociado a la hipoxia, la presencia de moléculas inflamatorias, radicales libres y especialmente a la destrucción de la lámina basal por las metaloproteinasas de la matriz, las cuales son causas potenciales de la ruptura de la barrera hematoencefálica. Este proceso es causa de un edema vasogénico, flujo de sustancias tóxicas, inflamación y presumiblemente complicaciones hemorrágicas después del evento isquémico. El edema cerebral agrava el proceso isquémico por el efecto volumétrico causando compresión local de la microcirculación, aumento de presión intracraneal y trastornos en partes del cerebro. Por otro lado, la restauración tardía del flujo sanguíneo en la isquemia transitoria parece agravar el daño sobre todo el causado a la barrera hematoencefálica, el cual ocurre más temprano que en la isquemia permanente (Durukan et al., 2004). La ruptura de la barrera hematoencefálica continúa por varios días, incluso se observa semanas antes de alcanzar su configuración y funcionamiento normal.

3.2.5. Inflamación. La reducción del CBF, causa el reclutamiento de neutrófilos (Schaller et al 2004) y leucocitos periféricos al tejido isquémico durante la

reperfusión. Todos contribuyen al daño obstruyendo la microcirculación, perturbando la barrera hematoencefálica y propagando la liberación de los mediadores de la inflamación, tales como el factor activador de plaquetas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1- β (IL-1 β) (Fisher et al, 2000; Durukan et al, 2004), causando edema y un ataque hemorrágico subsecuente (Rink et al, 2011; Lakhan et al., 2009).

Por consiguiente, la expresión de moléculas de adhesión intercelulares (CAMs), P-selectinas y E-selectinas, regulada río arriba por las citocinas, se observa en la superficie del endotelio vascular, lo que permite la migración de los neutrófilos y el reclutamiento de los leucocitos desde la sangre al parénquima, seguidos de macrófagos y monocitos durante las primeras etapas de la isquemia (Durukan et al, 2004, Fisher et al., 2000, Lakhan et al., 2009). Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias que llegan al tejido isquémico después de unas horas de la reperfusión; los macrófagos y los monocitos llegan después de días.

Las células inflamatorias activadas y las neuronas dañadas producen un gran número de mediadores tóxicos que pueden empeorar la isquemia. Por ejemplo, los neutrófilos que se filtran producen grandes cantidades tóxicas de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés, *Nitric Oxide*) a través de la activación de NOS inducible. Las citocinas más estudiadas relacionadas a la inflamación en el ataque isquémico son el TNF- α , la IL-1 β , la IL-6, la IL-20, la IL-10 y el TGF- β . Mientras la IL-1 β y el TNF- α , parecen exacerbar el daño cerebral, el TGF- β y la IL-10 son moléculas con actividad neuroprotectora (Lakhan et al., 2009).

3.2.6. Contribución de células gliales. Las células de la microglía son los macrófagos residentes del cerebro y juegan un papel crítico como células fagocíticas en el sistema nervioso central (SNC). Después de su activación por la isquemia, la microglía se transforma en fagocitos que liberan una variedad de sustancias con actividad citotóxica y/o citroprotectora. Por un lado, la microglía ejerce protección produciendo moléculas neurotróficas como el factor neurotrófico derivado del

cerebro, factor 1 de crecimiento parecido a insulina (IGF-I, por sus siglas en inglés Insulin-like growth factor 1) y algunos otros factores de crecimiento. Por otro lado, existe evidencia sustancial que sugiere que la microglía activada en respuesta a la isquemia tiene el potencial de liberar varias citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α , la IL-1 β , y la IL-6, así como otras moléculas potencialmente cito tóxicas incluyendo NO, ERO (e. g. H₂O₂, ácido hipocloroso (HClO), radical hidroxilo (\cdot OH), anión superóxido (O₂⁻) y prostanoïdes (Lakhan et al., 2009). Datos basados en la radiación ósea en ratones con isquemia sugieren que la activación de la microglía residente antecede a la infiltración de macrófagos; la mayoría de los macrófagos en el área de infarto se derivan de la microglía local.

Además de la microglía, los astrocitos también desempeñan una función importante en la inflamación en el cerebro inducida por la isquemia. Bajo condiciones de deficiencia extrema de energía (tal como ocurre en la isquemia), los astrocitos, los cuales contienen reservas de glucógeno, pueden proveer temporalmente de sustratos energéticos a las neuronas al metabolizar la glucosa a lactato a través de la glicólisis (Gabryel et al., 2012). Durante la isquemia, los astrocitos protegen a las neuronas por múltiples mecanismos, incluyendo la regulación de la homeostasis iónica, el control de los niveles extracelulares de glutamato, y regulando la capacidad glucolítica; sin embargo bajo ciertas condiciones, los astrocitos activados contribuyen a la muerte celular isquémica. Los astrocitos, como la microglía, son capaces de secretar factores inflamatorios como las citocinas, quimiocinas y NO. Las respuestas inflamatorias en el cerebro dañado ejercerán efectos significativos en la viabilidad neuronal y en el estado y evolución de la enfermedad.

3.2.7. Cambios en neurotransmisores y sustancias neuroactivas. En modelos animales la evaluación *postmortem* e *in vivo* de cambios neuroquímicos después de la isquemia ha mostrado que mientras el aspartato, glutamato, inosina, hipoxantina, adenosina y γ -aminobutirato incrementan en el periodo agudo isquémico, la glicina parece incrementar en la isquemia prolongada. Algunas sustancias neuroactivas incrementan en la región de penumbra, tales como tirosina hidroxilasa,

neuropéptido Y; y algunos como el neuropéptido Y, leu-encefalina, neurotensina y dinorfina aumentan en regiones que no están infartados como núcleo de la amígdala. Se obtuvieron resultados similares por el método de microdiálisis aplicado a pacientes con un infarto de MCA (Durukan et al., 2004).

3.2.8. Apoptosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular auto-destructiva que involucra la activación de un mecanismo codificado en el genoma de los eucariontes y que depende de ATP. Es desencadenada por muchos procesos, incluyendo la perturbación de la homeostasis de Ca^{2+} (Schaller et al., 2004). Las proteínas Bcl-2 que están en la superficie de la mitocondria, detectan el daño y activan a las proteínas Bax, que crean hoyos en la membrana mitocondrial, causando que el citocromo C salga de la mitocondria. Éste citocromo C se une al factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), que flota libre en el citoplasma para formar un apoptosoma. Este complejo se une a la caspasa 9 (las caspasas son una familia de proteasas de cisteína específicas de aspartato), la cual se ancla a las proteínas de la membrana mitocondrial activando una cascada de señalización que induce la desnaturalización de proteínas y eventualmente la fagocitosis de la célula. La liberación de citocromo c y otras proteínas mitocondriales del espacio intermembranal al citosol es un paso comúnmente crítico en la muerte celular por apoptosis, que puede resultar de la disrupción de la membrana externa mitocondrial debido al hinchamiento asociado con la inducción del PTP (Durukan et al., 2004).

La célula apoptótica presenta un número de características morfológicas: encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina, formación de vesículas en la membrana, fragmentación de la célula por la separación de protuberancias para formar pequeños cuerpos unidos a la membrana que contienen orgánulos intactos y/o grupos densos (cuerpos apoptóticos). Las células apoptóticas son removidas rápidamente por fagocitosis sin desencadenar una reacción inflamatoria. Debido a que el proceso consume energía, es posible solo en condiciones en donde se cuenta con suficiente ATP.

La apoptosis ocurre después del más mínimo daño isquémico, particularmente en la zona de penumbra, una región de tejido poco afectada por la reducción de oxígeno y el suministro de sustratos energéticos en comparación con el área de infarto (Gabryel et al., 2012). Algunos estudios han revelado que células con la morfología de apoptosis se detectan desde 1 y 2 h de reperfusión y alcanza su pico de 24 a 48 h del infarto (Liu et al., 2011; Schaller et al., 2004). El citocromo c se detecta en el citoplasma de algunas neuronas, particularmente en el estriado, después de 90 min de MCAO y 4 h de reperfusión (Schaller et al., 2004). Después de la isquemia, la activación de las caspasas ocurre en respuesta a señales pro-apoptóticas tales como la regulación de Bcl-2 y Bax/Bid y la familia de receptores de muerte. También se ha reportado que las caspasas 1, 3, y 8 están involucradas en la isquemia cerebral (Fisher et al., 2000).

3.2.9. Generación de radicales libres (estrés oxidante). Un radical libre es una especie química (orgánica o inorgánica), que posee un electrón desapareado y que en general es extremadamente inestable y por tanto, tiene un gran poder reactivo. El estrés oxidante es identificado cuando las ERO atacan a las macromoléculas. Las ERO son producidas normalmente en el metabolismo celular y en sus actividades funcionales y cumplen diferentes papeles en la señalización celular. Sin embargo, cantidades excesivas de ERO reaccionan irreversiblemente con proteínas, fosfolípidos secundarios y ADN nuclear causando peroxidación lipídica, daño a la membrana (Gabryel et al., 2012), procesos de alteración celular y mutaciones del genoma. Las ERO pueden alterar procesos como el transporte de electrones en la mitocondria, provocar estrés del retículo endoplasmático y fallas del complejo NADPH oxidasa (NOX) en las membranas celulares. El daño celular causa aberraciones en la homeostasis iónica, señalización y expresión de genes.

Las células normalmente son capaces de mantener la homeostasis de ERO, sin embargo, durante periodos prolongados de disfunción celular, los niveles de ERO pueden incrementar dramáticamente, exceder la capacidad celular antioxidante y causar un daño celular significativo (Lü et al., 2010). El estrés oxidante es controlado por mecanismos endógenos tales como los atrapadores enzimáticos (scavengers) y/o

antioxidantes (e. g. glutatión reducido (GSH), la SOD y las peroxidasas). La catalasa y la SOD disminuyen los efectos dañinos del $O_2^{\cdot-}$, convirtiéndolo en oxígeno y agua. En particular, un contribuidor de daño es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es convertido del $O_2^{\cdot-}$ a través de la SOD. El H_2O_2 altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo cual permite la liberación del citocromo c al citoplasma provocando la apoptosis. Un radical de vida extremadamente corta de gran relevancia biológica es el $\cdot OH$, que se genera al partirse la molécula de agua. El $\cdot OH$ es extremadamente reactivo removiendo electrones de cualquier molécula en su camino, convirtiéndola en un radical libre y propagando una reacción en cadena, pero el H_2O_2 es más dañino para el ADN que el $\cdot OH$ porque su baja reactividad le provee suficiente tiempo para viajar al núcleo. El $\cdot OH$, puede ser producido por reducción directa del H_2O_2 por el $O_2^{\cdot-}$, por transferencia directa de un electrón del $O_2^{\cdot-}$ al H_2O_2 catalizada por metales (reacción de Fenton) o por reacción directa de la ubisemiquinona reducida con el H_2O_2 . Además, La coenzima Q puede intervenir en la formación de $\cdot OH$ al reaccionar con el H_2O_2 en ausencia de iones metálicos como catalizadores y no requiere de protones que compensen la carga.

En condiciones normales, el oxígeno es reducido para producir agua; sin embargo, del 0.1% al 2% de los electrones es reducido parcialmente a $\cdot O_2^{\cdot-}$ y es convertido en H_2O_2 espontáneamente o por acción de la enzima SOD. El $O_2^{\cdot-}$ no es reactivo por sí mismo, pero puede inactivar enzimas específicas para iniciar la peroxidación lipídica en su forma protonada, ($HO_2^{\cdot-}$) hidroperoxilo.

Se han sugerido diversos sitios de producción de ERO, tomando en cuenta a la mitocondria como la mayor fuente de ERO generada dentro de las células. Las ERO son producidas principalmente por el complejo I y III de la cadena transportadora de electrones (Thompson et. al., 2012).

Aunque son varias las fuentes generadoras de ERO (Tabla 1), se considera a la mitocondria como la más importante ya que es la principal fuente energética celular y consume cerca del 85% del O_2 que utiliza la célula. Una de las principales funciones de la mitocondria es generar energía mediante un sistema integrado por cinco complejos

de proteínas. Dichas estructuras proteicas, denominadas complejos mitocondriales y situadas en la membrana interna mitocondrial, funcionan como cadenas transportadoras de electrones a través de una serie de reacciones de oxido reducción (red-ox), siendo una molécula de oxígeno, el último aceptor de electrones en la cadena. Para que se lleve a cabo el proceso en el cual el ATP es producido, llamado fosforilación oxidativa, la cadena transportadora de electrones lanza protones hacia el espacio entre las membranas interna y externa de la mitocondria en forma dependiente del transporte de electrones. La respiración mitocondrial, depende de la actividad de la cadena transportadora de electrones, la cual es regulada por la disponibilidad de oxígeno, ADP, fosfato inorgánico, la magnitud del potencial mitocondrial (determinado por la concentración de protones en el espacio intermembranal), la actividad de las proteínas desacoplantes y el NO.

Tabla 1. Producción endógena de ERO

Enzima o sistema	ERO
CTE: Coenzima Q, cit b ₅₆₆	O ₂ ⁻
NADH deshidrogenasa	H ₂ O ₂
Monoaminoxidasa	H ₂ O ₂
SOD	H ₂ O ₂
NADPH oxidasa (neutrófilos)	O ₂ ⁻
Xantinooxidasa	O ₂ ⁻
Reacción de Fenton	⁻ OH
Oxido nítrico sintetasa	NO ⁻

Como consecuencia de la isquemia y particularmente de la reperfusión, las ERO son producidas durante transformaciones enzimáticas, tales como la conversión del ácido araquidónico a prostanoïdes dependiente de ciclooxigenasa liberando O_2^- y H_2O_2 , y la degradación de hipoxantina catalizada por la xantina deshidrogenasa. Ésta enzima es convertida en xantina oxidasa que también puede catalizar la degradación de hipoxantina en xantina y subsecuentemente en urato. Sin embargo, sólo la xantina oxidasa produce O_2^- en el último paso de ésta reacción (Durukan et al., 2004). Los radicales libres también son generados durante la respuesta inflamatoria después de la isquemia.

En isquemia cerebral, la formación de ERO puede contribuir al daño inducido por múltiples mecanismos tales como la excitotoxicidad y la inflamación. Durante la isquemia, se induce el aumento de las coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$ ya que el oxígeno, que es el aceptor final de los electrones dentro de la mitocondria se encuentra disminuido. En estas condiciones, el Δp aumenta temporalmente, así como la producción de ERO, con la concomitante inhibición de la cadena transportadora de electrones y posteriormente el colapso del Δp , lo que finalmente induce a la disfunción de este orgánulo y eventualmente la muerte celular.

La reperfusión trae consigo el restablecimiento del oxígeno y glucosa y una producción incrementada de las ERO, lo cual trae como consecuencias el daño mitocondrial e inducción de apoptosis. En fracciones de segundo las ERO atacan a lípidos de membrana, activando el ciclo del GSH. Se genera glutatión oxidado que puede formar disulfuros mixtos con proteínas. Segundos después cambia el Δp , se eleva el NADPH, disminuye el ATP, se produce xantina y nuevos ERO (e.g. O_2^- por xantina oxidasa), disminuye la actividad glucolítica, se estimula la actividad poli (ADP-ribosil) polimerasa para reparar el ADN (disminuyen los niveles de NAD^+) y se altera el estado energético de la célula. En una hora disminuye la capacidad de reparación del ADN, disminuye el transporte de Ca^+ al exterior de la célula, el aumento intracelular de Ca^{2+} estimula proteasas y afecta al citoesqueleto además de influir en el equilibrio K^+/Na^+ . La consecuencia es la pérdida de integridad celular (por disfunción

metabólica), daño en citoesqueleto, daños mutagénicos (por daños en ADN), y apoptosis o necrosis (por elevación del Ca^{2+} intracelular) (Thompson et. al., 2012).

Durante condiciones de hipoxia, la cadena transportadora de electrones se detiene, permitiendo a los electrones donados del NADH^+ y del FADH_2 interactuar con el oxígeno en la mitocondria. Los tipos principales de ERO producidos en la mitocondria son O_2^- y H_2O_2 . Si el H_2O_2 no es degradado por los antioxidantes, formará $\cdot\text{OH}$, el cual incrementará durante la fase temprana de la reperfusión después de varios periodos de isquemia. El incremento en el estrés oxidante, ocurrido por el aumento de ERO o el decremento de las defensas antioxidantes, resulta en peroxidación lipídica, y daño a proteínas y ADN.

En contraste a la producción excesiva de ERO generadas por la IR, existe evidencia de que cantidades moderadas de ERO podrían desencadenar vías de señalización protectoras. Por ejemplo, algunos estudios han sugerido que la apertura del canal mitocondrial de K^+ dependiente de ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$) lleva a la generación de ERO en cantidades moderadas, las cuales ayudan a proteger contra la muerte celular inducida por la privación de oxígeno y glucosa. Así, existe un balance delicado entre la formación de ERO en grandes cantidades generadas durante la IR que es citotóxica y los bajos niveles de ERO generados por un antioxidante administrado al momento de la reperfusión que son protectores (Thompson et al., 2012); también proponen que las ERO inactivan la cadena transportadora de electrones inhibiendo la entrada de electrones a la cadena, favoreciendo la generación de bajos niveles de ERO. Además, se ha demostrado que las ERO sirven como moléculas importantes para la señalización que desencadena inflamación y apoptosis (Durukan et., al 2004).

El NO también puede regular la respuesta a la IR al reactivar lentamente la cadena transportadora de electrones. Esto atenúa la sobrecarga de Ca^{2+} , la generación de ERO, y la activación del PTP. El NO también puede competir con el oxígeno para unirse e inhibir a la citocromo c oxidasa cuando el oxígeno es limitado, activando potencialmente la generación de ERO río arriba de los complejos de la cadena transportadora de electrones. El NO puede S-nitrosilar distintos blancos involucrados

en la respiración y en la función mitocondrial, incluyendo la citocromo oxidasa y la proteína 1 relacionada a la dinamina (DRP-1), una proteína asociada con la fisión mitocondrial y la autofagia. Estimulando la autofagia, la producción de ERO mitocondrial puede atenuar la exposición subsecuente al estrés hipóxico severo.

Después de los procesos de inflamación, las células del sistema inmune producen $O_2^{\cdot-}$ y moléculas de NO, las cuales reaccionan para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Éste puede oxidar residuos de cisteína de varias proteínas, incluyendo los complejos I, II, III y V de la cadena transportadora de electrones. Los complejos son inactivados y así el $ONOO^-$ puede inhibir la producción energética de la célula. Sin embargo, bajas concentraciones de $ONOO^-$ pueden servir para reducir la generación de ERO al inhibir el complejo I y III en la mitocondria. La fragmentación del ADN y la apoptosis también son mediadas por el $ONOO^-$, el cual en forma similar al $O_2^{\cdot-}$ y las demás ERO, pueden crear rupturas en la cadena y la activación de la Poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Esta enzima activa a la familia de las proteínas involucrada en la reparación del ADN además puede inducir apoptosis y muerte celular a través de la activación de caspasas (Thompson et al., 2012). Los $\cdot OH$ tienen una vida más corta que el $O_2^{\cdot-}$ y son formados de manera secundaria en la presencia de trazas de hierro metálico y H_2O_2 o alternadamente en la presencia de radicales NO afuera de la mitocondria.

Peters et al. (1998) midieron la formación del $O_2^{\cdot-}$ en un modelo de MCAO permanente y transitoria en ratas y encontraron que éste se incrementa en el borde del infarto. La comparación de ambos modelos reveló que a la media hora de la reperusión se produce un pico de corta duración (incremento de casi 5 veces) en la producción de $O_2^{\cdot-}$, que regresa a los niveles basales hasta pasadas 2 h de reperusión (figura 5). En la oclusión permanente, el incremento se observó de manera más gradual, alcanzando un incremento de dos veces a las 3 horas de la oclusión. Ésta observación es importante ya que el $O_2^{\cdot-}$ es una molécula que sirve como segundo mensajero regulando la expresión de genes cuando se encuentra en concentraciones moderadas.

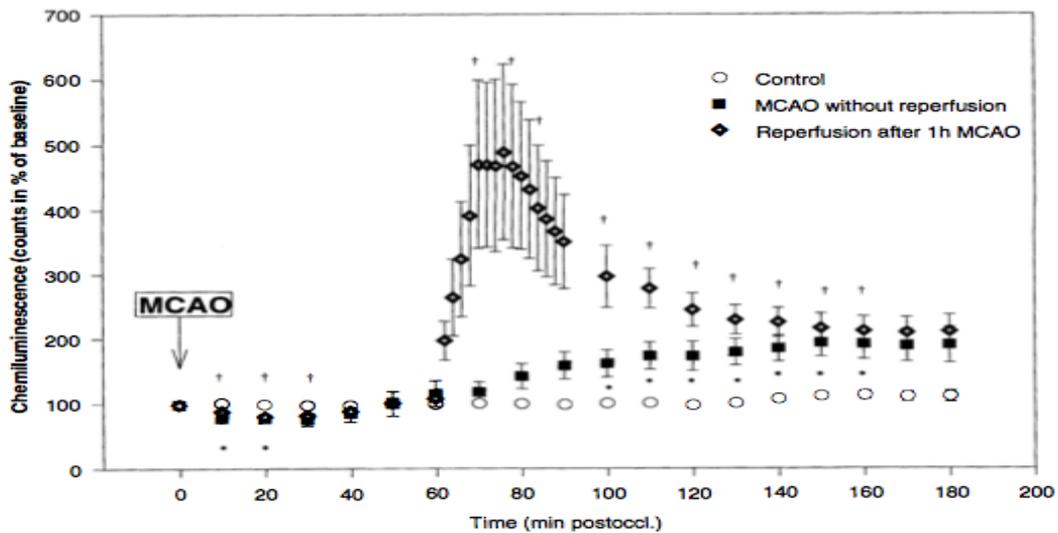


Figura 5. Monitoreo de ERO en un modelo de MCAO en rata. ERO se producen rápida y abundantemente desde los primeros minutos de la reperfusion con respecto a las ratas sin reperfusion y las ratas control.

3.2.9.1. Antioxidantes en la isquemia

Un mecanismo por el cual las ERO generadas pueden participar en la protección, está relacionada con la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP en la mitocondria ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$) a través de la inducción de la producción de ERO. Por un lado, el uso de un antagonista de dicho canal, tal como el ácido 5-hidrodecanoico, bloquea la protección, mientras que el agonista del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$, diazoxida, induce la respuesta protectora. Por otro lado, en cortes de hipocampo en rata, la apertura del canal con diazoxida protege contra la muerte celular inducida por la privación de oxígeno y glucosa, efecto que puede ser prevenido por el scavenger de ERO N-2-mercaptopropionil glicina. Así, el balance alcanzado en la formación de ERO generados durante la IR en presencia de un antioxidante externo o una maniobra como el pre y post-acondicionamiento pueden generar una respuesta neuroprotectora (Thompson et al., 2012). El pre-acondicionamiento se refiere a la preparación del tejido a un cambio brusco con la aplicación de ciertas condiciones, de tal manera que no sufra daño, de la misma manera funciona el post-acondicionamiento, excepto que éste es aplicable en la clínica para pacientes que han tenido un infarto reciente. La aplicación de dichas maniobras puede abarcar desde la recuperación del CBF en tiempos

intermitentes (no de golpe) hasta la aplicación de un antioxidante, o la combinación de ambos.

Debido a que la formación de ERO se incrementa durante periodos de IR, diversos estudios han demostrado que compuestos con capacidad antioxidante protegen el tejido cerebral del daño. Se ha propuesto que las propiedades antioxidantes de estos compuestos están involucradas en su efecto neuroprotector; sin embargo, también se ha determinado que muchos antioxidantes no solo son atrapadores de radicales libres, sino que tienen dianas independientes de las ERO y que pueden estar alterando procesos celulares y moleculares como parte de su mecanismo de acción.

3.2.9.2. Resveratrol (RSV)

El uso de sustancias nutricionales como polifenoles, han demostrado efectos benéficos en la memoria y aprendizaje tanto en animales como en humanos (David Vauzour, 2012). Los polifenoles, son compuestos que se caracterizan por tener muchos grupos hidroxilo en anillos aromáticos y con base en el número de fenoles y su interacción, se dividen en dos categorías: flavonoides y no flavonoides (Figura 6). Los flavonoides tienen 15 carbonos con dos anillos aromáticos conectados con un alquino como puente; los no flavonoides se dividen en ácidos fenólicos y en estilbenos que tienen ésta estructura con dos anillos aromáticos al extremo unidos por un alqueno de dos carbonos y son usualmente sintetizadas en plantas (David Vauzour, 2012).

Se ha demostrado que un estilbeno, el RSV (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno, figura 7), muestra un efecto antioxidante en un modelo de isquemia *in vitro* y en modelos animales de isquemia cerebral (Martínez J et al., 2000; Shin et al., 2010; Lu et al., 2006; Li et al., 2011; Sinha et al., 2002, Junwei et al., 2011). El RSV es un fitoalexeno que está presente en la cáscara de las uvas, el arándano, la mora, la jaca, el maní, así como en una gran variedad de flores y hojas incluyendo al eléboro blanco, el pino

silvestre, el lirio de maíz y el eucalipto. Su nombre fue derivado de su fuente ya que es un resorcinol obtenido de una planta de especie *Veratrum* (Betul Catalgol, 2012).

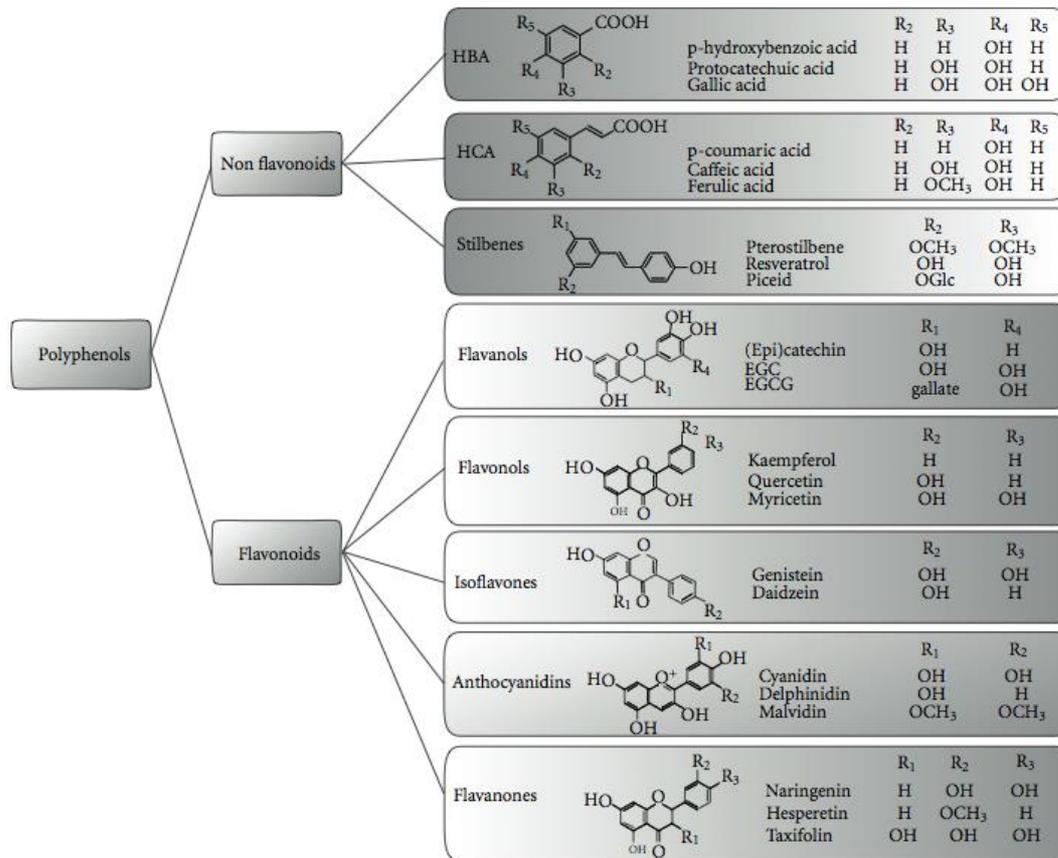


Figura 6. Estructuras de polifenoles (Imagen tomada de Vauzour 2012).

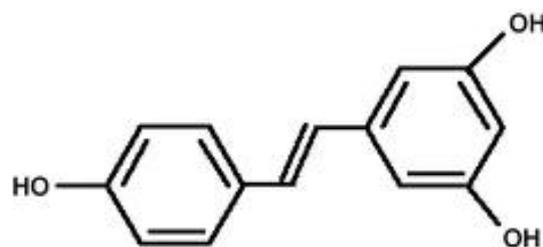


Figura 7. Estructura del RSV

Aislado, el RSV es un polvo blancuzco con fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, peso molecular de 228.25 g/mol y un punto de fusión entre 253 °C y 255 °C, es un compuesto liposoluble, soluble en etanol a 50 mg/mL (aprox. 200 mM) y en DMSO a

16 mg/mL (aproximadamente 70 mM) (Amri, 2012); su hidrosolubilidad de 3 mg/100 mL (aproximadamente 0.13 mM) lo hace prácticamente insoluble en agua de acuerdo a la farmacopea europea.

El RSV puede ser encontrado en las configuraciones *cis* o *trans* (David Vauzour, 2012). El isómero *trans* es biológicamente más activo que el *cis*. El RSV es extremadamente fotosensible; cuando es protegido de la luz, el *trans*-resveratrol es estable por al menos 42 h y por 28 días en amortiguadores con pH 1-7, mientras que la forma *cis* es sólo estable a pH neutro. Del 80-90% del *trans*-resveratrol en solución es convertido en *cis*-resveratrol si se expone por una hora a la luz. También es susceptible a la isomerización inducida por los rayos UV: cuando el *trans*-resveratrol puro es irradiado a 366 nm por 120 min, el 90.6% se convierte en *cis*-resveratrol (Amri et al., 2012).

Para que sea bien tolerado, el RSV no debe sobrepasar una dosis de 5 g/día. Normalmente en el cerebro humano hay niveles menores de 1 nmol/g de tejido, y el RSV libre en el plasma y suero es de menos del 2% del RSV total (tabla 2). El nivel más alto en suero detectado de RSV total (libre y metabolitos) es de 2 µM a 30 min o 1 hora de administración; un segundo pico de 1.3 µM es observado a las 6 h, sugiriendo una recirculación entérica de metabolitos conjugados por reabsorción después de la hidrólisis intestinal. El nivel más alto de RSV libre en suero a 30 min, es de menos de 40 nM o menos de 22 nM. La excreción de la fracción no absorbida representa el 40% del RSV libre, 11% de glucorónido y 3% de conjugados de sulfato en intestino aislado de rata. Más del 90% del RSV libre se une al plasma humano y el 50% del *trans*-resveratrol-3-sulfato, *trans*-resveratrol-disulfatos y el nuevo *trans*-resveratrol-C/O-diglicorónidos del plasma se unen a proteínas (Amri et al., 2012). El RSV sulfatado fue encontrado como el mayor metabolito después de la ingestión oral y esto causa una limitante en cuanto a la biodisponibilidad.

Tabla 2. Localización del RSV en el cuerpo al ser administrado. (Tabla realizada a partir de los datos en Amri et al. 2012)

Tejido/ Localización	RSV total		RSV libre	Derivados RSV
Cerebro	1 nmol/g		-	-
Sangre	Total	2 %	-	-
	Suero	2 μ M a 1 h	22-40 nM en 1/2 h	-
		1.3 μ M a 6 h		
Plasma	-	90 %	50 % conjugados de sulfato	
Intestino	-		40 %	11 % glucorónidos, 3 % conjugados de sulfato

3.2.9.3. El efecto del RSV en isquemia

En roedores con nefrotoxicidad, el RSV preserva la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, la glutatión peroxidasa y catalasa (Martínez et al., 2000; Sebai et al., 2008). En ensayos *in vitro* se ha demostrado que captura al $O_2^{\cdot-}$ (Hung et al., 2002, Beckman et al., 1990), bloquea la oxidación de lipoproteínas de baja densidad por metales (Hung et al., 2002; Brito et al., 2002; Frankel et al., 1993; Amri et al., 2011), bloquea la formación de NO y la COX-2; induce la actividad de la NOS y tiene efecto anti-inflamatorio. El RSV parece incrementar la resistencia del estrés oxidante vascular secuestrando el H_2O_2 y previene la muerte celular endotelial inducida por el estrés oxidante.

El RSV regula vías de señalización relacionadas a condiciones de estrés, enfermedades y envejecimiento. Entre ellas, sobresale la vía de la sirtuína (SIRT) que

actúa en el ciclo celular, respuesta de daño al ADN, metabolismo, apoptosis y autofagia con su actividad como diacetilasa (Della-Morte et al., 2009).

Estudios de isquemia cerebral empleando el modelo de MCAO han encontrado que el RSV, baja los niveles de ERO en corteza y estriado, así como los niveles de IL-1 β y TNF- α y la activación de la microglía (Shin et al., 2010); además, disminuye la inmunoreactividad de astrocitos activada por microglía, la iNOS y la expresión de COX-2 a 6 h y 24 h después del insulto isquémico, así como la inhibición de p-JNK a 1 h y 24 h después de la isquemia (Simao et al., 2012) y baja la expresión de la actividad de MMP-9 a nivel de ARNm (Gao et al., 2005), además baja la actividad del SOD en hipocampo un 20% (Lu et al., 2006), así como los niveles de malondialdehído (MDA) y GSH (Sinha et al., 2002; Junwei Ren et al., 2011), disminuye el volumen de infarto (Li et al., 2012; Gao et al., 2005), reduce la apoptosis neuronal (Junwei et al., 2011) y en la región CA1 del hipocampo previene la disminución inducida por isquemia de Bcl-2 y el incremento en Bax, rescata la incapacidad de LTP (potenciación a largo plazo) (Li et al., 2012), disminuye la muerte neuronal y la incapacidad de excitabilidad de las neuronas piramidales, disminuye la liberación masiva de glutamato (Zhang et al., 2008), aumenta la actividad de SIRT1 en el hipocampo a 48 h y 1 h (Della-Morte et al., 2009) y aumenta los niveles de Nrf2 y HO-1 en el citoplasma de la corteza (Junwei et al., 2011).

En resumen el RSV posee múltiples cualidades biológicas incluyendo efectos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos y antioxidantes, que provocan una reducción en el tamaño del infarto y en el daño por las ERO, evitando además el aumento de enzimas inflamatorias e inhibiendo la actividad de receptores postsinápticos de glutamato. En la tabla 3 se muestran las diferentes condiciones en las que se administró el RSV.

Tabla 3. Estudios donde se encontró que la administración de RSV provoca una disminución en el tamaño de infarto, así como una disminución en producción de ERO e inflamación.

Referencia	Modelo	Dosis de RSV	Tratamiento
Chao Li, 2009	2 h MCAO/ 24h R en ratas de 3 meses (300±50 g)	30 mg/kg; i.p.; diluido en aceite de maíz 10 mg/mL	Tratamiento de 6 días y última admón. 1h antes de MCAO.
Gang Cheng, 2008	4 h OGD/ 20 h R en cultivos neuronales de ratones de 14-16 días	2.5, 5 y 10 µM; diluido en DMSO	1 dosis.
Hua Li, 2010	2 h MCAO/ 24 h R en ratas de 3 meses	30 mg/kg; i.p.; diluido en aceite de maíz 10 mg/mL	Tratamiento de 6 días y última admón. 1h antes de MCAO.
Jin A. Shin, 2010	30 min MCAO/ 3 días R en ratones de 10 a 11 semanas	5 mg/kg machos; 1 mg/kg hembras; diluido en etanol al 30 % en Solución salina (SS) v/v	3 y 6 h después de MCAO
M.C. Saleh, 2010	4 h MCAO/ 4 h R en ratas de 250-300 g	0.002, 0.0002 y 0.0001 mg/kg en 200 µL de SS 0.9%	30 min antes de MCAO i.v.

3.3. El factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) en cerebro

La familia TGF-β es una superfamilia que incluye inhibinas, activinas, hormona anti-mullerina, la proteína del hueso morfogenético y Vg-1 (Pál et al., 2012). La familia TGF-β de citocinas son proteínas que a través de sus receptores regulan la proliferación, el reconocimiento, la diferenciación, la apoptosis, la formación de la matriz extracelular, el ciclo celular, la regulación del desarrollo temprano, la hematopoyesis, la angiogénesis, la quimiotaxia, la migración celular y funciones inmunes (Böttner et al., 2000, Pál et al., 2012, Shi et al., 2003., Vivien et al., 1998). El

TGF- β existe en al menos tres isoformas llamadas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (Pál et al., 2012; Vivien et al., 2008).

3.3.1. Estructura del TGF- β .

Los TGF- β s muestran la típica estructura de las moléculas de señalización que son secretadas, las cuales son sintetizadas como preproteínas: un péptido señal activa al precursor de la molécula de la vía secretora; un pro-dominio de longitud variable se encarga del correcto plegamiento, dimerización de subunidades y regulación de la actividad del factor. El anclaje del pro-dominio en la parte madura de la proteína ocurre en un sitio de anclaje dibásico (motivos RXXR). Al mismo tiempo, un fragmento carboxi-terminal de 110-140 aminoácidos es liberado. La homo o heterodimerización de estos dominios carboxi-terminales generan moléculas biológicamente activas.

En todos los miembros de la familia invariablemente se expresan siete residuos de cisteína en los dominios maduros de las subunidades monoméricas. Seis cisteínas forman una estructura de tres uniones disulfuro intramoleculares llamada “nudo de cistinas”, la séptima cistina hace un puente de cistinas intermolecular que une dos monómeros convirtiéndolos en un dímero funcional (Figura 8) (Böttner et al., 2000).

3.3.2. Receptores del TGF- β .

Estudios de entrecruzamiento han revelado que el TGF- β se une a diferentes proteínas de superficie denominados receptores tipo I (T β R-I; 53 kDa), tipo II (T β R-II; 70-100 kDa) y tipo III (T β R-III; 200-400 kDa) de acuerdo a su tamaño. Los T β R-III, betaglicano y endoglina, pueden modular el acceso de ligandos a los receptores de señalización, mientras que los T β R-I y -II son responsables de la transducción de señales. Las últimas dos moléculas pertenecen a la clase de proteína de los receptores de membrana serina/treonina cinasa, los cuales regulan la transducción de señales de todos los miembros de la familia TGF- β .

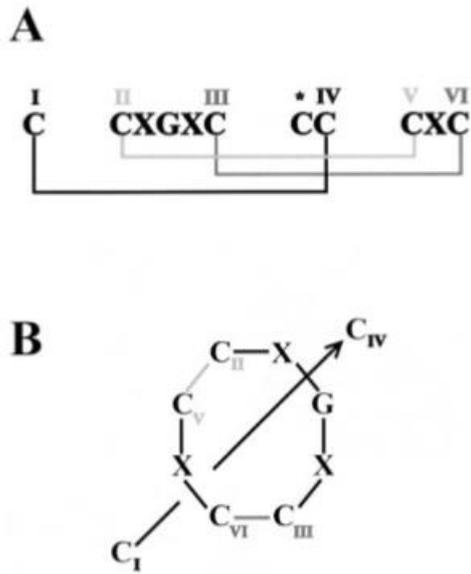


Figura 8. Nudo de cistinas de la superfamilia TGF- β . **A.** Las moléculas relacionadas a TGF- β contienen siete residuos de cisteínas altamente conservadas en la parte madura de las proteínas monoméricas. Seis cisteínas forman tres puentes intramoleculares disulfuro. **B.** Dos uniones de cistina (C_{II} - C_V , C_{III} - C_{IV}) construyen un anillo a través del cual, el tercer puente de cistina (C_I - C_{IV}) pasa. La séptima cisteína restante, marcada con un asterisco en A, forma una unión intermolecular disulfuro uniendo dos monómeros a un dímero.

Los receptores serina/treonina cinasa son glicoproteínas compuestas de una región corta (alrededor de 100 kDa) que se une a ligandos extracelulares, a un segmento transmembranal y a una región intracelular con actividad cinasa. El T β R-I requiere del T β R-II para que se una al ligando, y se requiere de ambos para la señalización; TGF- β se une primero al T β R-II, ésta interacción desencadena el reclutamiento del T β R-I dentro del complejo, proveyendo la base para la señalización río abajo (Böttner et al., 2000).

3.3.3. Transducción de señales. El descubrimiento de las proteínas SMAD han permitido la comprensión de la transducción de señales mediada por TGF- β . De acuerdo a la función y estructura de las proteínas de la familia SMAD, pueden ser divididas en tres subgrupos: el primer subgrupo consiste en las SMADs reguladas por receptores (**R-SMADs**), las cuales son substratos directos de los receptores de cinasa tipo I. SMAD-2 y -3 se asocian con los T β R-I de activina y TGF- β . El segundo subgrupo contiene un mediador común SMAD (**Co-SMADs**), el cual se asocia con los R-SMADs activados, formando complejos heteroméricos que se translocan al núcleo y activan respuestas transcripcionales. De esta manera, SMAD-4 actúa como un componente común de señalización al unirse a R-SMADs activados por diferentes vías de señalización SMAD. El tercer subgrupo comprende los SMADs inhibitorios (**I-SMADs**)

que contrarrestan la actividad de los complejos Co-SMAD/R-SMAD. SMAD-6 y -7 son los I-SMAD de mamífero más divergentes que antagonizan la actividad de TGF- β en tres diferentes niveles por la asociación específica y establece unión con los T β R-I activados: previniendo la unión y la activación de los R-SMADs; por la competencia para unirse a SMAD-4; o por funciones represoras de genes blanco que se activan antes de la señal transcripcional (Figura 9) (Böttner et al., 2000; Shi et al., 2003).

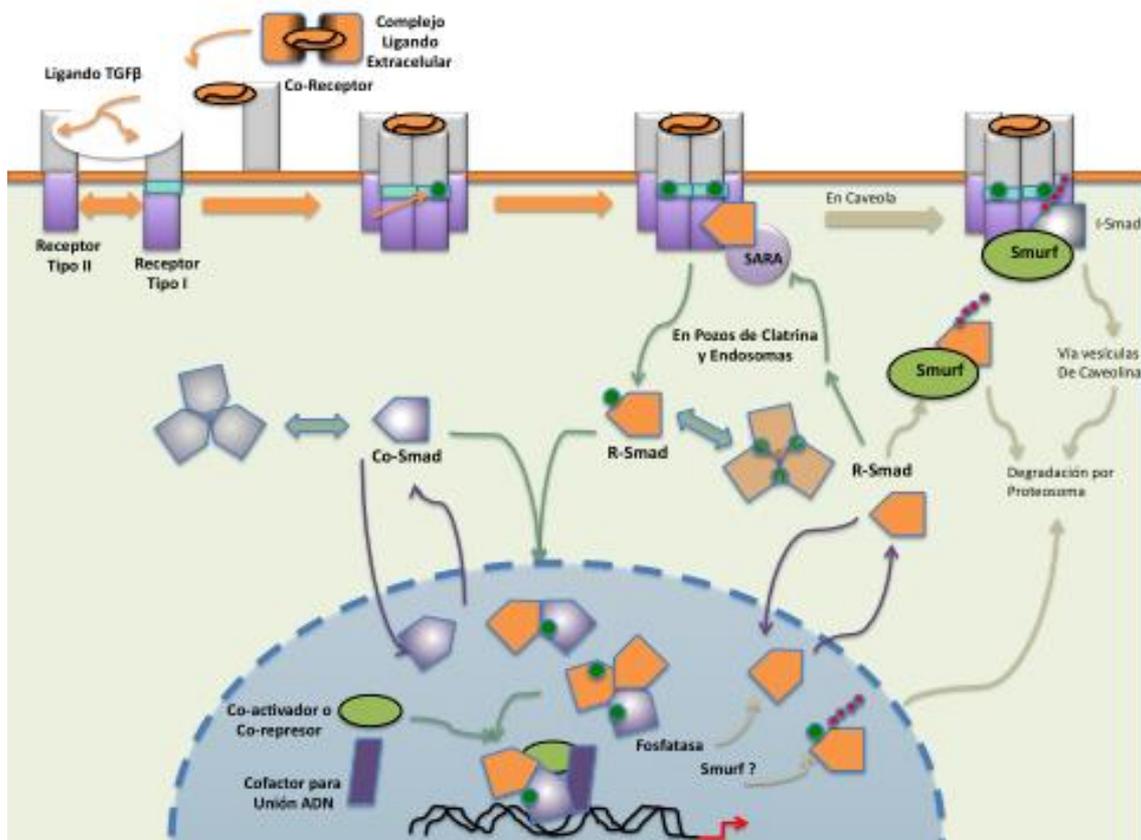


Figura 9. Señalización activada por el TGF- β desde la membrana celular hasta el núcleo. Las flechas indican el flujo de señales y están en códigos de colores: naranja para la activación de ligandos y receptores, gris por la inactivación de SMAD y receptores, verde por la activación de SMAD y la formación de un complejo transcripcional, y azul por el transporte nucleocitoplasmático de SMAD. Los grupos fosfato y la ubiquitina están representadas por círculos verdes y rojos, respectivamente (Imagen modificada de Shi et al., 2003).

La vía de señalización del TGF- β de la membrana celular al núcleo puede ser ilustrada por SMAD-2 (Shi et al., 2003). La activación inducida por un ligando del complejo receptor heteromérico resulta en la fosforilación de residuos de serina en la caja GS del T β R-I. Esto lleva al reclutamiento de SMAD-2 al complejo receptor activado,

SMAD-2 es mediada por chaperonas tipo SARA y termina en la fosforilación del T β R-I. La SMAD-2 es liberada y se asocia en el citosol con SMAD-4, y el complejo proteínico heteromérico se transloca al núcleo, donde se asocia con subunidades unidas al ADN tales como FAST-1 y modula la transcripción específica de genes blanco (e. g. inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). El PAI-1 es producido por los astrocitos y participa en el efecto neuroprotector en la muerte neuronal inducida por NMDA (Docagne et al., 1999). Finalmente, la función de señalización de SMAD-2 es terminada por la conjugación con ubiquitina y la degradación por el proteosoma.

3.3.4 Participación de TGF- β en isquemia cerebral

Los TGF- β s se expresan abundantemente en el SNC y son caracterizados como factores de crecimiento en péptidos relacionados con cualquier daño (Docagne et al., 1999; Vivien et al., 1998). TGF- β 1 es una citocina antiinflamatoria y antioxidante mínimamente expresada en el cerebro intacto pero su expresión aumenta después de un trauma, excitotoxicidad e isquemia/hipoxia (Youngyoung et al., 2006; Henrich-Noack et al., 1996).

Algunos estudios han demostrado que el ARNm del TGF- β 1 es expresado después del daño por isquemia cerebral; estos descubrimientos sugieren que el TGF- β podría jugar un papel crítico en las consecuencias neuropatológicas de la isquemia (Docagne et al., 1999). TGF- β 1 actúa contra diversos retos metabólicos y excitotóxicos; sin embargo, otros estudios han reportado que bajo ciertas condiciones, el TGF- β 1 es capaz de potenciar el daño neuronal inducido por glutamato, producto de despolarización mantenida en el área de infarto y por la necrosis en el área de infarto (Docagne et al., 1999). Algunos de los efectos del TGF- β en astrogliá son antiinflamatorios e inmunosupresores y están implicados en la supervivencia de la astrogliá, por lo que el TGF- β modula la expresión de citocinas importantes involucradas en las reacciones inmunes del SNC. Una gran cantidad de citocinas, incluyendo miembros de las IL y de la misma familia TGF- β , pueden regular la expresión

de TGF- β en astrogli a. En casi todos los contextos estudiados, el TGF- β inhibe el crecimiento de astrocitos (Docagne et al., 1999).

Las c elulas microgliales sintetizan y liberan TGF- β 1 en respuesta a las citocinas proinflamatorias de las familias de la IL, interfer on y TNF. A su vez, TGF- β 1 bloquea la inducción de radicales libres, induce la apoptosis selectiva de la microglía a trav es del mecanismo independiente de Bcl-2, sin alterar a las c elulas supervivientes de astrogli a y oligodendrogliales (Doboly et al., 2012). Se ha demostrado también que los TGF- β s tienen propiedades anti-apoptóticas bajo condiciones isquémicas y no isquémicas; se encontró una activación gradual de las cinasas extracelulares reguladoras de señal 1/2 (ERK1/2) y de la proteína MAPK cinasa-1 activada así como un incremento en la fosforilación de Bad en cerebros de ratón. Consistentemente con estos efectos, el incremento en los niveles de la proteína Bad y la activación de la caspasa 3 fueron suprimidos en el cerebro con el TGF- β 1 (Dobolyi et al., 2012).

Se han sugerido 3 aspectos generales importantes acerca del TGF- β : (a) la ubicuidad aparente de TGF- β en todas las áreas del SNC así como en el sistema nervioso periférico, (b) coexpresión consistente de los TGF- β 2 y - β 3 en neuronas, astrogli a, c elulas de Schwann, y (c) la falta o niveles bajos de TGF- β 1 en el sistema nervioso no lesionado.

El tejido cerebral isquémico posee actividad angiogénica, con grandes cantidades de c elulas endoteliales proliferando en la zona de penumbra. Esta región también contiene microglía/macrófagos activados y astrocitos reactivos, los cuales representan la respuesta inmunológica al daño en el tejido cerebral. Una vez que la barrera hematoencefálica se rompe, los monocitos/macrófagos activados por citocinas como IL-1 (secretados por astrocitos activados u otras c elulas gliales) se infiltran al tejido isquémico. A su vez, los macrófagos secretan TGF- β 1 y otros factores de crecimiento.

TGF- β 1 es capaz de actuar en c elulas tanto inmunes como neurales, regula el tejido dañado y promueve la reparación. Esto puede ocurrir por el incremento de la

producción de Bcl-2 y la disminución de la concentración de Ca^{2+} , protegiendo a las neuronas de la citotoxicidad glutamatérgica y el estrés oxidante (Krupinski et al., 1996).

4. JUSTIFICACIÓN

El infarto cerebral es la tercera causa de muerte y la primera causa de incapacidad en países industrializados (SINAIS 2008); sin embargo, no existe un tratamiento efectivo para evitar el daño que se produce por la IR al deshacer el coágulo con el tratamiento de trombolíticos (i. e. tPA). El modelo de MCAO en ratas es utilizado debido a que produce la oclusión focal de una arteria mayor, el daño causado es similar al observado en los infartos humanos (Prieto-Arribas et al., 2008; Carmichael et al., 2005). Empleando este modelo se ha demostrado que el extracto de ajo envejecido, el cual contiene compuestos con capacidad antioxidante, protege el tejido cerebral del daño inducido por la IR cuando es administrado al inicio de la reperusión (Aguilera et al., 2010). Esto es importante ya que la mayor cantidad de ERO son generados a los primeros 30 minutos de la reperusión (Peters et al., 1998, figura 5). El RSV, sugiere un efecto antioxidante *in vitro* (modelo de privación de oxígeno y glucosa, OGD por sus siglas en inglés, *Oxygen and Glucose Deprivation*) y en modelos animales de isquemia cerebral (Tabla 3); sin embargo, no está caracterizado su efecto protector al ser administrado al inicio de la reperusión.

Igualmente, se ha demostrado que el RSV tiene un efecto protector asociado a sus efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y antiapoptóticos, pero al igual que en el caso de otros antioxidantes, no está claramente establecido su mecanismo de acción. La isquemia cerebral focal transitoria induce cambios en el complejo perfil de expresión génica, la regulación de la concentración de las ERO en el área de penumbra puede activar vías de señalización de supervivencia. El TGF- β 1 es una cinasa cuya activación puede estimularse durante la isquemia moderada y tiene efectos antiinflamatorios similares a los ejercidos por el RSV, por lo que es posible que este último esté mediando su efecto protector a través de la vía de activación del TGF- β 1.

5. HIPÓTESIS

La administración de RSV al inicio de la reperfusión reduce la cantidad de ERO, así como la cantidad de células degeneradas durante la reperfusión y aumenta los niveles del ARNm del TGF- β 1 en el modelo de isquemia cerebral inducido por 2 h de MCAO.

6. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto protector de una dosis de RSV administrada al inicio de la reperfusión en el modelo de isquemia cerebral y su efecto en la expresión del ARNm de TGF- β 1 como parte del mecanismo de acción para proteger a la célula.

Específicos

- Evaluar el efecto de la administración al inicio de la reperfusión de RSV en la degeneración celular inducido por la IR.
- Evaluar el efecto del RSV en la producción de ERO generadas por la IR.
- Evaluar el efecto del RSV en el nivel de expresión del ARNm del TGF- β 1 en el modelo de IR.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales

Se emplearon ratas macho adultas de la cepa Wistar de 250-320 g de peso (aproximadamente 16 semanas de edad). Durante el estudio, las ratas fueron mantenidas en jaulas de acrílico bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 horas de luz/oscuridad). Se les proporcionó agua

ozonificada y alimento (LAB DIET, exclusivo para roedores de laboratorio en etapa de mantenimiento, libre de drogas, antibióticos y estrógenos sintéticos, con formulación y nutrición constante, norma de calidad ISO – 9001:2000) *ad libitum*. Durante el procedimiento experimental se siguieron las reglas de uso y manejo de animales establecido por la norma oficial mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a los principios éticos para las investigaciones médicas descritos por Helsinki y sus enmiendas (Asociación Médica Mundial).

7.2 Modelo experimental: Oclusión de la arteria cerebral media, MCAO

Para simular el daño por IR se utilizó el modelo de MCAO en ratas, ya que ofrece una aproximación más simple y menos traumática comparada a modelos con craneotomía (Tamara, 1981; Macrae, 1992). Para inducir la MCAO se utilizó la técnica descrita por (Longa et al. 1989). Los animales se anestesiaron con isoflurano al 2%. Inicialmente la bifurcación de la carótida cervical fue expuesta a través de una incisión en el cuello del animal. Posteriormente, se introdujo un monofilamento de nylon de 3-0 a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm). En este punto el filamento ocluyó el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media. Después de 2 horas de obstrucción, se realizaron las pruebas conductuales (ver 7.3), se anestesiaron de nuevo y el filamento se retiró cuidadosamente con la finalidad de permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperusión). Las ratas se sacrificaron después de 4 h o 24 h de reperusión dependiendo del experimento. La cirugía fue realizada por la Dra. Alma Ortiz Plata del laboratorio de Neuropatología Experimental, del INNN (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía).

7.3 Pruebas Conductuales

El estado neurológico de cada rata se determinó antes de la reperusión, empleando 2 pruebas conductuales: 1) *Flexión de la pata contralateral a la lesión*, las

ratas se suspendieron por la base de la cola y la postura de los miembros delanteros fue observada. Las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, mientras que los animales con daño doblan la pata contralateral como consecuencia de la lesión; y 2) *Conducta de giro*, las ratas fueron sostenidas por la base de la cola permitiéndoles moverse libremente al apoyar las patas delanteras; se observó 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 presentó una conducta normal y de 1 si se presentó daño. La suma de los valores obtenidos en las 2 pruebas se utilizó como medida para determinar la presencia de un daño cerebral. Los animales que en la evaluación obtuvieron menos de 2 fueron excluidos del estudio, ya que éste valor en el déficit fue asociado a una cirugía inadecuada. Las ratas con déficit neurológico igual a 2 invariablemente presentaron un daño por IR.

7.4 Administración del RSV

Se administró 1 mg/kg de peso corporal de RSV (Sigma Prod. No. R5010) en 100 µL de etanol al 50 % o al 7 % al inicio de la reperfusión (5 mM) por vía intravenosa (vena caudal).

7.5 Evaluación de la producción de ERO y muerte neuronal

7.5.1 Perfusión con solución salina y paraformaldehído (PAF)

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p., *Sedalpharma*[®]). Enseguida se realizó una perfusión intracardiaca con 100 mL de solución salina de fosfatos (PBS) y 100 mL de PAF al 4 % (ver anexo 1). Posteriormente los cerebros fueron post-fijados con PAF al 4% durante toda la noche a 4°C. Los cerebros fijados con PAF fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% en PBS y mantenidos a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio (esto se observa

cuando los cerebros se van al fondo del tubo). Posteriormente, se realizó un corte coronal para extraer la región en la que se incluye la corteza frontoparietal y el estriado (aproximadamente 2.52 mm bregma – 8.28 mm interaural, figura 8A). Inmediatamente los tejidos fueron ingresados en ~1 mL de medio de inclusión O.C.T. (por sus siglas en inglés, Optimal Cutting Temperature, *Tissue Tek*®), se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron inmediatamente o se mantuvieron a -80°C hasta su uso. Se obtuvieron cortes coronales seriados de los tejidos cerebrales (22 µm de grosor) empleando un criostato (*Microm HM 520*) a la altura de la corteza frontoparietal (2.52 mm bregma – 8.28 mm interaural). Los cortes se colocaron en portaobjetos cubiertos con xilano y gelatina al 2% (ver anexo 1). Estos cortes se utilizaron para la posterior tinción con fluoro-jade.

7.5.2 Tinción con etidina

La etidina (D7008, Sigma) es un indicador fluorescente de ERO, especialmente O_2^- . En su estado no oxidado, no tiene carga y permanece en el citosol exhibiendo un color azul, una vez oxidada a dihidroxitidina es capaz de meterse al núcleo por sus cargas positivas y se intercala en el ADN, tiñendo el núcleo de las células de un rojo brillante. A las 24 horas de reperfusión, se administraron 10 mg/kg de etidina por la vena caudal y se dejó distribuir a los tejidos durante 5 minutos. Posteriormente, las ratas se perfundieron con SS y PAF al 4% para obtener cortes coronales como se describe abajo (ver sección 7.5.3.). Los cortes, se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (ver sección 7.5.5.).

7.5.3 Tinción con fluoro-jade

El Fluoro-jade (FJ) (AG310, Chemicon), es un derivado de la fluoresceína que se utiliza para marcar neuronas degeneradas en tejido ex vivo. Los cortes coronales montados fueron postfijados en PAF 4 % por 30 segundos. Posteriormente se sumergieron en una solución de etanol al 70 % (50 mL) por 2 minutos y se lavaron en

agua bidestilada (50 mL) por 2 minutos. Los tejidos fueron transferidos a una solución de permanganato de potasio al 0.06% durante 20 min en movimiento (50 mL). Enseguida fueron lavados con agua bidestilada por 2 min (50 mL). Después, a cada corte se le colocaron 50 µL de una solución de FJ al 0.0004% por 30 minutos a 37 °C y se lavaron 3 veces con una solución (50 mL) de etanol al 0.01 % por 1 min cada vez. Finalmente se removió el exceso de la solución y se dejaron secar a 59 °C por 10 min en horno. Los portaobjetos secos se limpiaron con xilol por 1 min antes de teñirlos con HCT.

7.5.4. Tinción con Hoechst

El HCT 33342 (H21492, Invitrogen) es un marcador fluorescente que se intercala en el ADN, se emplea para visualizar núcleos. Es excitado por la luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm y emite fluorescencia azul/cíán con un pico de emisión de alrededor de 461 nm. Puede usarse tanto en células vivas como fijadas, y se emplean a menudo en sustitución del DAPI, el cual es menos lipofílico por lo que el HCT puede atravesar más fácilmente la membrana celular. Una vez teñidos con etidina y FJ, se le colocó a cada corte 50 µL de HCT (10 µg/mL) en PBS y se incubó en oscuridad por 10 minutos. Se hicieron 3 lavados de 1 min c/u para después ser montados con polymount (10 µL). Finalmente, se analizaron en el microscopio de fluorescencia (ver sección 7.5.5).

7.5.5. Análisis de imágenes obtenidas de las tinciones de etidina, FJ y HCT

Las laminillas se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus modelo 1X81) acoplado a una cámara Hamamatsu (Orca R2) utilizando un objetivo 10X (N.A. 0.4.). Para todos los cortes analizados se adquirieron doce campos adyacentes con los mismos valores de exposición y ganancia para cada uno de los tres canales, incluyen la corteza frontoparietal ipsilateral y contralateral a la lesión; la adquisición se llevó a cabo con: filtro de excitación de 362 nm y 390 nm y de emisión 515-565 nm (amarillo verdoso) para FJ; 490 nm de excitación y 590 nm de emisión para la etidina, excitación 346 nm y emisión 490 nm (azul) para HCT. Las imágenes obtenidas de cada

laminilla se empalmaron y se obtuvo una composición que fue utilizada para determinar el número de células positivas a FJ (CFJ+) y a etidina mediante el análisis de imágenes descrita a continuación.

7.5.5.1 Procesamiento de Imágenes con el programa Cell Sens Dimension

La adquisición de imágenes se llevó a cabo en 16 bits para empalmar y se guardaron como archivos “.tif”. Para iniciar el análisis, se sustrajo el fondo de cada imagen por canal, utilizando una fotografía con la iluminación sin muestra ni portaobjetos, utilizando la función “Background Substraction”: (Process – Enhancement – Background Substraction- OK). Enseguida, se empalmaron las imágenes que formaban el área de la corteza de cada uno de los hemisferios empleando la función “Multiple Image Alignment”: (Acquisition – Gallery – Ctrl+A para seleccionar las imágenes sin el fondo – Process – Multiple Image Alignment – OK). Se separaron los canales y se cambió el formato a escala de grises y 8 bits utilizando la función “Mode”: (My functions – Channels – Image – Mode – Grayscale / 8 bits). Finalmente, las nuevas imágenes de cada canal de la tira se guardaron como archivo “.tif” para su cuantificación como se describe enseguida (figura 10).

7.5.5.2 Cuantificación empleando el programa Image J

Para la cuantificación se utilizó el programa Image J (NIH) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Se abrió la composición en escala de grises y 8 bits del canal del HCT (350 nm), y manualmente se eliminaron las partes no contabilizables de la imagen (i. e. área no perteneciente al interior del cerebro) utilizando la herramienta “freehand selections”. En seguida, se determinó el umbral usando la herramienta “Threshold” de segmentación, tal que nos permitiera seleccionar los núcleos celulares.

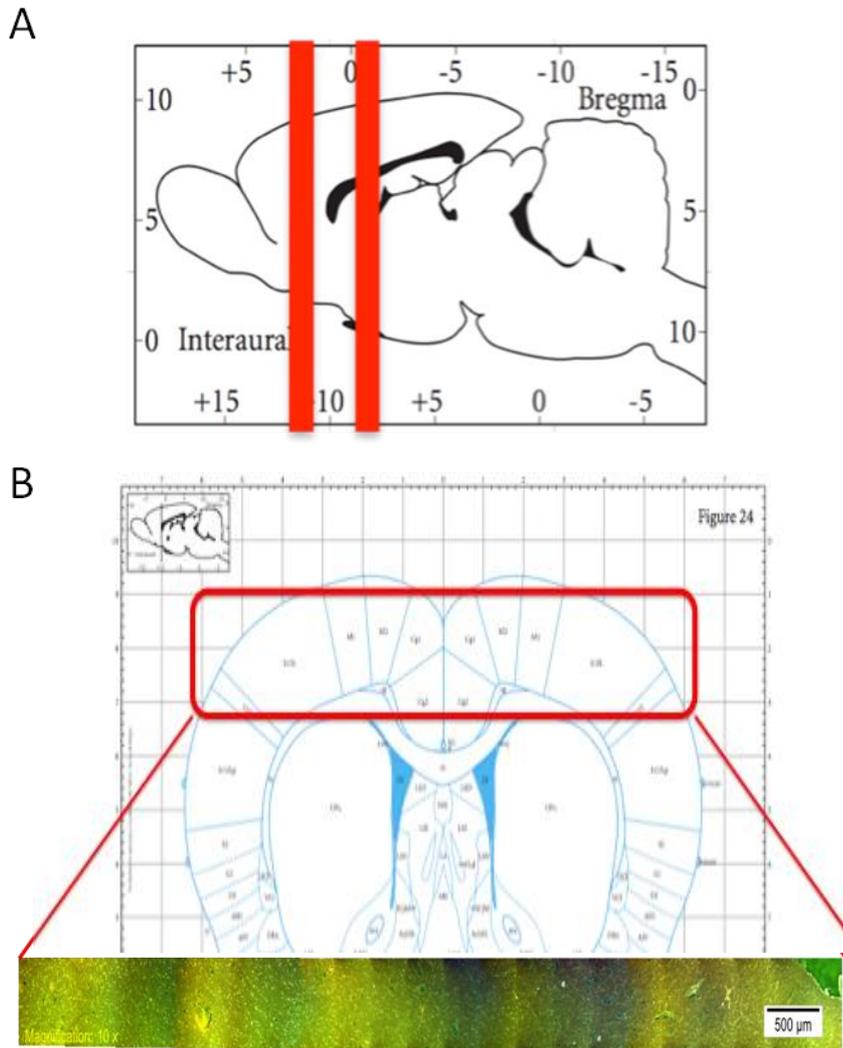


Figura 10. Región del cerebro utilizada para realizar los cortes coronales. **A.** El área entre las dos líneas rojas incluye la zona irrigada por la arteria cerebral media (corteza y estriado) la cual fue ocluida para causar la isquemia (aproximadamente 2.52 mm bregma – 8.28 mm interaural); incluye el área de infarto y la de penumbra. **B.** Dentro del recuadro rojo se muestra la región de la corteza que fue fotografiada, incluye el hemisferio isquémico (izquierdo) como del no isquémico (derecho).

En la segmentación obtenida se cuantificaron las partículas con un tamaño entre 50 y 200 μM (el tamaño de los núcleos teñidos con HCT) mediante la herramienta “Analyze Particles”: (Analyze – Analyze Particles – Size: 50-200 – Show: outlines – Display results – Clear results – Summarize – Add to manager – Exclude on Edges – OK). Mediante ésta segmentación se generó una base de datos con las marcas seleccionadas, las cuales fueron verificadas manualmente para su correspondencia a

núcleos celulares. Enseguida, las marcas seleccionadas fueron convertidas a ROIs y se generó una máscara.

Este procedimiento se realizó con cada una de las imágenes para los otros dos canales para seleccionar y cuantificar la marca positiva de FJ (+) o Etidina. Después se empalmó la máscara de los núcleos celulares) mediante la herramienta "ROI Manager" (ROI Manager – Properties – Color: red – More – Open: RoiSet: canal 350) con las máscaras de ROIs de los otros canales. Éste empalme de máscaras permitió evaluar manualmente la correspondencia a las marcas segmentadas de los canales rojo y verde, descartando la marca no específica y se agregaron manualmente las marcas que no fueron seleccionadas por el programa (T-ROI Manager: Measure). De ésta manera se obtuvieron el número total de células (teñidas con HCT, medido a 350 nm, azul), el total de células positivas a degeneración (teñidas con FJ a 488 nm, verde) y el total de células positivas a producción de ERO (teñidas con Etidina a 594 nm, rojo).

Para cuantificar el área total examinada, se seleccionó toda el área cuantificada para determinar su dimensión con la función "Measure" (Analyze – Tools – Roi Manager – Add (T) – Image – Properties – Unit of Length: μm – Roi Manager – Measure). Los resultados se presentan en densidad.

7.6 Evaluación del nivel de expresión del ARNm por PCR cuantitativo

7.6.1 Extracción del ARN

Se utilizó material de plástico nuevo y libre de RNAsas. El material de vidrio y de metal fue descontaminado utilizando agua oxigenada (sumergiendo el material durante 30 min) y enjuagando con agua tratada con dietil pirocarbonato, (D-5758 SIGMA) (DEPC, ver anexo 1). Se usaron guantes para prevenir la contaminación del material con RNAsas. En todo el procedimiento se utilizó agua libre de RNAsas (H_2O -DEPC).

El tejido (50-100 mg de tejido de la corteza frontoparietal) se homogeneizó con un pistilo de teflón, en 1 mL de TRIzol® Reagent (No. Catálogo 15596-018, INVITROGEN) Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 min a T.A. Se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente usando vórtex durante 15 seg. y se incubó a T.A. durante 2-3 min. En seguida, las muestras se centrifugaron a 12 000 x g por 15 min a 4°C. Se obtuvieron dos fases, una fase inferior roja (fenol-cloroformo), una interfase y una fase superior incolora acuosa. El ARN permanece en la fase superior acuosa. Para precipitar el ARN, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, se agregaron 0.5 mL de isopropanol, se mezclaron con vórtex y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Después de la incubación, se centrifugaron 10 min a 12 000 x g a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1 mL de etanol al 75% en H₂O-DEPC. Se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 7 500 x g durante 5 min a 4°C. Enseguida se eliminó el sobrenadante (cuidadosamente porque la pastilla se despegará fácilmente) y la pastilla se dejó secar a T.A (aproximadamente 10 min). El ARN total se disolvió en 50 µL de H₂O-DEPC. El ARN se mantuvo a 4°C y se cuantificó inmediatamente por espectrofotometría a 260 nm. El ARN que no se utilizó se guardó de -20 a -80°C. Antes, se le agregaron 11 µL de acetato de sodio (2 M pH 4.0) y 700 µL de etanol absoluto por cada 50 µL de ARN en agua. Nota: El ARN en etanol al 75% puede guardarse durante una semana de 2-8°C o durante un año a -5 a -20°C. Para recuperarlo se centrifuga a 7 500 x g durante 5 min a 4°C y se continúa con el lavado.

7.6.2 Síntesis de ADNc

Se mezclaron 5 µg de ARN total, 2.5 µM (50 ng) de hexámeros (Random Hexamers (N8080127, Applied Biosystems) en un volumen final de 17.5 µL de H₂O-DEPC. La mezcla se incubó durante 7 minutos a 65°C. Se pasó inmediatamente a hielo y se mezclaron los otros componentes de la reacción: amortiguador de reacción M-MLV- 5X (M1701, Promega), 500 µM de dNTP's (Deoxynucleoside triphosphate set (1969064, Roche Diagnostics Corporation), 20 U de RNasin® Ribonuclease Inhibitor (N2115, Promega Corporation) y 200 U de M-MLV-RT (M-MLV Reverse Transcriptase (M1701, Promega). Posteriormente se incubó 1 h a 37 °C.

7.6.3 Reacción de la cadena de la polimerasa–transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR)

El análisis de la expresión del TGF- β 1 se realizó con sondas TaqMan[®] específicas para TGF- β 1 (Rn00572010_m1, Applied Biosystems) y como control endógeno se determinó la expresión del ARN ribosomal de la subunidad 18S (18S ARNr), utilizando una sonda TaqMan[®]VIC (4308329, Applied Biosystem). Para una reacción con volumen final de 20 μ L, se ocuparon 10 μ L de la mezcla de reacción Máster Mix (2x) (58003365-01, Applied Biosystems), 0.05 μ L de sonda TaqMan o 0.05 μ L de oligos sense, antisense y sonda del gen endógeno y se completó el volumen de 200 μ L con H₂O-DEPC. Se agregaron todos los componentes excepto el ADNc, se mezclaron y se centrifugaron. Se agregaron 57 μ L de la mezcla a tubos eppendorf de 600 μ L. La mezcla sobrante se utilizó para el control negativo sin ADNc (NTC) (19 μ L por pozo). Se agregaron 3 μ L del ADNc de la dilución de cada muestra de ADNc (1:50) a cada tubo. Se cargaron 18 μ L de cada mezcla en los tubos ópticos. Las reacciones se realizaron por triplicado. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C. Se empleó un detector de PCR tiempo real ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

6.6.4 Análisis por el método $\Delta\Delta Ct$

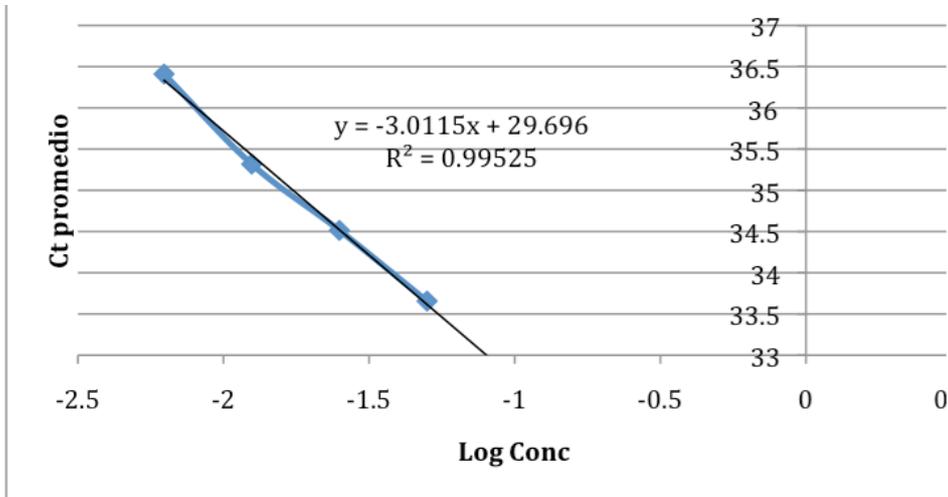
Se realizó la cuantificación relativa de la expresión del ARNm del TGF- β 1. Este tipo de cuantificación mide los cambios del gen de interés *versus* los diferentes tratamientos. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del ARNm del TGF- β 1 (blanco), los datos se normalizan *versus* un gen de expresión constante que se utiliza como referencia endógena (ARNr del 18S) de tal manera que los valores resultantes sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida.

Para normalizar la expresión génica, se utilizó el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ el cual es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra experimental (control) y las diferentes variables.

Para utilizar el método, primero fue necesario realizar un ensayo de validación de los ensayos de amplificación usando diluciones seriadas para el ARNm del TGF- β 1 y para el ARNr del 18S. Se emplearon las diluciones 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160, las cuales nos permitieron detectar una diferencia de un ciclo de amplificación entre cada dilución. Se realizaron las reacciones de RT-PCR y se obtuvieron los Cts (ciclo umbral de detección) para realizar el cálculo de la eficiencia de amplificación. Ésta fue del 93 % para TGF- β 1 y 115 % para 18S (Figura 11; Ver anexo 2).

Posteriormente, para poder utilizar el método comparativo se realizó una curva de rango dinámico de detección para ambos genes. Se obtuvo el ΔCt (Ct TGF β -1 – Ct 18S ARNr) para cada una de las concentraciones utilizadas (Ver anexo 2). La pendiente obtenida de la gráfica fue de -0.84 lo que valida la utilización del método.

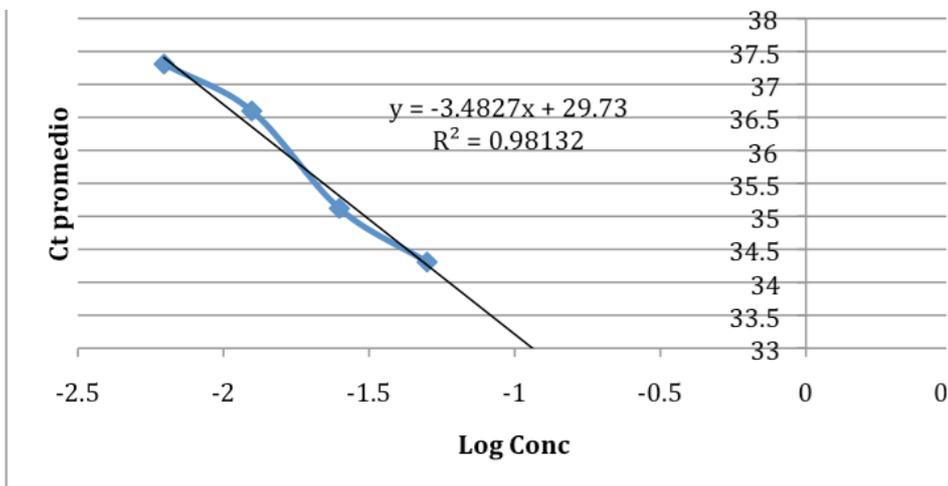
Eficiencia ARNr 18 s



$$m = -3.4827$$

$$E = (10^{(-1/-3.0115)}) - 1 = 93 \%$$

Eficiencia ARNm TGF- β 1



$$m = -3.0115$$

$$E = (10^{(-1/-3.0115)}) - 1 = 115 \%$$

Figura 11. Cálculo de la eficiencia de amplificación del ARNr 18S y el ARNm de TGF- β 1. La recta obtenida permitió calcular la eficiencia de amplificación de la reacción ($E = 10^{(-1/m)} - 1$).

7.7. Diseño experimental

Se realizaron ensayos de RT-qPCR para evaluar la expresión del TGF- β 1 en la corteza frontoparietal ipsilateral a la lesión. Para este análisis los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos experimentales: control (**CT**); control + vehículo (**CT+VH**), al que se le administró 100 μ L de EtOH al 50 o al 7% i. v. por la vena caudal al momento de la reperfusión; control + RSV (**CT+RSV**), al que se le administró 1 mg/kg de RSV en 100 μ L de EtOH al 50 %; el isquémico/reperfundido (**IR**), en el que las ratas se sometieron a dos horas de isquemia y 2, 4 o 24 de reperfusión; el IR más vehículo (**IR+VH**), en el que a las ratas se les administró el EtOH (50%) al momento de la reperfusión; y el IR más RSV (**IR+RSV**), al que se le administró 1 mg de RSV/kg de peso vía i. v. por la vena caudal al momento de la reperfusión. Para evaluar el daño celular se realizó una tinción con FJ en 4 grupos experimentales: **CT, IR, IR+VH e IR+RSV**, y la evaluación se realizó en los lados ipsilateral y contralateral a la lesión. Finalmente, la producción de ERO se evaluó con etidina, para éste ensayo se utilizaron 3 grupos experimentales: **IR, IR+VH e IR+RSV**; en ambos hemisferios cerebrales. No se utilizó el control porque no observó señal positiva en ratas control por lo que el lado contralateral de la lesión fue utilizado como referencia para cuantificar los cambios.

8. RESULTADOS

8.1 El RSV disminuye la neurodegeneración en ratas sometidas a IR

Se realizó una tinción por FJ para evaluar el daño celular ocasionado por la IR, ya que el FJ permite identificar células degeneradas. En el grupo control, observamos un número basal de células (CFJ+) de 5.1 cel/mm². El lado contralateral a la lesión, no mostró diferencias significativas entre grupos, teniendo valores CFJ+ de 1-10 cel/mm². Cuando las ratas fueron sometidas a IR, el número de CFJ+ aumentó un 96 % (128.7 cel/mm²), indicando que la MCAO induce el daño celular. En las ratas del grupo IR+VH 50%, es decir sometidas a IR y tratadas con el vehículo (etanol al 50%) la densidad de

CFJ+ bajó a 59.2 cel/mm², lo que representa una disminución del 54 % con respecto al grupo IR. Con la intención de disminuir el efecto del etanol, se analizó un grupo IR+VH tratadas con vehículo al 7%, en este se observó un CFJ+ de 32.9 cel/mm², lo que representa una disminución del 44 % con respecto al grupo IR+VH 50%. Finalmente, encontramos que el tratamiento con RSV, redujo el daño inducido por isquemia, en el grupo IR+RSV 50% se observó una disminución en la densidad de las células dañadas del 96 % (4.8 cel/mm²) con respecto al grupo IR. Cuando se administró el RSV diluido en 7% de etanol, la densidad de CFJ+ disminuyó a 3.7 cel/mm² (figuras 12 y 14; tabla 4).

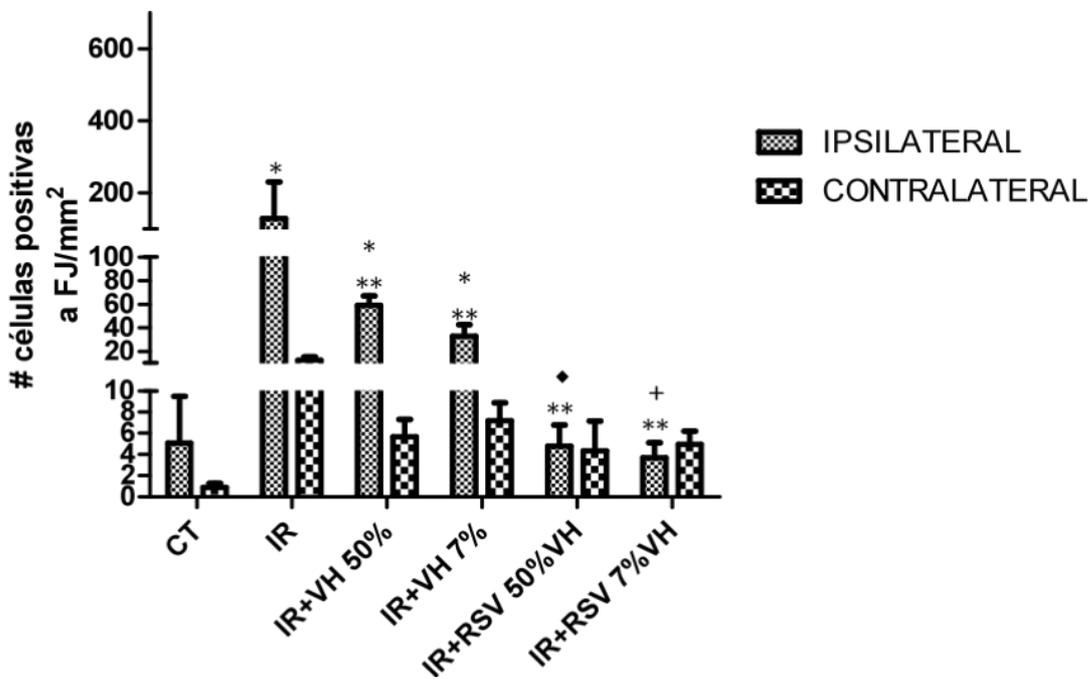


Figura 12. Cuantificación del daño celular. Doce campos consecutivos por corte localizados en la corteza frontoparietal fueron adquiridos usando un microscopio de epifluorescencia (10X). El porcentaje y la densidad de células positivas a fluoro jade (CFJ+) fue determinado usando el programa *Image J*. La densidad de CFJ+ aumentó casi 124 veces (128.7 cel/mm²) en el grupo sometido a MCAO y reperusión (IR). Se utilizaron 6 grupos experimentales; control (CT), control + vehículo (etanol 50 %) (CT+VH), control + resveratrol (CT+RSV), isquemia/reperusión (IR), isquemia/reperusión + vehículo (etanol al 50%) (IR+VH) e isquemia/reperusión + resveratrol (IR+RSV). One way-ANOVA; *diferencia significativa vs CT; **vs IR; w vs IR+VH 50%; +vs IR+VH 7%. $P < 0.05\%$

8.2 El RSV diluido en etanol a una concentración baja disminuye la producción de ERO

Se realizó la detección del marcador etidina en su forma oxidada para evaluar el efecto de la IR y del tratamiento en las concentraciones de ERO. En el análisis de las imágenes en las ratas control no se detectó la marca, por lo que al realizar los estudios en las ratas en donde se les aplicó la maniobra de IR se tomó el lado contralateral a la lesión como control; no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos. En el grupo IR se observaron 31.1 cel/mm² positivas a etidina, es decir mostró un incremento del 68% en las ERO generadas debido a la IR en comparación con el hemisferio contralateral (9.9 cel/mm²). En el grupo IR+VH 50%, al que se le administró el vehículo (etanol al 50%) observamos que el número de células positivas a etidina aumentó a 78.6 cel/mm² en el hemisferio ipsilateral a la lesión, esto es un 87%. En el grupo IR administrado con etanol al 7% observamos un aumento del 80% (50.2 cel/mm²) sin diferencias significativas con respecto al hemisferio contralateral a la lesión.

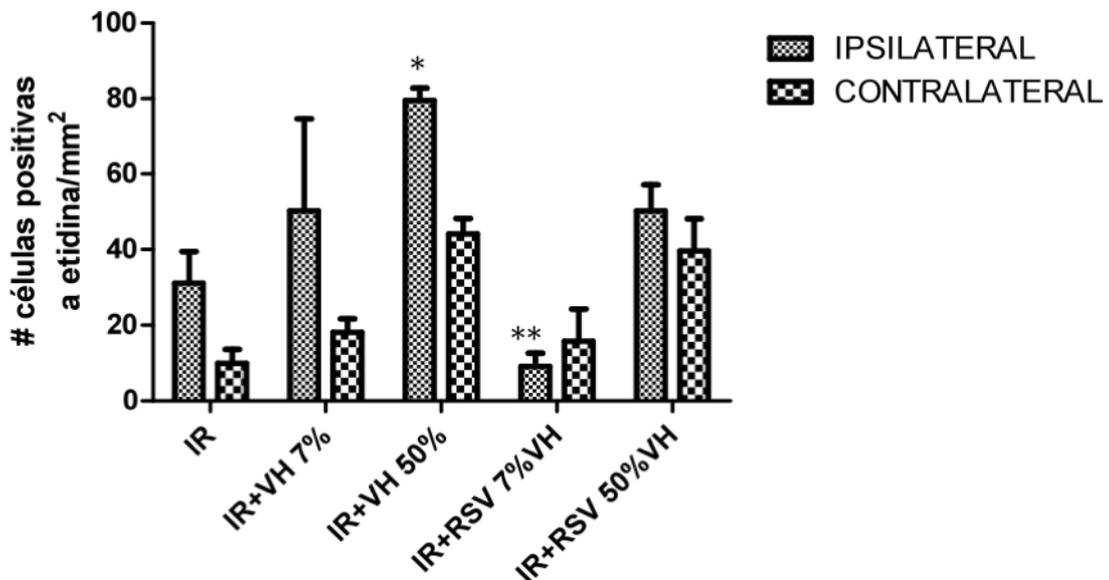


Figura 13. Cuantificación de la producción de ERO. Doce campos consecutivos por corte fueron adquiridos usando un microscopio de epifluorescencia (10X). El área del cerebro localizada en estos campos fue la corteza frontoparietal. El porcentaje y la densidad de células positivas fue determinado usando el programa *Image J*. Se utilizaron 5 grupos experimentales; isquemia/reperfusión (IR), isquemia/reperfusión + vehículo (etanol al 50 %) (IR+VH 50%), isquemia/reperfusión + vehículo (etanol al 7 %) (IR+VH 7%), isquemia/reperfusión + resveratrol en etanol al 50% (IR+RSV 50%VH) e isquemia/reperfusión + resveratrol en etanol al 7% (IR+RSV 7%VH). One way-ANOVA; *diferencia significativa vs grupo IR; **vs grupo IR+VH 50%. $P < 0.05$.

Las ratas tratadas con RSV diluido en etanol al 50% no tuvieron diferencias significativas con respecto a las ratas tratadas con etanol a cualquier concentración. Sin embargo, el grupo de RSV diluido en etanol al 7% tuvo una reducción del 82 % (9.1 cel/mm²) en el número de células positivas a ERO, estadísticamente significativa ($P<0.05$) con respecto a IR+VH 7%. Este efecto mostró los efectos antioxidantes del RSV sin ser enmascarados por las concentraciones altas de etanol y confirmando los efectos prooxidantes del etanol (figuras 13 y 14; tabla 4). También se observa en el lado contralateral a la lesión un incremento de las células positivas a Etidina relacionado a la administración del etanol y su concentración, con una tendencia a incrementar aún más en las concentraciones altas (50%).

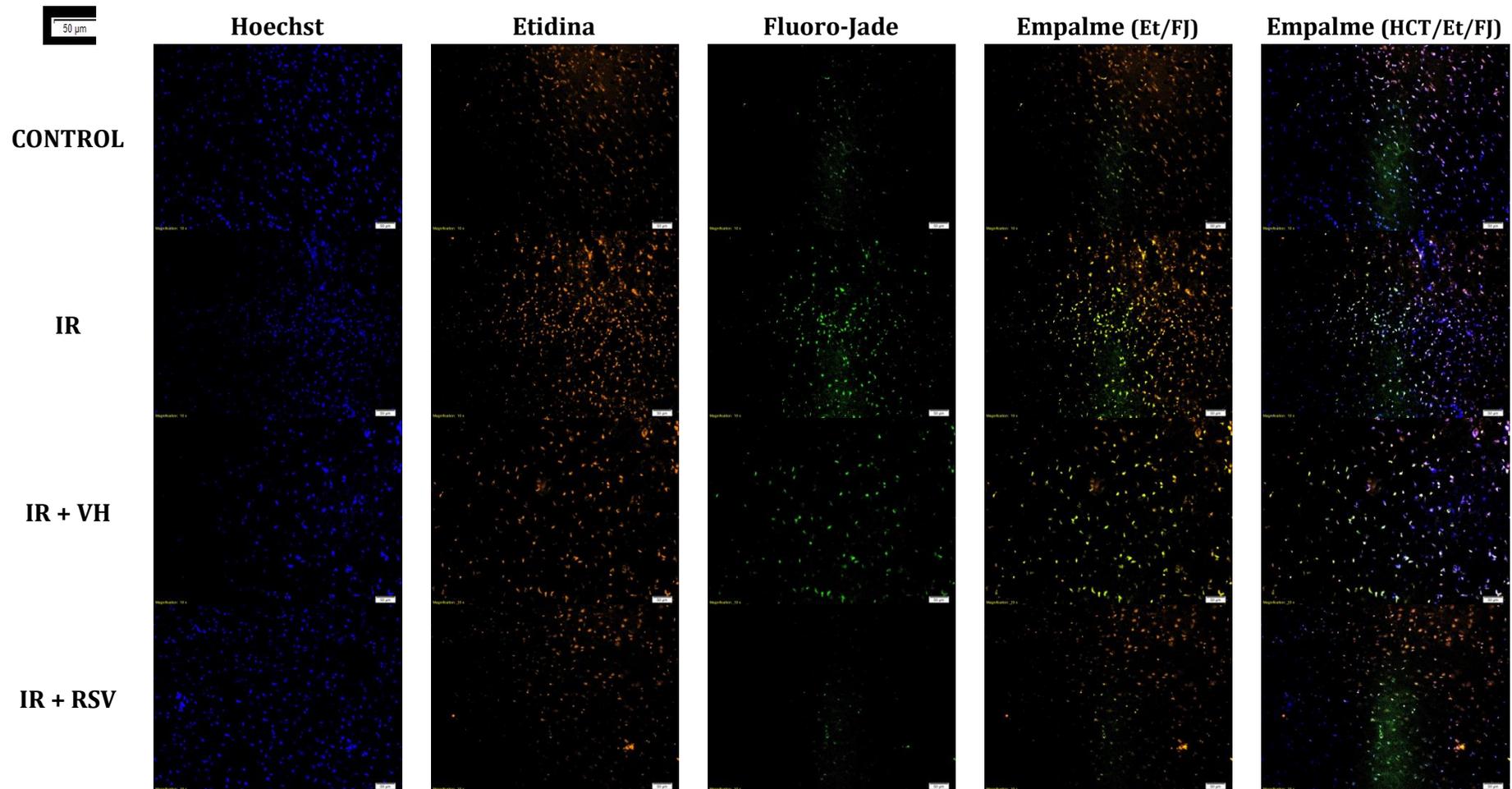


Figura 14. Evaluación de daño celular y la producción de ERO. Ensayos de tinción de inmunofluorescencia, se realizaron utilizando secciones coronales del cerebro a partir de los grupos: control sin isquemia, sometidos a 2 h de isquemia y 24 h de reperusión (IR), sometidos a 2 h de isquemia y 24 h de reperusión más vehículo (IR + VH) y más el resveratrol (IR+RSV), se evaluó el número de células totales con Hoechst. La etidina se muestra en su forma oxidada debido a su interacción con las ERO producidas durante la isquemia. La capacidad antioxidante del resveratrol redujo la señal positiva a Etidina. El Fluoro-Jade (FJ) nos permitió observar las células degeneradas, que

aumentan en número en el grupo de IR y disminuyen con el tratamiento con el vehículo y con RSV. El empalme nos permite ver cómo algunas células teñidas con FJ y etidina se mezclan, lo que sugiere que al menos parte de los daños se puede asociar a los ROS producidos durante la reperfusión.

Tabla 4. Cuantificación de daño celular y producción de ERO. De las fotografías tomadas se hizo una cuantificación en el programa Image J a partir del número total de células (teñidas con HCT) y se sacó el porcentaje y la densidad de células positivas a FJ y Etidina para evaluar el daño celular y la producción de ERO en la isquemia.

		CONTEO TOTAL (#cel)	DENSIDAD HCT	%CEL POSITIVAS FJ	DENSIDAD FJ (#cel/mm²)	%CEL POSITIVAS ET	DENSIDAD ET (#cel/mm²)
CTRL	IPSILATERAL	1791	316.4	1.9	5.1	-	-
	CONTRALATERAL	1592.7	273.4	0.5	0.4	-	-
IR	IPSILATERAL	1457	302.5	44.5	128.7	45.6	31.1
	CONTRALATERAL	1770	491.6	9.5	9.7	14.6	9.9
IR + VH 50%	IPSILATERAL	1091	198.1	29.6	59.2	64.4	78.6
	CONTRALATERAL	745.8	144.3	7.7	5.6	37.2	47.1
IR + VH 7%	IPSILATERAL	1662	110.7	33.7	32.9	53.5	50.2
	CONTRALATERAL	1506.7	76.6	9.3	7.2	23.7	18.1
IR + RSV 50%VH	IPSILATERAL	934.8	182.2	3.5	4.8	46.5	49
	CONTRALATERAL	849.3	178	3.3	4.4	39.3	38.9
IR + RSV 7%VH	IPSILATERAL	1730.5	98.5	3.9	3.7	9	9.1
	CONTRALATERAL	1334	81.5	6	5	18.1	15.8

8.3 El RSV aumenta la expresión del TGF- β 1 a 4 h de reperusión y la disminuye a 24 h.

Se realizó un estudio de RT-PCR para evaluar el efecto del RSV en la expresión del TGF- β 1 en ratas sometidas a 2 horas de isquemia. Un primer análisis se realizó a las 24 h de reperusión, ya que a estos tiempos observamos el efecto protector del tratamiento, se observó una disminución en la expresión del TGF- β 1 en todos los grupos experimentales. Con el control normalizado en 1.0, observamos una disminución del 86% en la expresión de TGF- β 1 al administrarle el etanol al 50% (0.18 ± 0.1). Al administrar el RSV, la disminución fue del 87% (0.17 ± 0.1); al aplicarle la maniobra de IR la disminución fue del 93%, (0.09 ± 0.1); el grupo IR con etanol, mostró una disminución de un 97% (0.03 ± 0.1), al igual que el grupo IR al que se administró el RSV (0.03 ± 0.1) (figura 15). No se encontraron cambios significativos entre los diferentes tratamientos.

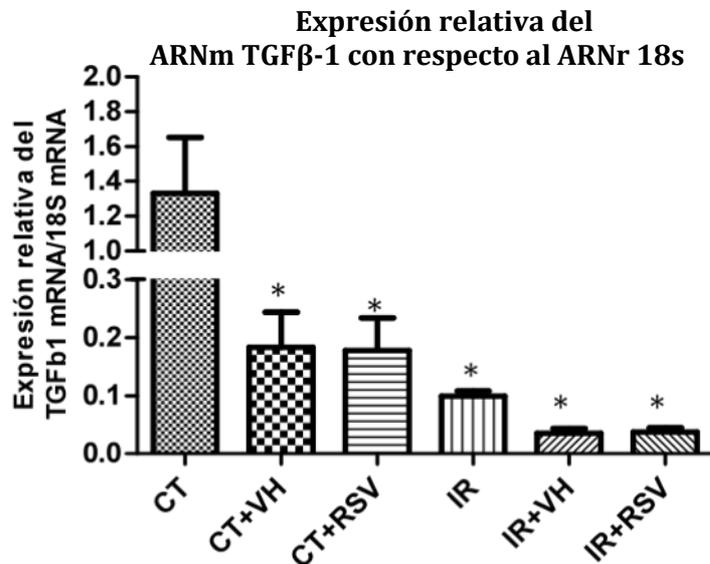


Figura 15. Expresión de TGF- β 1 en isquemia cerebral en ratas sometidas a 24 h de reperusión. Los niveles relativos de ARNm se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta$ CT comparativo empleando un detector de ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Se utilizó ARN obtenido de corteza somatosensorial. Se utilizaron 6 grupos experimentales (n=6); Control (CT), Control + Vehículo (etanol 50 %) (CT+VH), Control + Resveratrol (CT+RSV), Isquemia/Reperusión (IR), Isquemia/Reperusión + Vehículo (etanol al 50 %) (IR+VH) e Isquemia/Reperusión + Resveratrol (IR+RSV). * One way-ANOVA. Diferencia Significativa vs CT. P<0.05%.

Con la intención de determinar si el tratamiento había provocado un cambio en la expresión del TGF- β 1 a tiempos previos se realizó el ensayo a 4 horas de reperusión. Encontramos que los grupos controles [CT+VH (EtOH 50%) y CT+RSV] muestran un aumento en la expresión del TGF- β 1 (2.807 ± 0.1 y 4.747 ± 1.2 , respectivamente). Se observó un aumento de aproximadamente 3 veces en el grupo IR (3.2715 ± 0.7) con respecto al control (1.011 ± 0.1). La administración de RSV a ratas sometidas a IR provocó un incremento de 14 veces (14.9665 ± 0.5). En el grupo IR + VH, observamos que el etanol al 50% previene el incremento en la expresión de TGF- β 1 inducido por la IR, ya que se observan los niveles basales de expresión (1.169 ± 0.4) (figura 16).

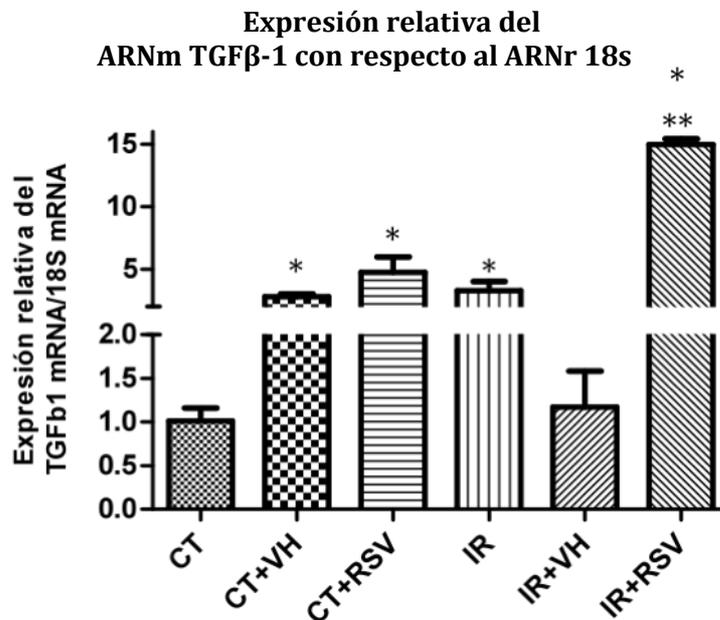


Figura 16. Expresión de TGF- β 1 en isquemia cerebral en ratas sometidas a 4 h de reperusión. Los niveles relativos de ARNm se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta$ CT comparativo empleando un detector de ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Se utilizó ARN obtenido de corteza somatosensorial. Se utilizaron 6 grupos experimentales (n=6); Control (CT), Control + Vehículo (etanol 50 %) (CT+VH), Control + Resveratrol (CT+RSV), Isquemia/Reperusión (IR), Isquemia/Reperusión + Vehículo (etanol al 50 %) (IR+VH) e Isquemia/Reperusión + Resveratrol (IR+RSV). * One way-ANOVA. Diferencia Significativa vs CT; **vs IR. P<0.05%.

9. DISCUSIÓN

Los compuestos polifenólicos producidos por las uvas y encontradas en el vino tinto (e. g. ácidos fenoles, estilbenos (e. g. el RSV), antocianinas, taninos catequinos, flavonoles y flaonas) tienen el potencial de donar electrones o reaccionar con los radicales libres, como el O_2^- , $\cdot OH$ y HO_2^- , producidos durante la IR cerebral y capaces de causar daños irreversibles a las células (Hung et al., 2002). Congruente con estas propiedades, se ha demostrado que la administración de polifenoles, entre ellos el RSV, puede reducir los daños producidos por la isquemia cerebral (e. g. el tamaño del infarto) al modular procesos como la producción de ERO ya sea de manera directa por su molécula capaz de reaccionar con radicales libres o desencadenando rutas metabólicas, y al modular la respuesta inflamatoria (Martínez J et al., 2000; Sebai H et al., 2008; Hung LM et al., 2002; Beckman et al., 1990; Brito P et al., 2002; Frankel EN et al., 1993; Amri et al., 2011).

Se han utilizado en estudios, dosis múltiples de 30 mg de RSV/kg (por 6 días y hasta una hora antes de la isquemia); 0.002, 0.0002, 0.0001 mg/kg (30 min antes de la isquemia) 1 y 5 mg de RSV/kg (3 y 6 h después del infarto). Sin embargo, se ha demostrado que una sola dosis de antioxidantes administrados al inicio de la reperfusión pueden prevenir el daño inducido por la isquemia (Aguilera et al., 2010). En particular un estudio realizado en humanos en donde aplican una bomba de antioxidantes antes y después de la terapia trombolítica para contener el daño causado por un infarto al miocardio (Hicks et al., 2007) mostró mejoras significativas.

Peters et al. (1998) evaluaron la producción de ERO después de 3h de isquemia (gpo II) y 1h de isquemia y 2h de reperfusión (gpo III) comparándolos con los valores de un control (gpo I). Encontraron que al iniciar la isquemia (10 min), el valor de ERO en el grupo II incrementó casi 5 veces después de 10 minutos y se mantuvo elevado por el tiempo que duró la isquemia. En el grupo III, se observó un incremento máximo de un 489 %, al inicio de la reperfusión, posteriormente la producción de ERO en este grupo se mantuvo en un 200% similar al grupo II (figura 5). Estos resultados sugieren

que la administración de antioxidantes al inicio de la reperfusión podrían contener el pico de ERO producido por la reperfusión (Aguilera et al., 2010).

Uno de los mecanismos con el que actúan los antioxidantes puede ser explicado por las vías de señalización accionadas por los radicales libres. El $O_2^{\cdot-}$ es un radical libre que tiene diversas fuentes, una de ellas es la cadena transportadora de electrones que produce constantemente radicales del oxígeno (del 2 - 5 % de los electrones). La formación de $O_2^{\cdot-}$ ocurre en la membrana externa de la mitocondria, en la matriz y en ambos lados de la membrana interna de la mitocondria. Mientras que el $O_2^{\cdot-}$ generado en la matriz es eliminado en ese compartimento, parte del $O_2^{\cdot-}$ producido en el espacio intermembranal puede ser llevado al citoplasma a través de canales aniónicos dependientes de voltaje. La contribución relativa de cada complejo en la producción de $O_2^{\cdot-}$ varía de orgánulo a orgánulo y también depende de la situación metabólica de la mitocondria: respirando (estado 3) o la cadena respiratoria esté altamente reducida (estado 4). Aunque el complejo III es el responsable de la mayoría del $O_2^{\cdot-}$ producido en la mitocondria del corazón y pulmones, en el cerebro bajo condiciones normales la fuente primaria de la formación de $O_2^{\cdot-}$ parece ser el Complejo I (Turrens, 2003). La velocidad de la formación del $O_2^{\cdot-}$ por la cadena respiratoria es controlada básicamente por una acción de masas, incrementa cuando el flujo de electrones baja (aumentando la concentración de donadores de electrones) y cuando la concentración de oxígeno sube. En la ausencia de ADP, el movimiento de H^+ a través de la ATP-sintetasa (complejo V) cesa y el gradiente de H^+ aumenta causando que el flujo de electrones baje y la cadena respiratoria se reduzca. Como resultado, el estado de equilibrio fisiológico de la concentración de $O_2^{\cdot-}$ aumenta (Turrens, 2003).

Nuestro estudio consistió en administrar una dosis de RSV al inicio de la reperfusión, en donde se forma la mayor cantidad de ERO, y evaluar su efecto antioxidante y protector en los cerebros de rata sometidos a MCAO seguidos de reperfusión empleando las técnicas de tinción con FJ y la sonda Et, además de buscar si existe alguna relación entre el RSV y el ARNm de TGF- β 1 para proteger a las células cerebrales.

El FJ es un compuesto selectivo y altamente sensible, utilizado para identificar neuronas degeneradas (Wang et al., 2010). La MCAO causó neurodegeneración, lo cual fue evidenciado mediante la detección de células positivas a FJ+. Utilizando este método, encontramos que las células degeneradas disminuyen con la administración de RSV tanto como con el VH (etanol 50%). Por lo tanto, decidimos reducir la concentración del VH, con la intención de disminuir el efecto sinérgico del etanol y poder evaluar el efecto específico del RSV. Sin embargo, aún utilizando una concentración de etanol al 7% (mínima requerida para disolver la dosis empleada de RSV), se observó el mismo efecto. Esto fue una disminución en el número de células positivas a FJ con un 54-74 % de protección, sin mostrar diferencias significativas entre ambas concentraciones de etanol. Estos resultados coinciden con el trabajo de Liao et al. (2003) donde evaluaron el efecto del etanol en un modelo de isquemia. Encontraron que en el modelo in vivo el etanol (30 μ L al 0.1 %) disminuye el tamaño del infarto y la elevación de mediadores inflamatorios; y en cultivo neuronal, el etanol suprime el estrés oxidante y la apoptosis neuronal inducida por la privación de oxígeno y glucosa.

El consumo moderado de alcohol (1-2 copas diarias) ha mostrado que protege contra enfermedades coronarias (Liao et al., 2003; Catalgol et al., 2012). Sin embargo, la relación entre el consumo moderado de alcohol y el ataque isquémico es controversial. Nosotros hayamos los efectos benéficos del etanol contra la MCAO asociados a una disminución de la neurodegeneración. El probable mecanismo de acción del etanol en el infarto puede estar ligado a su habilidad de inhibir la liberación de aminoácidos excitotóxicos, deprimir la función del receptor de glutamato, y atrapar radicales libres. Ha sido reportado que el etanol inhibe la corriente iónica activada por el NMDA, previniendo la excitotoxicidad en el modelo animal (Liao et al., 2003). Además, en nuestro laboratorio se ha encontrado que el etanol es capaz de inducir una disminución de la expresión de las subunidades NR1 y NR2 del receptor de glutamato tipo NMDA (Tesis Cerón, 2013).

Por otro lado, nosotros observamos que la administración del RSV tiene un efecto adicional (97% de protección) al observado con el vehículo solo (etanol al 7 o

50%). Por lo que es evidente que el RSV es un protector mucho más poderoso que el etanol (independientemente de su concentración), se observó un mayor efecto: 3.5 % RSV vs 29.6 % EtOH.

Un efecto sinérgico entre el etanol y el RSV lo observaron previamente Catalgol et al. (2012). Ellos mostraron que el RSV tiene un efecto negativo en la proliferación de un hematoma de rata y en un hepatoblastoma humano (HepG2), efecto que se vio potenciado al agregar etanol al medio de cultivo.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con una sola dosis de resveratrol (1 mg/kg) al momento de la reperfusión protege contra el daño en la isquemia cerebral. Los resultados apoyan la idea de que el tratamiento con RSV es prometedor por su habilidad de reducir la severidad del daño debido al ataque y podría tener un impacto significativo en la calidad de vida y costos asociados al cuidado de los sobrevivientes a los infartos. Aunque en estudios en pacientes con infarto cerebral no se ha demostrado el efecto protector de antioxidantes, Hicks et al., (2007) determinaron el impacto de las ERO examinando el efecto de vitaminas antioxidantes en cambios Bioquímicos y arritmias inducidos por la reperfusión en corazón antes y después de la terapia trombolítica. Encontraron que aquellos que recibieron antioxidantes, mostraron una disminución en los latidos ventriculares prematuros (100% vs 38%), la fibrilación atrial (44% vs 6%), la taquicardia ventricular (31% vs 0%), el bloqueo atrial-ventricular de primer grado (44% vs 6%), la actividad de la malondialdehído en plasma a la primer hora de trombólisis (1.07 +/- 0.10 vs 0.53 +/- 0.10 nmol de la proteína malondialdehído/mg en plasma) y en los neutrófilos circulando después de 24 h después de la reperfusión. La capacidad antioxidante del plasma fue incrementada de 1.89 +/- 0.15 a 3.00 +/- 0.31 unidades/mg. Éstos resultados sugieren que los antioxidantes pueden ser útiles como adyuvantes al controlar las alteraciones inducidas por la reperfusión después de la terapia trombolítica. Esto nos indica que se mejora el estado general del tejido, por lo que es posible que en la isquemia cerebral una mezcla de antioxidantes produzca el mismo efecto, aunque con diferente mecanismo debido a las diferentes proteínas que se activan.

El papel de los polifenoles para proteger contra el estrés oxidante es un tema de interés y de controversia. Debido a su alta solubilidad en lípidos, varios estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado que el *trans*-resveratrol al ser administrado u obtenido de la dieta, puede depositarse en tejidos de alto contenido lipídico como el SN. El transporte del plasma a blancos intracelulares parece involucrar tanto difusión pasiva como procesos mediados por transportadores (Gonthier et al., 2012).

El cerebro es particularmente susceptible al estrés oxidante debido a su alto consumo de oxígeno, su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y sus bajos niveles de enzimas antioxidantes (Gonthier et al., 2012). En consecuencia, el cerebro es un blanco primario en situaciones en las que los radicales libres están implicados, tales como el envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas y el metabolismo xenobiótico. De hecho, las ERO juegan un papel crítico en la isquemia y el estrés oxidante induce apoptosis, activa la inflamación en las células neuronales y produce neurodegeneración.

La etidina es una sonda fluorogénica útil para la detección de ERO, incluyendo $O_2^{\cdot -}$ en sistemas biológicos debido a que es un compuesto hidrofóbico, sin carga y capaz de cruzar membranas extra e intracelulares. La etidina en el citosol despide una fluorescencia azul, mientras que después de su oxidación por oxidantes como el $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 , se convierte en 2-hidroxietidina (2-EOH) y etidio; este último se intercala con el ADN, tiñendo al núcleo con una fluorescencia roja brillante (Lü et al., 2010).

El porcentaje de células positivas a Etidina fue de 45.6 % después de la isquemia vs un 14.6 % observado en el lado contralateral a la lesión (control). Al administrar el etanol al 50 % se observó que éste porcentaje aumentó a un 82 % mostrando que el vehículo tiene un efecto prooxidante. El efecto adverso del etanol en diferentes funciones del SNC ha sido bien documentado. Debido a la sensibilidad del cerebro al estrés oxidante se ha demostrado que este órgano es un blanco principal del etanol, y su consumo ha sido asociado con el daño severo. Las ERO son producidas durante el metabolismo normal de la célula al igual que después de la exposición a varios

xenobióticos incluyendo el alcohol, el cual se ha demostrado que tiene la habilidad de incrementar el estrés oxidante, al aumentar la producción de ERO y la formación de productos de peroxidación lipídica (Gonthier et al., 2012).

Adicionalmente, observamos que las ERO producidas en ratas sometidas a IR y tratadas con RSV diluido en etanol al 50%, no fueron significativamente diferentes con las producidas en ratas sometidas a IR y tratadas con etanol a cualquier concentración (7 y 50%). Esta respuesta parece estar asociada al efecto prooxidante del etanol discutido previamente. Por ello, decidimos bajar al máximo la concentración de etanol empleada (7%), esto es, a la concentración mínima en donde se puede disolver el RSV usando una dosis de 1 mg/kg de peso. En estas condiciones observamos que el grupo IR tratado con RSV diluido en etanol al 7% presentó una reducción de ERO del 82 % significativamente menor a la de los otros grupos.

Este resultado sugiere que el RSV tiene un efecto antioxidante que puede contrarrestar el efecto pro-oxidante del etanol. Congruente con esta interpretación Tiwari et al. (2013) quienes estudiaron el efecto del RSV en las ERO producidas por una dosis diaria de etanol (10 g/kg) durante 10 semanas, encontraron que el RSV tiene un efecto protector contra el estrés oxidante en ratas. Demostraron que el etanol disminuye la concentración de glutatión reducido y la actividad enzimática del SOD y la catalasa en la corteza e hipocampo de ratas tratadas con etanol; éste efecto se redujo de manera dependiente de la dosis de RSV (5, 10 y 20 mg/kg) en ambas áreas del cerebro de las ratas tratadas con etanol.

De hecho el RSV contenido en el vino tinto, ha sido implicado en la “paradoja francesa”, un fenómeno que caracteriza la baja incidencia de la enfermedad coronaria en el sur de Francia a pesar de su dieta alta en grasas saturadas. Numerosos beneficios del RSV han sido reportados (e. g. anticancerígeno, antiviral, antiinflamatorios antienvjecimiento) pero la mayoría de las acciones biológicas protectoras han sido relacionadas a sus propiedades intrínsecas “scavenger”. Adicionalmente, se ha demostrado el efecto neuroprotector del RSV contra la toxicidad producida por el etanol en cultivos de astrocitos (Gonthier et al., 2012). En este mismo sentido, existen

estudios que documentan que la ingesta de vino tinto sin alcohol mejora la función endotelial y baja los efectos adversos de fumar en la presión sanguínea sistólica e incrementa la vasodilatación. Además muchos factores como las proteínas, carbohidratos, fibra, grasa y el alcohol han sido sugeridos como modificadores positivos o negativos para la absorción de polifenoles (Catalgol et al., 2012). Por lo que con nuestros resultados podemos concluir que la protección ofrecida por el *trans*-resveratrol contra el estrés oxidante depende de la concentración del etanol y sólo pudo observarse empleando la concentración más baja.

Nuestros resultados demostraron que el RSV tiene un efecto protector cuando es aplicado en una dosis única al inicio de la reperfusión. Aunque el efecto protector del RSV ha sido muy estudiado en diversos modelos experimentales, sus mecanismos de acción aún son controversiales y pobremente definidos.

Se ha observado que durante la isquemia se desencadena una cascada de respuestas antiinflamatorias que incluyen la activación del TGF- β 1. Debido a que el RSV además de su actividad antioxidante presenta propiedades antiinflamatorias, las cuales están ligadas con su efecto protector, decidimos evaluar su efecto en la expresión de TGF- β 1.

En el presente estudio, hemos confirmado que el ARNm del TGF- β 1 incrementa 4 h después de la isquemia y aún más dramáticamente al administrar el RSV. Resultados similares se encontraron en un estudio realizado por Kim et al. (2012) en donde evaluaron la protección mediada por el isofluorano contra el daño inducido por 30 min de isquemia y 4 h de reperfusión en intestino. Este grupo encontró que la exposición a isofluorano incrementó el nivel de TGF- β 1 en las células epiteliales de intestino y en plasma. El intestino ha sido propuesto como la fuente de citocinas pro-inflamatorias que pueden llevar al desarrollo del síndrome de respuesta sistémica inflamatoria y sepsis con falla multi-orgánica subsecuente. Los anestésicos volátiles como el isofluorano, son administrados como anestesia general en ratas, además de sus efectos anestésicos, el isofluorano es anti-inflamatorio y citoprotector a través de la liberación de TGF- β 1.

Por otra parte, a 24 horas observamos una disminución en la expresión de TGF- β 1, Resultados similares se observan en los estudios de Lin et al. (2008) en donde evaluaron la expresión del TGF- β 1 en ratas sometidas a infartos al miocardio con y sin tratamiento con RSV (0.1 y 1 mg/kg/día por 4 semanas). Al final del tratamiento, el estudio indicó que la expresión del TGF- β 1 disminuyó significativamente con respecto al control.

El TGF- β 1 promueve la formación de cicatrices, inhibe la infiltración de neutrófilos y facilita la diferenciación de células madre adultas y hematopoyéticas. Tales efectos benéficos son breves y la activación sostenida del TGF- β 1 causa una remodelación estructural y eventualmente lleva a la falla del tejido (Lin et al., 2008). Por lo tanto, la inducción transitoria de la expresión del TGF- β 1 por el RSV sugiere un papel potencial para éste polifenol en la protección neuronal a través de la activación este factor.

10. CONCLUSIÓN

La administración de RSV al inicio de la reperfusión reduce la cantidad de ERO, así como la cantidad de células degeneradas a 24 h de reperfusión y los niveles de ARNm del TGF- β 1 aumentan a 4 h de reperfusión en el modelo de isquemia cerebral inducido por 2 h de MCAO.

11. REFERENCIAS

- Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. "Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?" *J Controlled Release*. 2012; 158:182-93. [PMID:21978644].
- 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. "Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems". *Phytomedicine*. 2010; 17:241-7. [PMID:19577455].
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:1620-4. [PMID: 2154753].
- Böttner M, Grieglstein K, Unsicker K. "The transforming growth factor- β s: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions." *J Neurochem*. 2000;75:2227-40 [PMID:11080174].
- Brito P, Almeida LM, Dinis TC. "The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation". *Free Radic Res* 2002;36:621-31. [PMID:12180187].
- Carmichael ST, "Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose", *NeuroRx*. 2005 Jul; 2(3):396-409 [PMID: 16389304].
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Kartal ON. "Resveratrol: French paradox revisited". *Front Pharmacol*. 2012;17(3):141 [PMID:22822401].
- Cerón Silva Ana Lilia. "Regulación de la expresión del receptor NMDA por el resveratrol en isquemia cerebral in vivo". Tesis para Maestro en ciencias biomédicas. Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas/UAM/UIEM. Octubre, 2013.
- Clark D, Tuor UI, Thompson R, Institoris A, Kulynych A, Zhang X, Kinniburgh DW, Bari F, Busija DW, Barber PA. "Protection against recurrent stroke with resveratrol: endothelial protection". *PLoS One*. 2012;7(10) [PMID:23082218].

- Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA. "Resveratrol Pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a Sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway." *Neuroscience*. 2009;159:993-1002 [PMID:19356683].
- Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. "The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins." *Int J of Mol Sci*. 2012;13:8219-8258 [PMID: 22942700].
- Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie TE, Buisson A, Vivien D. "Transforming growth factor- β 1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia". *FASEB J*. 1999;13:1315-24 [PMID 10428756].
- Durukan A, Tatlisumak T. "Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia." *Pharmacol Biochem and Behav*, 2007 May;87(1):179-97 [PMID:17521716].
- Fisher M, Scaebitz W, "An overview of acute stroke therapy. Past, present, and future". *Arch Intern Med*. 2000 Nov 27; 160(21):3196-206 [PMID 11088079].
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. "Inhibition of oxidation of human lowdensity lipoprotein by phenolic substances in red wine". *Lancet*. 1993; 341:454-7. [PMID:8094487].
- Furlan Anthony, Higashida Randall, Wechsler Lawrence, Gnet Michael, Rowley Howard, Kase Carlos, Pessin Michael, Ahuja Arvind, Callahan Fred, Clark M. Wayne, Silver Frank, Rivera Frank. "Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: A randomized controlled trial. Prolyse in acute cerebral thromboembolism". *JAMA*. 1999 Dec 1;282(21):2003-11. [PMID:10591382].
- Gabryel B, Kost A, Kasprowska D. "Neuronal autophagy in cerebral ischemia – a potencial target for neuroprotective strategies?" *Pharmacol Rep*. 2012; 64(1):1-15 [PMID:22580515].
- Gao D, Jiang X, Peng Y, Huang W, Cheng G, Song L. "Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice." *Life Sci*. 2006 Apr 25;78(22):2564-70 [PMID:16321402].

- Gonthier B, Allibe N, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, Nuiry L, Barret L. "Specific conditions for resveratrol neuroprotection against ethanol-induced toxicity". *J Toxicol*. 2012;2012:973134 [PMID:22778731].
- Henrich-Noack P, Prehn JH, Krieglstein J. "TGF- β 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia". *Stroke*. 1996 Sep 27(9):1609-14 [PMID: 8784137].
- Hicks JJ, Montes-Cortes HD, Cruz-Dominguez M, Medina-Santillan R, Olivares-Corichi MI. "Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation". *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:2029-37 [PMID: 17127441].
- Huang Y, McNamara JO. "Ischemic stroke: "Acidotoxicity" Is a perpetrator". *Cell*. 2004 Sep 17; 118(6):665-6 [PMID: 15369664].
- Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. "The protective effect of resveratrol on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy". *Br J Pharmacol*. 2002; 135:1627–33. [PMID: 11934802].
- Kim M, Park SW, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. "Isoflurane postconditioning protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and multi-organ dysfunction via transforming growth factor-beta 1 generation". *Ann Surg*. 2012 March; 255(3): 492-503 [PMID: 22266638].
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. "Increased expression of TGF- β 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans". *Stroke* 1996 May; 27(5):852-7 [PMID: 8623105].
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches" *J Transl Med*. 2009 Nov 17;7:97 [PMID: 19919699].
- Li Z, Pang L, Fang F, Zhang G, Zhang J, Xie M, Wang L. "Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2." *Brain Res*. 2012 Apr 23;1450:116-24 [22410291].
- Liao SL, Chen WY, Raung SL, Chen CJ. "Ethanol attenuates ischemic and hypoxic injury in rat brain and cultured neurons". *Neuroreport*. 2003 Nov 14;14(16):2089-94 [PMID: 14600503].

- Lin JF, Lin SM, Chih CL, Nien MW, Su HH, Hu BR, Huang SS, Tsai SK. "Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats". *Life Sci*. 2008 Aug 29;83(9-10):313-7 [PMID: 18639559].
- Liu F, McCullough LD. "Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: methods and potential pitfalls". *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:464701 [PMID: 21331357].
- Livak KJ, Schmittgen TD. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method". *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8 [PMID: 11846609].
- Longa, EZ, Weinstein, PR, Carlson, S, Cummins R. "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." *Stroke*. 1989 Jan;20(1):84-91 [PMID: 2643202].
- Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems". *J Cell Mol Med*. 2010 April; 14(4): 840-60 [PMID: 19754673].
- Lu KT, Chiou RY, Chen LG, Chen MH, Tseng WT, Hsieh HT, Yang YL. "Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation". *J. Agric. Food Chem*. 2006 Apr 19;54(8):3126-31 [PMID: 16608241].
- Martinez J, Moreno JJ. "Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production." *Biochem Pharmacol*. 2000; 59:865–70 [PMID:10718345].
- Mhairi Macrae I. "New models of focal cerebral ischemia". *Br J Clin Pharmacol*. 1992 Oct;34(4):302-8 [PMID: 1457262].
- Murray CJ, Lopez AD. "Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study". *Lancet* 1997 May 3;349(9061):1269-76 [PMID: 9142060].
- Pál G, Vincze C, Renner É, Wappler EA, Nagy Z, Lovas G, Dobolyi A. "Time course, distribution and cell types of induction of transforming growth factor betas following middle cerebral artery occlusion in the rat brain". *PLoS ONE* 2012;7(10): e46731 [23056426].

- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U, "Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat". *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Feb;18(2):196-205 [PMID: 9469163].
- Prabhu V, Srivastava P, Yadav N, Amadori M, Schneider A, Seshadri A, Pitaressi J, Scott R, Zhang H, Loochekpour S, Gogada R, Chandra D. "Resveratrol depletes mitochondrial DNA and inhibition of autophagy enhances resveratrol-induced caspase activation". *Mitochondrion* 2013 Sep; 13(5):493-9 [PMID: 23088850].
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA. "Modelos experimentales de isquemia cerebral". *Rev Neurol.* 2008 Oct 16-31;47(8):414-26 [PMID: 18937203].
- Ren J, Fan C, Chen N, Huang J, Yang Q. "Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats". *Neurochem Res.* 2011 Dec;36(12):2352-62 [PMID: 21850487].
- Rink C, Khanna S. "Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke". *Antioxid Redox Signal.* 2011 May 15;14,(10):1889-903 [PMID: 20673202].
- Risher WC, Ard D, Yuan J, Kirov SA. "Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra". *The Journal of Neuroscience.* July 21, 2010;30(29):9859-68 [PMID: 20660268].
- Schaller B, Graf R. "Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy". *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Apr;24(4):351-71 [PMID:15087705].
- Sebai H, Ben-Attia M, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. "Protective effect of resveratrol in endotoxemia-induced acute phase response in rats". *Arch Toxicol.* 2009 Apr; 83(4):335-40 [PMID: 18754105].
- Sebai H, Ben-Attia M, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. "Protective effect of resveratrol on acute endotoxemia-induced nephrotoxicity in rat

- through nitric oxide independent mechanism". *Free Radic Res.* 2008 Nov;42(11-12):913–20 [PMID: 19031312].
- Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, Wolf PA. "The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study". *Stroke* 2006 Feb;37(2):345-50 [PMID: 16397184].
 - Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. "Multiple molecular penumbras after cerebral ischemia". *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Jul: 20(7):1011-32. Review. [PMID: 10908035].
 - Sherman DG, Atkinson RP, Chippendale T, Levin KA, Ng K, Futrell N, Hsu CY, Levy DE. "Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke. The STAT study: a randomized controlled trial". *JAMA* May 10, 2000;283(18):2395-403 [PMID: 10815082].
 - Shi Y, Massagué J. "Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus". *Cell.* 2003 June 13; 113(6):685-700 [PMID: 12809600].
 - Shin JA, Lee H, Lim YK, Koh Y, Choi JH, Park EM. "Therapeutic effects of resveratrol during acute periods of following experimental ischemic stroke". *J Neuroimmunol.* 2010 Oct 8;227(1-2):93-100 [PMID:20655115].
 - Simao Fa, Matté A, Pagnussat AS, Netto CA, Salbego CG. "Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following global cerebral ischemia". *Neurochem Intl* 2012 Oct;61(5):659-65 [PMID: 22709670].
 - Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. "Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats". *Life Sci.* 2002 Jun 28;71(6):655-65 [PMID: 12072154].
 - Suenaga F, Hatsushika K, Takano S, Ando T, Ohnuma Y, Ogawa H, Nadao A. "A possible link between resveratrol and TGF- β : Resveratrol induction of TGF- β expression and signaling". *FEBS Letters* 582 (2008) 586-590 [PMID: 18242191]
 - Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. "Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion". *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1:53-60 [PMID: 7328138].

- Thompson JW, Narayanan SV, Perez-Pinzon MA. "Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning". *Curr Neuropharmacol*. 2012 Dec; 10(4):354-69 [PMID: 20712401].
- Tiwari V, Chopra K. "Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain". *Neurochem Int*. 2013 May;62(6):861-9 [PMDI: 23422878].
- Turrens JF. "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *J Physiol*. 2003 Oct 15;552(Pt2):335-44 [PMID: 14561818].
- Vauzour David. "Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular Mechanisms Undermining Their Beneficial Effects". *Hindawi Publishing corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 10.1155/2012/914273.
- Vivien Denis, Bernaudin Myriam, Buisson Alain, Divoux Dirdier, MacKenzie T. Eric, and Vouvelot André. "Evidence of Type I and Type II Transforming Growth Factor β Receptors in Central Nervous Tissues: Changes Induced by Focal Cerebral Ischemia." *Journal of Neurochemistry*, 1998., Vol 70. No. 6.
- Wang Yongfu, Denisova Janna V., Kang Ki Sung., Fontes Joseph D., Zhu Ting Bao and Belousov Andrei B. "Neuronal Gap Junctions Are Required for NMDA Receptor –Mediated Excitotoxicity: Implications in Ischemic Stroke." *J Neurophysiol* 104:3551-3556, 2010.
- Yousuf Seema, Atif Fahim, Ahmad Muzamil, Hoda Nasrul, Ishrat Tauheed, Khan Badruzaman, Islam Fakhrul. "Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia". *Brain Research* 1250 (2009) 242-253.
- Zhang Huaqiu, Schools Gary P., Lei Ting, Wang Wei, Kimelberg Harold K, Min Zhou. "Resveratrol attenuates early pyramidal neuron excitability impairment and death in acute rat hippocampal slices caused by oxygen-glucose deprivation." *Experimental Neurology* 212 (2008) 44-52.

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

◆ Agua DEPC

Dietil pirocarborato al 0.1 %. Para preparar, se añadió el DEPC (1 mL de DEPC por litro de H₂O), se mezcló durante toda la noche a temperatura ambiente y se esterilizó a 1 atm durante 20 min.

◆ Albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05%

Se pesaron 0.0125 g y se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

◆ Etanol al 70%

Para preparar 100 mL se tomaron 70 mL de EtOH al 100% y se mezclaron con 30 mL de agua destilada.

◆ Gelatina 2%

Para preparar 100 mL se tomaron 2 g y se diluyeron en 100 mL de agua destilada en la parrilla sin dejar que hierva para que no se hagan burbujas. Los portaobjetos con xilano se sumergieron durante 30 segundos en la gelatina para ser recubiertos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

◆ PAF (4%)

Para preparar 100 mL se tomaron 4 g y se diluyeron en 100 mL de PBS con agitación constante y cubierto con papel aluminio hasta que la solución estuvo transparente en la parrilla cuidando que no suba la temperatura a más de 70 °C.

◆ PBS (Phosphate Buffered Saline)

Para preparar un litro de PBS se tomaron 8.01 g de NaCl 137 mM, 0.2 g de KCl 2.7 mM, 1.78 g de Na₂HPO₄·2H₂O 10 mM, 0.27 g de KH₂PO₄ 2 mM y se diluyeron en 1 L de agua destilada a 7.4 de pH.

◆ Permanganato de Potasio (KMnO₄) 0.06%

Para preparar 100 mL se tomaron 0.06 g de KMnO_4 y se diluyeron en 100 mL de agua destilada.

◆ **Sacarosa 30%**

Para preparar 100 mL se tomaron 30 g de sacarosa y se diluyeron en PBS.

◆ **Solución A (cuantificación de proteínas)**

Para preparar un litro se pesaron 20 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) al 2%, 4 g de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.4% y Tartrato de sodio ($\text{KNaC}_6\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 0.02% en agua destilada. (se guarda a temperatura ambiente).

◆ **Solución B (cuantificación de proteínas)**

Para preparar 100 mL se pesaron 0.5 g de sulfato cúprico (CuSO_4) al 0.5% en agua destilada (se guarda a temperatura ambiente).

◆ **Solución C (cuantificación de proteínas)**

Ésta solución se prepara al momento del ensayo y se utilizaron 50 mL de la solución A y 1 mL de la solución B. Se calculó cuánta solución C se necesita en base al número de tubos que se tengan (recordar que se necesita 1 mL de la solución C por tubo).

◆ **Solución D (cuantificación de proteínas)**

Folín 1 N (se diluyó el folín 2.0 N 1:2 con agua destilada). Se calculó cuánta solución D se necesita en base al número de tubos que se tengan (recordar que se necesita 0.1 mL de solución D por tubo).

ANEXO 2. CURVA DE VALIDACIÓN RT-qPCR

Tabla 5. Ct obtenidos a partir de la curva de validación

Sample	Detector	Task	Ct	Ct Std Err
1:20 CT	TGF beta	Target	34.24	0.06
1:20 CT	TGF beta	Target	34.113	
1:20 CT	TGF beta	Target	34.567	
1:40 CT	TGF beta	Target	34.928	0.169
1:40 CT	TGF beta	Target	35.339	
1:40 CT	TGF beta	Target	35.095	
1:80 CT	TGF beta	Target	36.55	0.368
1:80 CT	TGF beta	Target	36.645	
1:80 CT	TGF beta	Target	37.375	
1:160 CT	TGF beta	Target	39.172	1.19
1:160 CT	TGF beta	Target	37.309	
1:160 CT	TGF beta	Target	36.298	
1:20 CT	18S ARNr	ENDO	33.501	
1:20 CT	18S ARNr	ENDO	33.811	
1:20 CT	18S ARNr	ENDO	35.555	
1:40 CT	18S ARNr	ENDO	34.543	0.904
1:40 CT	18S ARNr	ENDO	34.255	
1:40 CT	18S ARNr	ENDO	34.744	
1:80 CT	18S ARNr	ENDO	35.317	0.2
1:80 CT	18S ARNr	ENDO	35.072	
1:80 CT	18S ARNr	ENDO	35.564	
1:160 CT	18S ARNr	ENDO	36.228	0.2
1:160 CT	18S ARNr	ENDO	37.419	
1:160 CT	18S ARNr	ENDO	36.592	

Se hicieron las siguientes diluciones de la muestra y se obtuvieron los valores de Ct que muestran en la tabla:

1. 1:20 = 2 μ L ADNc + 40 μ L H₂O-DEPC
2. 1:40 = 20 μ L de la dilución 1:20 + 20 μ L H₂O-DEPC
3. 1:80 = 20 μ L de la dilución 1:40 + 20 μ L H₂O-DEPC
4. 1:160 = 20 μ L de la dilución 1:80 + 20 μ L H₂O-DEPC
5. NTC

Tabla 6. Δ Ct obtenidos a partir de los Ct de ambos genes

Dilución	Log Conc	18S Promedio C_T	TGF-β1 Promedio C_T	ΔC_T TGF-β1 – 18S
1:20 (0.05)	-1.301029996	33.656	34.30666667	0.65066667
1:40 (0.025)	-1.602059991	34.514	35.12066667	0.60666667
1:80 (0.0125)	-1.903089987	35.318	36.5975	1.539
1:160 (0.00625)	-2.204119983	36.410	37.309	1.183

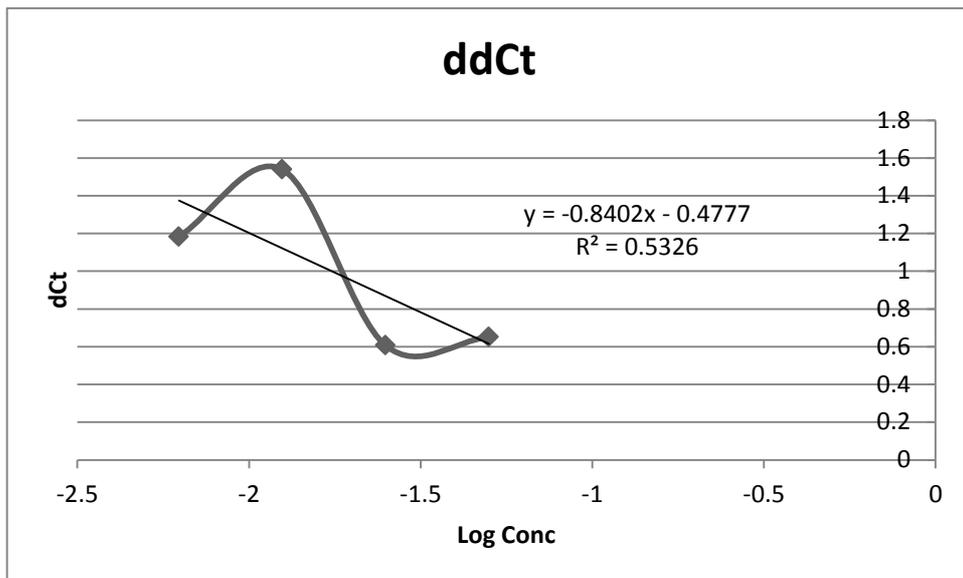


Figura 17. Resultados de la curva de calibración para TGF- β 1 generada al realizar ampliaciones a partir de diluciones seriadas del ADNc de una muestra con concentración conocida (eje x). La curva se produce al graficar el promedio de los Cts obtenidos \pm la desviación estándar de cada uno de los triplicados.

ANEXO 3. TABLA DE RESULTADOS OBTENIDOS DEL ANÁLISIS CON FJ Y ETIDINA.

		AREA TOTAL (µm ²)	CONTES TOTAL (FOU)	%CEL POSITIVAS FJ	%CEL POSITIVAS FJ	DENSIDAD FJ (#cel/mm ²)	%CEL POSITIVAS Et	%CEL POSITIVAS Et	DENSIDAD ET (#cel/mm ²)	DENSIDAD HFT
CTRL	IPSILATERAL	5047066	1297	1	0.077101	0.2853735				369.740453
		6189979	1625	86	5.2923709	13.8934137				262.521156
	7731566	1451	8	0.2267879	0.5471827					317.0.2170
	PROMEDIO	6408.066	1791	41.666667	1.89862615	5.17107886				318.426678
	CONTRALATERAL	5992546	1532	5	0.2267879	0.8343689				255.638137
5900039	896	5	1.04895105	1.55171611					147.930058	
5732540	2386	2	0.08375209	0.3688546					416.569259	
PROMEDIO	5911.25.1	1547	66.666667	1.11111111	0.9661197				373.187442	
IR	IPSILATERAL	3001008	2646	1272	43.1771894	635.651026				
		6214624	578	54	61.4685027	31.8227726	131	31.4377706	1.1638288	31.4377706
		9913355	888	112	12.6125125	11.3012876	107	12.0495495	10.795765	89.8020575
		4697045	1027	100	47.322256	33.0723556	359	57.9377152	40.4690303	69.5871336
		23841630	1945	479	24.8274494	20.3489258	1178	60.3685127	50.8589980	82.8195881
	20932138	1377	1341	75.3991289	49.9756651	396	65.0689705	43.0143974	66.1061391	
	PROMEDIO	14512717.7	1455	50.4	46.461227	78.566597	95.1.4	45.6114704	31.1066818	68.5739958
	CONTRALATERAL	1992804	5251	44	0.83793363	22.0794418				
	22702347	1311	54	1.01779667	2.85646136	50	4.19927079	2.4577715	58.1128232	
	6630604	630	95	15.03154856	14.37746	158	24.6835443	23.5271924	95.2153177	
7685195	414	45	15.7004371	5.17366668	57	14.7513077	4.65074076	35.6140756		
11097987	1465	186	11.1267282	9.28994714	143	11.9355368	9.14779236	70.7176572		
26291187	1517	113	7.4891233	4.29752781	239	17.0731707	9.85088588	57.6933501		
PROMEDIO	1164815	1769.7	96.666667	9.9624591	0.66247914	144.4	14.6277701	9.626.1787	62.0746378	
IR+VH 50%	IPSILATERAL	4322422	964	179	18.6958338	41.1189885				
		3113030	1290	212	15.7455355	55.5067136	131.40832	28.1824109	36.706359	220.526314
		6379067	1115	302	35.1663027	61.4800025				
		6197071	1023	488	47.7023348	78.7382554				
		23459646	1046	177	41.8641751	33.7971136	1448	70.7721895	55.7977715	70.6129485
	23883036	1082	1795	30.4447461	75.3157882	1504	80.4407743	66.7333833	83.2702204	
	30877989	2615	1907	49.71971013	64.8171472	7178	80.4470567	64.8147171	70.1877714	
	PROMEDIO	12051596.4	1573	85.7143	43.0422115	59.6853887	1738	77.1185097	75.8055138	97.4493271
	CONTRALATERAL	7403706	144	1	21.3277770	8.75607527				
	5621228	1410	6	0.42385121	1.03070321	274	19.4326241	47.0886374	242.21451	
5113810	826	30	3.19653255	5.65959212						
44014.7	577	47	5.4380718	8.7883746						
20993088	2393	522	21.8135231	24.8594052	1156	48.8508149	53.67.7354	112.962757		
25391287	2756	724	29.2508365	30.5137131	1337	48.4771374	52.6550579	108.019437		
19662790	2028	281	13.8561158	14.2910118	548	31.8540434	32.8540841	103.194447		
PROMEDIO	9222807	1312	128	9.75609759	13.8786422	16	1.2.95122	1.7343032	142.236306	
IR+VH 7%	IPSILATERAL	2910495	136	98	35.1979714	14.7630013	1512	67.8617157	91.4621625	105.8392716
	15214457	1308	717	61.9001591	47.13623	1134	91.424106	78.7798297	85.8394520	
	PROMEDIO	1094585.5	162	36.666667	33.621181	32.9256244	335	53.2822445	58.25.6636	110.631571
	CONTRALATERAL	22942898	1810	228	12.3963851	20.1602012	527	29.1160221	23.6846631	80.5882138
	4399574	127	125	9.72117555	7.012.40467	561	17.20422	4.6237616	72.1131578	
17993388	1481	17	5.71221981	4.29950157	604	14.7805423	11.337498	76.8615671		
PROMEDIO	19010396.7	1503	56.6667	15.3333333	9.24335315	7.1873611	23.6902015	18.1.810777	76.550878	
IR+RSV 50%VH	IPSILATERAL	2452523	392	2	0.53865022	0.21548575				
		5678329	2141	30	1.4012.439	5.28323512	171	7.986022	30.1144402	377.046879
		5419780	570	57	0.81927142	0.1193470				
		6794413	603	30	3.1674080	3.64359438				
		34281147	788	203	15.6831388	8.31853745	797	61.878880	13.82.1207	52.0409757
	11883330	1046	245	12.628966	20.6171156	585	35.3092784	17.6427769	163.233328	
	2.753421	1025	347	32.0654241	30.7450145	1417	43.6287302	32.715215	120.826726	
	11783833	1018	284	25.1984127	21.8194939	853	54.861.111	47.0804978	85.781116	
	23223061	2270	1311	44.3794949	43.5289946	1726	75.2861439	73.581139	97.73504	
	PROMEDIO	15188466	1411.444444	295.777778	15.08795715	16.8872511	845.666667	46.4918622	40.983664	149.6151.36
	CONTRALATERAL	3718114	420	5	2.14285714	1.42058226				
	1918251	1712	2	0.1461119	0.40661532	15	0.63959805	1.07963987	354.798128	
	5182708	237	66	0.08737727	2.7346553					
	4346327	59	6	1.76627919	2.5770827					
	11764423	1877	228	11.5803069	10.5227258	797	40.3136885	36.6227618	80.1446579	
14532621	1497	106	31.2778162	31.1301136	724	50.0345543	49.8189521	99.5690236		
3887028	797	704	47.139581	44.5551127	1307	60.5128705	57.1070431	111.078469		
13182944	1386	374	27.3883027	28.3742956	720	53.0191488	54.6243122	102.027422		
20007012	1462	728	49.5812307	34.9990132	1150	31.6620703	31.9228535	70.7762537		
PROMEDIO	11688886.8	1286.8889	293.777778	12.5785885	16.8868885	680	30.3882024	28.8728537	138.108888	
IPSILATERAL	19331363	1730	98	5.64515129	5.06948217	108	6.22119315	5.58677627	89.8022525	
6084274	1721	13	2.14491756	1.38830374	233	1.7681154	2.627.0677	10.7247447		
PROMEDIO	17707793.8	1730.8	67.5	3.89504441	3.68433646	155.5	8.59465705	3.033105	98.521312	
CONTRALATERAL	7844147	887	48	5.72727273	1.74787716	41	10.884731	7.15704791	68.1071336	
18772640	1782	117	5.5810742	5.23213856	452	25.6300291	24.2453227	94.8887507		
PROMEDIO	1336069.1	1307.26	67.26	4.65933561	1.6894682	127.26	9.75166381	8.15048077	83.7.62154	

ANEXO 4. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS.



EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF ETHANOL & RESVERATROL IN A MODEL OF CEREBRAL ISCHEMIA IN RAT

¹Trejo Quiñones Y., ²Montes de Oca Balderas P., ³Ortiz-Plata A., ⁴Pedraza-Chaverri J., ¹Aguilera P.

¹Laboratorio de Patología Vascular Cerebral; ²Laboratorio de Aminoácidos Excitadores;

³Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, México, D.F. koesay@gmail.com, pavel73@hotmail.com, aortizplata@yahoo.com.mx, Penelope.Aguilera@gmail.com.

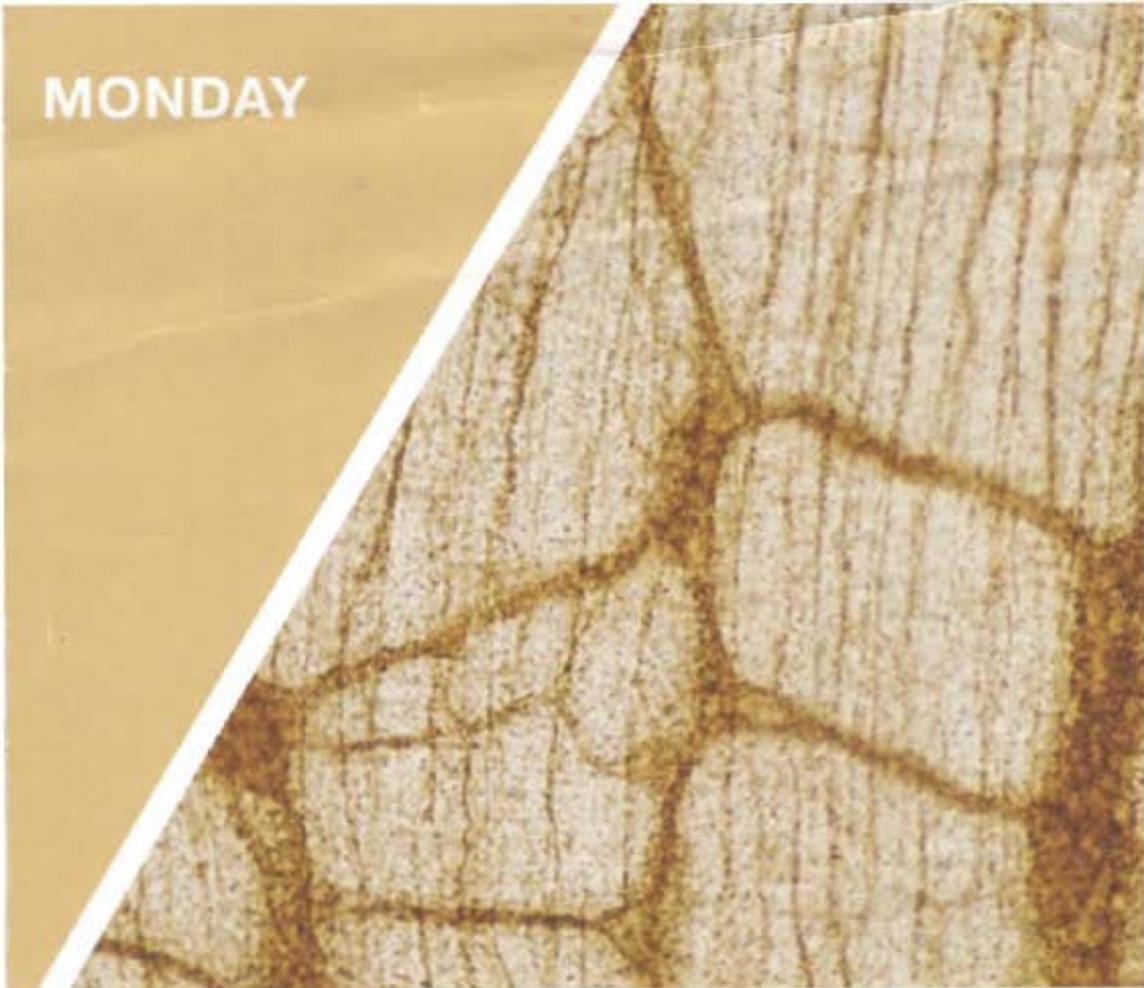
⁴Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito interior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México. pedraza@unam.mx.

Stroke is the second most common cause of death worldwide. At present, intravenous administration of recombinant tissue plasminogen activator (t-PA) is the only clinically approved treatment for acute ischemic stroke. However, t-PA treatment has been shown to have secondary risk associated with blood flow recovery (reperfusion). Thus, additional strategies are required to prevent this damage. Resveratrol is a polyphenol with antioxidant properties that has been tested in animal models of ischemic brain damage. Resveratrol induces cerebral protection when it is administered before an ischemic insult, with a single or multiple doses given during ischemia and during reperfusion. However, its protective effect has not been characterized after a unique dose given early after reperfusion. This is an important fact because reactive oxygen species (ROS) are generated in the first 30 minutes of reperfusion. When ROS production exceeds cellular antioxidant capacity, it induces cellular damage. In this study, we investigated the effect of resveratrol in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 hours of reperfusion. Resveratrol (1 mg/kg; i. v. in 100 μ L of 50% ethanol) was given at the beginning of the reperfusion. Male Wistar rats (250-320 g) were randomly assigned into four experimental groups: control, (CT); MCAO and reperfusion, (MCAO/R); MCAO/R + Resveratrol, (MCAO/R+RES); and MCAO/R + vehicle (MCAO/R+VH). The number of fluoro-jade positive cells was determined by using ImageJ software (image.nih.gov) and was normalized with the number of cells stained with Hoechst (100%). It was found that in the ipsilateral hemisphere to lesion, cerebral ischemia induced cellular damage. The density of fluoro-jade positive cells increased to 43% (635.65 cell/mm²) in the MCAO/R group. Treatment with resveratrol prevented the damage induced by ischemia: MCAO/R+RES group (3.5%, 4.79 cell/mm²) showed no significant difference with the CT group (1.8%; 1.86 cell/mm²). We also found that MCAO/R+VH group, in which 50% ethanol was administered, the number of degenerated neurons decline (59.21 cell/mm²). This result revealed a substantial protective effect from vehicle. In conclusion, we found a decrease of 92% of damaged cells in the ipsilateral side to the lesion in the MCAO/R+RES group and 30.3% in the MCAO/R+VH indicating neuroprotection with resveratrol in 50% ethanol and with ethanol per se administered at the onset of reperfusion. The result indicates that resveratrol administration potentially provide protection in stroke and might be successful in clinical trials.



Neuroscience
2013

MONDAY



SAN DIEGO | NOVEMBER 11

Scientific Sessions Listings 284 - 488



SOCIETY for
NEUROSCIENCE

EFFECT OF RESVERATROL ON CELLULAR DAMAGE, ROS PRODUCTION AND TGF- β 1 mRNA EXPRESSION IN CEREBRAL ISCHEMIA

¹Trejo Quiñones Y., ²Montes de Oca Balderas P., ³Ortiz-Plata A., ⁴Pedraza-Chaverri J., and ¹Aguilera P.

¹Laboratorio de Patología Vasculiar Cerebral; ²Laboratorio de Aminoácidos Excitadores; ³Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, México, D.F. kcesay@gmail.com, pavel73@hotmail.com, aortizplata@yahoo.com.mx, Penelope.Aguilera@gmail.com.

⁴Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito interior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México. pedraza@unam.mx

Stroke is the second most common cause of death worldwide. At present, thrombolytic therapy is the only approved treatment for acute ischemic stroke, even though there are secondary risks associated with blood flow recovery (reperfusion) and the consequent reactive oxygen species (ROS) production. Resveratrol (RSV) has antioxidant and antiinflammatory properties that have been tested in animal models of ischemic brain damage. It induces cerebral protection, but its protective effect after a unique dose given early after the reperfusion has not been characterized. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is a multifunctional pleiotropic molecule induced following hypoxic-ischemic brain injury by antiinflammatory compounds. In this study, we investigated the protective effect of RSV in rats subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 h of reperfusion. RSV (1 mg/kg; i.v.) was given at the beginning of the reperfusion. Wistar male rats (250-320 g) were randomly assigned into four experimental groups: control, (CT); MCAO and reperfusion, (MCAO/R); MCAO/R+RSV; and MCAO/R+vehicle (ethanol 50%) (MCAO/R+VH). Fluoro-Jade (FJ) was used to label degenerate neurons. The number of total cells was obtained by counting the Hoechst stained nuclei (100%). At 24 h of reperfusion, rats were administered with 10 mg/kg of ethidine (i.v.) to measure ROS production. Total RNA was extracted from ipsilateral cerebral cortex using TriPure reagent and reversely transcribed into cDNA. The relative mRNA levels were determined by quantitative real time PCR using the comparative $\Delta\Delta$ Ct method. We found that in the hemisphere ipsilateral to lesion, cerebral ischemia induced cellular damage. The density of FJ positive cells increased to 42.6% in the MCAO/R group. Treatment with RSV prevented the damage induced by ischemia: MCAO/R+RSV group (3.5%) showed no significant difference with the CT group (1.9%). MCAO/R+VH group, in which 50% ethanol was administered, the number of degenerated neurons decline to 27.7%. Similar results were found with ethidine, where we observed that RSV decreased ROS production from 53% (MCAO/R group) to 9% (MCAO/R+RSV). The expression of TGF- β 1 decreased importantly in MCAO/R group (7.7 %) compared to CT group, and RSV had no further effect on its expression (13 % in MCAO/R+RSV group). In conclusion, we found a reduction of 92 % of damaged cells on the ipsilateral side of the lesion in MCAO/R+RSV and 68.5% in MCAO/R+VH groups, implying a neuroprotection effect of both, RSV and ethanol *per se* when administered at the beginning of reperfusion. No contribution of TGF- β 1 was observed with RSV and ethanol treatment after 24 h of reperfusion.

Session Type: Poster

Session Number: 338

Session Title: Ischemia: Pharmacologic Neuroprotection

Date and Time: Monday Nov 11, 2013 8:00 AM - 12:00 PM

Location: San Diego Convention Center: Halls B-H

Control Number: 9326

9:00 W12 339.18 Keap1-lat peptide attenuates ischemic neuronal injury and behavioral deficits via upregulating Nrf2 activity. R. WANG*; Q. ZHANG; J. TU; Y. ZHU; X. ZHANG; H. TANG; F. YANG; D. BRANN. *Hebei United Univ., Georgia Regents Univ.*

10:00 W13 339.19 Nr1 and nr2 mRNA NMDA receptor subunit expression is regulated by ethanol and resveratrol in cerebral ischemia. A. L. CERÓN*; A. MILLÁN VEGA; A. ORTIZ-PLATA; M. I. SALAZAR; M. ESPINOZA-ROJO; P. AGUILERA. *Inst. Nacional De Neurología Y Neurocirugía, Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, Inst. Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Unidad Académica de Ciencia Químico Biológicas.*

11:00 W14 339.20 Increased omega-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 transgenic mice confers neuroprotection and enhances endogenous neurogenesis following focal cerebral ischemia. S. H. HASSAN; X. HU; F. ZHANG; W. ZHANG; M. IWAI; R. A. STETLER*; Y. DAI; A. ZHAO; Y. GAO; J. CHEN. *Univ. of Pittsburgh, Fudan Univ., Veterans Affairs Pittsburgh Hlth. Care Syst., Univ. of Pittsburgh, Nanjing Med. Univ.*

8:00 W15 339.21 ● Orally administered apolipoprotein A-I protects neurons from oxygen-glucose deprivation. E. L. ADAMS*; V. L. EHLERS; S. C. MICHELS; N. B. FETTINGER; J. R. MOYER, Jr. *Univ. of Wisconsin-Milwaukee, Univ. of Wisconsin-Milwaukee.*

9:00 W16 339.22 Neuroprotective effect of oral administration of human serum albumin against transient cerebral hypoxic ischemia in rats. H. PARK*; M. HONG; G. HEO; Y. LEE; G. JHON; M. SUH. *Sungkyunkwan Univ., Inst. for Basic Sci., Ewha Womans Univ., Sungkyunkwan Univ.*

10:00 W17 339.23 ▲ Potent therapeutic effects of prothymosin alpha in the stroke model induced by thrombosis and late tPA-treatment. H. MASANORI*. *Nagasaki Univ.*

11:00 W18 339.24 ▲ Effect of resveratrol on cellular damage, ROS production and tgf- β 1 mRNA expression in cerebral ischemia. Y. TREJO QUIÑONES*; P. MONTES DE OCA; A. ORTIZ; J. PEDRAZA; P. AGUILERA. *Inst. Nacional De Neurología Y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Facultad de Química, Univ. Nacional Autónoma de México.*

8:00 X1 339.25 Overexpression of Hsp72 protected against ischemic CNS white matter injury. M. A. HAMNER*; X. SUN; Z. YE; R. G. GIFFARD; B. R. RANSOM. *Univ. Washington, Stanford Univ. Sch. of Med.*

9:00 X2 339.26 Two approaches for therapeutic hypothermia induction after ischemic brain injury: TRPV1 agonist-induced pharmacologic hypothermia and Peltier-device-induced focal brain cooling. M. TEJADA BONILLA; H. HARADA*; K. USHIJIMA; M. TAUCHI. *Kurume Univ. Sch. of Med., Univ. Hosp. Erlangen, Germany, Univ. Hosp. Erlangen, Germany.*

10:00 X3 339.27 Neuroprotective effects of HT047 in focal cerebral ischemia models. J. SONG; J. CHOI; B. GAIRE; S. HONG; H. KIM*. *Kyung Hee Univ. Col. Korean Med., Korea Inst. of Sci. and Technol. for Eastern Med. (KISTEM), Gachon Univ. Gil Oriental Med. Hosp.*

11:00 X4 339.28 Effect of dexrazoxane on learning and memory alterations induced by acute cerebral ischemia and its possible involvement in the neurogenic process. L. A. MÉNDEZ-CUESTA*; C. E. CAZARES-MARTÍNEZ; D. O. HERNÁNDEZ-AGUILAR; L. PARRA-GÁMEZ; J. GONZÁLEZ-RÍOS; C. GÓMEZ-ACEVEDO. *Univ. Nacional Autónoma De México.*

8:00 X5 339.29 Lidocaine inhibits TRPM7 current and TRPM7-mediated zinc toxicity. T. LENG*; Z. ZENG; Z.

Mon. AM