



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL RESVERATROL COMO TRATAMIENTO
PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DEL EDEMA EN ISQUEMIA CEREBRAL”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. EN C. IVAN MIJAIL ALQUISIRAS BURGOS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL
VELASCO SUAREZ”

COMITÉ TUTORAL

DRA. HERMINIA PASANTES ORDOÑEZ
INSTITUTO DE FISIIOLOGÍA CELULAR
DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Ciudad Universitaria Cd. de Mex, octubre del 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA.

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT).

Nº DE BECARIO: 275610

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL
VELASCO SUAREZ”**

LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL.

MIEMBROS DEL JURADO

DRA. AUREA OROZCO RIVAS

DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ

DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO

DR. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO.

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

DEDICATORIAS.

A la Dra. Irlanda Peralta Arrieta por el apoyo incondicional brindado en las madrugadas de sueños, el éxito de este proyecto es compartido.

A mi madre y familia. Por el impulso otorgado durante mi desarrollo académico.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en isquemia.....	2
1.2 Pérdida de la homeostasis intracelular de ERO.....	3
1.3 Activación de vías de señalización por efecto de las ERO.....	5
1.4 El daño a la barrera hematoencefálica (BHE) y la formación del edema cerebral.....	6
1.5 El receptor de sulfonilurea 1 (SUR1) en el sistema nervioso central (SNC).....	10
1.6. Participación del canal SUR1-TRPM4 durante la isquemia cerebral.....	13
1.7 Regulación transcripcional del gen <i>Abcc8</i> en isquemia cerebral.....	18
1.8 Regulación de la vía PTEN/PI3K/AKT por estrés oxidante.....	21
1.9. Resveratrol como terapia en la isquemia cerebral.....	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
III. HIPOTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS.....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26

5.1 Animales.....	26
5.2 Modelo experimental para la inducción de isquemia cerebral focal transitoria.....	26
5.3 Tratamiento	27
5.4 Diseño experimental.....	27
5.5. Supervivencia.....	27
5.6 Evaluación del estado neurológico.....	28
5.7 Evaluación de la permeabilidad de la BHE.....	29
5.8 Evaluación del contenido de agua cerebral.....	30
5.9 Evaluación del volumen de infarto cerebral.....	30
5.10Análisis de la región promotora del gen <i>Abcc8</i>	31
5.11 Ensayos de actividad de unión al ADN de factores transcripcionales.....	32
5.11.1 <i>Obtención de extractos nucleares</i>	32
5.11.2 <i>Alineamiento y marcaje de oligonucleótidos de unión para el factor SP1</i>	33
5.11.3. <i>Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés electrophoretic mobility shift assay) en gel</i>	33
5.11.4. <i>Revelado de ensayos EMSA</i>	34
5.11.5 <i>Ensayos de competencia</i>	35

5.12. Evaluación de la expresión de ARN mensajero.....	35
5.12.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc).....	35
5.12.2. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	36
5.13. Ensayos de inmunodetección en fase sólida (Western Blot).....	37
5.14. Inmunofluorescencia en cortes corticales de tejido.....	41
5.15. Ensayos de electrofisiología en células enteras de cortes corticales de tejido.....	42
5.16. Cultivos celulares.....	44
5.17. Modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD).....	45
5.18. Grupos experimentales.....	45
5.19. Tratamientos en cultivo celular.....	46
5.20. Evaluación del edema celular en las células HBEC-5i.....	46
5.21. Ensayo de viabilidad con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-,2- difeniltetrazolio (MTT) en células HBEC-5i.....	47
5.22. Ensayo de liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) en células HBEC-5i.....	48
5.23. Ensayos de determinación de ERO en células HBEC-5i.....	49
5.24. Ensayos de unión al ADN en células HBEC-5i.....	50

5.24.1 Obtención de extractos nucleares.....	50
5.24.2. Ensayos EMSA.....	50
5.25. Inmunofluorescencia en células HBEC-5i.....	51
5.26. Evaluación de la expresión de ARNm en células HBEC-5i.....	52
5.27. Ensayos de Western blot en células HBEC-5i.....	53
5.28. Análisis estadístico.....	53
VI. RESULTADOS	54
6.1. El RSV reduce el daño a la BHE provocado por isquemia cerebral en ratas.....	54
6.2. El RSV reduce el contenido de agua cerebral en ratas con isquemia cerebral.....	54
6.3 El RSV aumenta la supervivencia en ratas con isquemia cerebral.....	56
6.4 El RSV disminuye el volumen de infarto en ratas con isquemia cerebral.....	57
6.5 El RSV mejora el estado neurológico en ratas con isquemia cerebral.....	59
6.6 El RSV disminuye la actividad de unión del factor transcripcional SP1 en ratas con isquemia cerebral.....	61
6.7 El RSV disminuye la expresión del gen <i>Abcc8</i> (SUR1) en ratas con isquemia cerebral.....	62
6.8 El RSV disminuye la expresión de la proteína SUR1 en ratas con isquemia cerebral.....	65

6.9 Compuestos con capacidad antioxidante disminuyen la expresión de SUR1 en ratas con isquemia cerebral	65
6.10 El RSV disminuye la expresión de SUR1 en EnVC en ratas con isquemia cerebral	68
6.11 El RSV disminuye la expresión de AQP4 en ratas con isquemia cerebral.....	68
6.12 El RSV disminuye la expresión de AQP4 en astrocitos de ratas con isquemia cerebral	70
6.13 Evaluación de la corriente iónica en neuronas corticales de ratas con isquemia cerebral.....	71

Caracterización del mecanismo protector del RSV en EnVC sometido a OGD

6.14 La OGD aumenta en el volumen celular del EnVC.....	74
6.15 La OGD aumenta la liberación de LDH en EnVC.....	75
6.16 La OGD incrementa la expresión de SUR1 en EnVC.....	76
6.17 El RSV disminuye el daño por OGD en EnVC.....	77
6.18 Compuestos con propiedades antioxidantes disminuyen el daño por OGD en las células del EnVC.....	80
6.19 La OGD incrementa la generación de ERO en EnVC.....	80
6.20 El RSV disminuye la generación de ERO por efecto de la OGD en EnVC.....	83

6.21 La OGD activa a la proteína cinasa B (PKB/AKT) en EnVC.....	83
6.22 El RSV disminuye la activación de la proteína cinasa B (PKB/AKT) en EnVC	85
6.23 La expresión de SUR1 depende de la activación de la proteína cinasa B (PKB/AKT) en EnVC.....	86
6.24 El promotor del gen <i>Abcc8</i> (SUR1) posee múltiples sitios de unión a los factores transcripcionales HIF-1, SP1 y NFκB.....	87
6.25 La OGD aumenta la actividad de unión al ADN de HIF-1 en EnVC.....	89
6.26 La OGD incrementa la actividad de unión al ADN de SP1 en EnVC.....	91
6.27 La OGD aumenta la actividad de unión al ADN de NFκB en EnVC.....	91
6.28 El RSV disminuye la actividad de unión al ADN de SP1 y NFκB en EnVC.....	94
6.29 La inhibición de SP1 y NFκB disminuye el daño inducido por la OGD en EnVC.....	95
6.30 El RSV disminuye la expresión de SUR1 en EnVC.....	95
VII. DISCUSIÓN.....	98
7.1 Efecto del daño a la BHE y la formación del edema cerebral en la supervivencia.....	98
7.2 Efecto del RSV en la función de SUR1 en el daño a la BHE y la formación del edema durante la isquemia y la reperfusión.....	99

7.3	Regulación de la expresión de SUR1 y el daño a la BHE durante la isquemia y la reperfusión.....	100
7.4	Función del RSV en la regulación de la expresión de SUR1 mediada por estrés oxidante.....	101
7.5	El efecto protector de una dosis única de RSV depende de la capacidad de disminuir el estrés oxidante durante los primeros minutos de la reperfusión.....	104
7.6	El RSV regula la expresión de SUR1 modulando la actividad de factores transcripcionales sensibles a estrés oxidante.....	105
7.7	El factor de transcripción NFκB y la expresión de SUR1 durante el proceso inflamatorio en la isquemia cerebral.....	107
7.8	Participación otras proteínas involucradas en el daño a la BHE y la formación del edema y su regulación por RSV.....	108
VIII.	CONCLUSIÓN.....	110
IX.	REFERENCIAS.....	113
X.	ANEXOS.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

EVC: Enfermedad vascular cerebral

MCA: Arteria cerebral media

ATP: Adenosin tri fosfato

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

Na⁺/K⁺-ATPasa: Bomba de sodio y potasio.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NOS: Oxido nítrico sintasa.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.

FADH₂: Flavin adenin dinucleótido.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

O₂⁻: Anión superóxido.

HO[•]: Radical hidroxilo.

Nox: NADPH oxidasa.

Mn-SOD2: Superóxido dismutasa 2 dependiente de manganeso

Cu-SOD1: Superóxido dismutasa 1 dependiente de cobre

GPx: Glutación peroxidasa

GST: Glutación S-transferasa

NADPH: Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato

TRX: Tioredoxinas.

GSSG: Glutación oxidado

GSH: Glutathion reducido.

OG: 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina

BHE: Barrera hematoencefálica.

UNV: Unidad neurovascular

EnVC: Endotelio vascular cerebral

SNC: Sistema nervioso central

Ca⁺⁺: Calcio

Na⁺: Sodio

AQP4: Acuaporina 4

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

MMPs: Metaloproteinasas de la matriz

TIMP: Inhibidor de metaloproteinasa

NKCC: Transportador de Cl⁻, K⁺ y Na⁺

ABC: Proteínas con casete de unión a ATP

NBD: Dominio de unión a nucleótidos

TMD0: Dominio transmembranal 0

TMD1: Dominio transmembranal 1

TMD2: Dominio transmembranal 2

CL3: Bucle citosólico largo

KATP: Canales de K⁺ sensibles a ATP

SUR1: Receptor de sulfonilurea 1

SUR2: Receptor de sulfonilurea 2

TRPM4: Receptor a melastatina de potencial transitorio 4

CRE: Elemento de unión sensible a AMPc

CREB: Proteína de unión a CRE

Foxa2: Factor transcripcional de la caja a2 de Forkhead

STAT3: Activador de la transcripción 3

SP1: Proteína específica 1

SP3: Proteína específica 3

HIF-1: Factor inducible por hipoxia

HRE: Elementos de respuesta a la hipoxia

PHD: Proteínas prolinhidroxilasas

NFκB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

PKB / AKT: Proteína cinasa B

PI3K: 3-cinasa de fosfatidil-inositol

PDK1: Cinasa dependiente de fosfoinositol 1

P-AKT: Proteína cinasa B fosforilada.

PTEN: Fosfatasa de inositol

RSV: Resveratrol

MCAO: Oclusion de la arteria cerebral media

CUR: Curcumina

NAC: N-acetilcisteína

VH: Vehiculo

CT: Control

OGD: Privación de oxígeno y glucosa

O₂ : Oxígeno

MIT: Mitramicina A

NF κ B_{inh} : Inhibidor del factor NF κ B

LDH: Deshidrogenasa láctica

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

HBEC: Células de endotelio vascular cerebral humano

EMSA: Ensayo de cambio de movilidad electroforética "Electrophoretic mobility shift assay"

ADN: Acido desoxiribonucleotido.

ARNm: Acido ribonucleico mensajero

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

BDNF:Factor neurotrófico derivado de cerebro

RESUMEN

La formación del edema iónico y su progresión a hemorragia es una fisiopatología asociada con el aumento en la mortalidad en pacientes que sufren isquemia cerebral. Investigaciones previas han asociado la formación del edema con una disfunción de las células del endotelio vascular cerebral (EnVC), las cuales integran la barrera hematoencefálica. El proceso inicia tras el déficit energético, con el aumento en el flujo de Na⁺ que promueve el arrastre de agua a través de las acuaporinas (AQP4) desde los vasos sanguíneos hacia el tejido cerebral; de esta manera se altera gradualmente la homeostasis e incrementa el volumen de agua en el parénquima. El receptor de sulfonilurea 1 (SUR1) es una proteína inducible que en cerebro regula la actividad del canal TRPM4, un canal que transporta Na⁺, cuya inhibición tiene un efecto protector en isquemia. Por otro lado, la transcripción del gen *Abcc8* que codifica para SUR1 depende principalmente de la actividad de factores transcripcionales modulados por el ambiente redox intracelular. **Objetivo:** Dado que el estrés oxidante está implicado en el daño celular inducido en la isquemia, el objetivo del presente estudio fue evaluar si el antioxidante resveratrol (RSV) prevenía el daño cerebral al reducir la expresión *de novo* de SUR1 en condiciones de isquemia cerebral. **Métodos:** Utilizando un modelo in vivo de isquemia cerebral transitoria por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) se evaluó el volumen de infarto cerebral, la condición neurológica, el tiempo de supervivencia, la extravasación de azul de Evans y contenido de agua. El mecanismo de acción del RSV se estudió en el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en una línea celular de EnVC, evaluando la actividad de unión al ADN de factores transcripcionales mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética, la expresión de la proteína SUR1 evaluada por qPCR, inmunofluorescencia y Western blot. **Resultados:** Encontramos que el RSV reduce significativamente el volumen del infarto y el edema cerebral, evitando el daño de la barrera hematoencefálica; también mejoró el estado neurológico y aumentó la supervivencia. Nuestros hallazgos sugieren que la actividad antioxidante del RSV inhibe la expresión de SUR1 y AQP4; por lo tanto, el RSV representa una alternativa terapéutica para la reducción del edema en el accidente cerebrovascular.

ABSTRACT

The ionic edema and its progression to hemorrhage is a pathophysiology associated with increased mortality in patients suffering from cerebral ischemia. Previous research has associated the formation of edema with a dysfunction of the cerebral vascular endothelial cells (EnVC), which form the blood-brain barrier. The process begins after the energy deficit, with the increase in the flow of Na^+ that promotes the entrainment of water through the aquaporins (AQP4) from the blood vessels to the brain tissue; in this way homeostasis is gradually altered and the water volume in the parenchyma is increased. The sulfonylurea receptor 1 (SUR1) is an inducible protein that regulates the activity of the TRPM4 channel in the brain, a channel that transports Na^+ , and his inhibition has a protective effect in ischemia. On the other hand, the transcription of the *Abcc8* gene that codes for SUR1 depends mainly on the activity of transcriptional factors modulated by the intracellular redox environment. **Objective:** Owing to that oxidative stress is involved in the cellular damage induced in ischemia, the objective of this study was to evaluate if the antioxidant resveratrol (RSV) can prevent brain damage by reducing the *de novo* expression of SUR1 in the ischemic brain. **Methods:** Using an in vivo model of transient cerebral ischemia by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), cerebral infarct volume, neurological condition, survival time, Evans blue extravasation and water content were evaluated. The molecular mechanism was studied in the oxygen and glucose deprivation (OGD) model using an EnVC cell line, evaluating the DNA binding activity of transcriptional factors through Electrophoretic Mobility Shift Assay, the expression of the protein SUR1 presented by qPCR, immunofluorescence and Western blot. **Results:** We found that RSV significantly reduces the volume of infarction and cerebral edema, avoiding damage to the blood-brain barrier; neurological status also improved and survival increased. Our findings suggest that the antioxidant activity of RSV inhibits the expression of SUR1 and AQP4; therefore, RSV represents a therapeutic alternative for the reduction of edema in stroke.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es un trastorno neurológico que se caracteriza por la reducción súbita en el flujo sanguíneo cerebral. Este padecimiento está clasificado en dos tipos principales: el hemorrágico y el isquémico. La EVC de tipo hemorrágico se origina con la ruptura de un vaso sanguíneo cerebral, mientras que la de tipo isquémico se debe a la formación de un émbolo o trombo en una arteria cerebral importante que en la mayoría de los casos es la arteria cerebral media (MCA) (Durukan y Tatlisumak, 2007). En la EVC de tipo isquémico, la obstrucción conlleva a una inmediata reducción de la actividad neurológica en la zona directamente irrigada por la arteria ocluida, formándose el núcleo isquémico o zona de infarto, región donde el daño neuronal es irreversible. Sin embargo, rodeando a la zona de infarto, existe una segunda zona de daño denominada penumbra, la cual permanece funcional debido a la perfusión colateral; aunque existe el riesgo potencial de que esta zona se afecte irreversiblemente si el flujo sanguíneo no es restablecido durante las primeras horas de la isquemia (Durukan y Tatlisumak, 2007).

De manera notable, cerca del 85% de los accidentes cerebro vasculares son de tipo isquémico. A nivel mundial las muertes por complicaciones por isquemia cerebral representan la 2º causa de muerte siendo responsables de 5,4 millones de muertes cada año (Soler y Ruiz, 2010; Guzik y Bushnell, 2017). En México, en los últimos años ocuparon el 6º lugar entre las principales causas de muerte, con una incidencia de 35,000 muertes cada año de acuerdo con datos del INEGI 2017 y el sistema nacional de información en salud (2015).

Desafortunadamente el único procedimiento aprobado para tratar la isquemia cerebral es la rápida restauración del flujo sanguíneo, también llamada reperusión, ya sea utilizando fármacos, principalmente anti-trombolíticos, o de manera quirúrgica (tromboloplastia) (Goyal et al., 2016). Con la reperusión se pueden restablecer las condiciones fisiológicas; sin embargo, la ventana terapéutica es

reducida, con un tiempo limitado de hasta 4.5 h después del inicio de los síntomas para el activador de plasminógeno tisular (IV-tPA) y máximo de 6 h para la trombectomía mecánica endovascular (Bhaskar et al., 2018).

1.1. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en isquemia

Durante la isquemia cerebral la reducción del flujo sanguíneo conlleva a una inmediata reducción en las concentraciones de oxígeno y glucosa que llegan al tejido, provocando un déficit energético que afecta de manera inevitable la actividad de las proteínas que dependen de sustratos energéticos. Una de las proteínas principalmente afectadas es la bomba de sodio y potasio (Na^+/K^+ -ATPasa), la cual utiliza el ATP como sustrato para mantener el potencial de membrana celular. Su inactivación afecta la función de proteínas cuya actividad depende del gradiente Na^+/K^+ .

Un ejemplo claro donde la inactivación de la Na^+/K^+ -ATPasa tiene consecuencias inmediatas es la concentración de glutamato presente en el espacio sináptico, generando lo que se denomina proceso de excitotoxicidad. Se inicia con la liberación excesiva de este neurotransmisor al medio extracelular debido a la despolarización anóxica constante de neuronas ubicadas en la región de infarto (Durukan y Tatlisumak, 2007; Moskowitz et al., 2010). Además, se altera la actividad de los transportadores de glutamato expresados en la membrana de las células gliales, que normalmente internalizan glutamato en favor del gradiente de Na^+ . Durante un episodio de isquemia cerebral las células gliales se despolarizan, lo que impide el funcionamiento del transportador que incluso puede trabajar de forma inversa impulsando glutamato al medio extracelular (Durukan y Tatlisumak, 2007; Arango Davila et al., 2008; Moskowitz et al., 2010). De esta manera, se propicia que la concentración de este aminoácido excitador aumente en el espacio extracelular más allá de la sinapsis hasta alcanzar concentraciones tóxicas (Zhang et al., 2011; Zhou et al., 2015)

El aumento en las concentraciones de glutamato en el espacio extracelular tiene como consecuencia la sobre activación de sus receptores neuronales del tipo

ionotrópico activado por el N-metil-D-aspartato (NMDA) localizados extrasinápticamente (Hardingham, 2010). Estos receptores son altamente permeables a Ca^{2+} y no se desensibilizan, por lo que se desencadena una internalización masiva de Ca^{2+} al espacio citoplasmático neuronal (Nakamichi y Yoneda, 2005; Hardingham, 2010) En condiciones fisiológicas la mitocondria amortigua la concentración citoplasmática de Ca^{2+} ; sin embargo, en la isquemia cerebral se sobrepasa esta capacidad provocando un daño mitocondrial irreversible asociado al incremento sostenido en la carga citoplasmática de Ca^{2+} que provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Nicholls y Ward, 2000). Además, se sobreactivan enzimas citoplasmáticas dependientes Ca^{2+} que incluyen calpaínas, fosfolipasas, la óxido nítrico sintasa (NOS) y endonucleasas (Murphy, 2009).

Adicional a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, el déficit energético generado durante la isquemia cerebral disminuye la síntesis de sustratos energéticos como el nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y el flavin adenin dinucleótido (FADH_2) necesarios para el adecuado flujo de electrones a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Al interrumpirse el flujo de electrones se favorece su acumulación en el espacio intermembrana. En consecuencia, los electrones acumulados interactúan con el oxígeno que retorna al tejido al restablecerse el flujo sanguíneo. De esta manera, se induce la formación de ERO, la cual aumenta rápidamente y alcanzan su concentración máxima durante los primeros minutos de la reperfusión. En esta etapa se genera principalmente anión superóxido (O_2^-) pero también peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^\cdot) (Nicholls y Ward, 2000; Murphy, 2009; Moskowitz et al., 2010). Además de las ERO de origen mitocondrial generadas durante la reperfusión, múltiples sistemas enzimáticos como la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa (Nox) y la NOS participan en la producción de ERO durante este proceso (Granger y Kvietys, 2015).

1.2 Pérdida de la homeostasis intracelular de ERO

En condiciones fisiológicas la concentración de ERO intracelulares se mantienen relativamente estables, en un equilibrio dinámico que es mantenido por diversos procesos celulares que producen y eliminan las ERO del sistema. Por

ejemplo, durante el metabolismo de la glucosa, la mitocondria libera ERO como un subproducto de desecho de varias reacciones bioquímicas necesarias de la respiración mitocondrial (Grivennikova y Vinogradov, 2013). La principal ERO generada en la cadena respiratoria mitocondrial es el O_2 generado principalmente por los complejos mitocondriales I y III. El O_2 es rápidamente transformado en H_2O_2 por la enzima la superóxido dismutasa 2 dependiente de manganeso (Mn-SOD2) localizada en la matriz mitocondrial. Así mismo la superóxido dismutasa 1 dependiente de cobre (Cu-SOD1) transforma en H_2O_2 al O_2 que escapa de la mitocondria hacia el citosol (Chen et al., 2003; Miller, 2012). En seguida el H_2O_2 generado se reduce a agua por acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) (Marí et al., 2009). Además, otras enzimas como la glutatión S-transferasa (GST) juegan un papel decisivo en el proceso antioxidante. Tanto la GPx como la GST contienen un aminoácido único de selenocisteína dentro de sus sitios activos lo cual les permite usar tioles de bajo peso molecular como el glutatión para reducir el H_2O_2 a agua (Sies, 1999; Marí et al., 2009).

Un requerimiento común para todos estos sistemas antioxidantes es la nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como equivalente reductor para poder regenerar el sistema antioxidante. Es decir, el NADPH es utilizado como cofactor por las tioredoxinas (TRX) y por la enzima glutatión reductasa para convertir el glutatión oxidado (GSSG) en reducido (GSH)(Marí et al., 2009).

Por otro lado, el NADPH intracelular es generado mediante la reducción de $NADP^+$ por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la primera enzima limitante de la velocidad de la ruta de las pentosas fosfato, durante la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (Birben et al., 2012). Al generar NADPH, la vía metabólica donde participa la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es un determinante crítico de la capacidad de amortiguación del GSH citosólico (GSH/GSSG).

En condiciones de isquemia cerebral donde los sustratos energéticos disminuyen, los sistemas antioxidantes pierden la capacidad de regenerarse siendo insuficientes para contener la generación progresiva de ERO. Por lo tanto, rompen el equilibrio entre los antioxidantes endógenos y las ERO generadas, provocando

un estado de estrés oxidante (Sun et al., 2018).

1.3 Activación de vías de señalización por efecto de las ERO

La producción de ERO está asociada a la activación de diferentes procesos de manera regional y temporal. Por lo tanto, identificar los cambios en sus concentraciones facilita la comprensión de los mecanismos moleculares dinámicos subyacentes.

Por un lado, la generación de concentraciones elevadas de ERO en la zona de infarto causan un daño directo a biomoléculas como proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. De esta manera, se promueve la peroxidación lipídica, la oxidación de aminoácidos (metionina, histidina, triptófano, cisteína, fenilalanina y tirosina) que resulta en la carbonilación y nitración de proteínas, así como la oxidación de la base nitrogenada guanina en el ADN, donde el producto principal es la formación del 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (OG) (Stadtman y Berlett, 1998; Neeley y Essigmann, 2006). Es decir, las ERO dañan prácticamente cualquier componente celular.

Por otro lado, en la zona de penumbra, donde el incremento en la concentración de ERO es moderada, se activan vías de señalización involucradas con la muerte o la supervivencia celular en forma dependiente del tiempo de isquemia y el déficit energético (W. Thompson et al., 2012). La activación de estas vías de señalización induce la expresión de genes involucrados con procesos proinflamatorios, la muerte celular (apoptosis y autofagia), proliferación, metabolismo energético, etc. (Zhang et al., 2016). Además, en neuronas se induce la expresión de genes involucrados con el funcionamiento de la sinapsis y la plasticidad neuronal (Bai et al., 1998; Nicholls y Ward, 2000; Murphy, 2009; Hota et al., 2010; W. Thompson et al., 2012).

Estas vías pueden ser activadas por el pre-condicionamiento isquémico, proceso en el cual la exposición a un estímulo isquémico leve activa un mecanismos protectores innatos. En este caso, la mitocondria genera concentraciones

moderadas de ERO que promueven la transcripción de genes involucrados en la supervivencia celular (Dirnagl et al., 2003; Durukan y Tatlisumak, 2007; Arango Davila et al., 2008; Priya et al., 2013). Es importante destacar que estas vías, que son claves en la neuroprotección durante un proceso isquémico severo, también pueden ser activadas por agentes neuroprotectores.

1.4 El daño a la barrera hematoencefálica (BHE) y la formación del edema cerebral

La unidad neurovascular (UNV) está integrada por neuronas, células gliales, pericitos y células del endotelio vascular cerebral (EnVC) (Li et al., 2009; Lecrux y Hamel, 2011). Estas últimas son altamente sensibles a los estímulos químicos, a los cambios hemodinámicos en el vaso sanguíneo y a las alteraciones osmóticas que ocurren en el parénquima cerebral. Es por eso que la isquemia y la reperfusión alteran dramáticamente su función.

El EnVC forma la denominada BHE, una barrera altamente selectiva y dinámica entre el flujo sanguíneo y el tejido cerebral. La BHE regula el flujo de iones y moléculas entre el torrente sanguíneo y el tejido cerebral permitiendo mantener la homeostasis dentro del parénquima cerebral (Alluri et al., 2014; O'Donnell, 2014). Por ello, el desequilibrio en el transporte iónico a través de las células del EnVC representa el marco central para comprender los mecanismos moleculares de daño a la BHE y la formación del edema durante la isquemia cerebral (Besancon et al., 2008; O'Donnell, 2014).

El edema es una de las principales complicaciones que inevitablemente acompañan a la isquemia. Está definido como un aumento neto de la masa de agua en el cerebro y está presente en la mayoría de las lesiones agudas del sistema nervioso central (SNC) (Bell et al., 1985). Se estima que la presencia de edema después de la isquemia cerebral está asociada hasta con el 50% de mortalidad (Battey et al., 2014). Cuando el edema cerebral es grave, puede aumentar la mortalidad a casi el 80% (Desilles et al., 2013). Incluso en un evento isquémico no mortal, la magnitud del edema cerebral es predictiva del deterioro funcional

(secuelas) en los pacientes.

Durante los primeros minutos de la isquemia cerebral se forma el edema citotóxico, que consiste en el aumento del volumen celular principalmente en astrocitos y neuronas (Noremborg, 1994; Risher et al., 2009). Su formación inicia con el flujo de iones (especialmente de Na^+) en favor de su gradiente de concentración, desde el espacio intersticial al espacio intracelular debido al déficit energético. Esto, impulsa el arrastre de agua a través de canales especializados en el transporte de agua como la acuaporina 4 (AQP4) (Figura 1).

El edema citotóxico no produce un aumento en el volumen cerebral de manera directa; sin embargo, genera la fuerza impulsora para un reordenamiento del agua en el espacio intersticial. Al disminuir los iones de Na^+ en el espacio extracelular, se genera un nuevo gradiente de Na^+ a través de la BHE que favorece la entrada de Na^+ y agua desde el torrente sanguíneo, dando paso a la generación del edema iónico. Este, comparte el mecanismo con el edema citotóxico pero ocurre en el EnVC (Mori et al., 2002). Debido a lo anterior, el edema iónico está íntimamente asociado con la permeabilidad de la BHE y el estado de perfusión sanguínea local. Es decir, la magnitud del flujo de reperfusión post-isquémica se correlaciona positivamente con la carga de edema cerebral (Bell et al., 1985).

En el inicio de la formación del edema iónico están involucrados diversos transportadores expresados por las células del EnVC como el transportador de Cl^- , K^+ y Na^+ normalmente denominado NKCC; el intercambiador de Na^+/H^+ (NHE); así como los transportadores de glutamato que internalizan 3 moléculas de Na^+ por cada molécula de glutamato (Hansson et al., 2000; Kitayama et al., 2001; Su et al., 2002). Así mismo, canales permeables a Na^+ regulados por ATP los cuales aumentan su conductancia durante el déficit energético tienen una participación fundamental en la formación del edema. Estos mecanismos, permiten que el Na^+ se mueva en favor de su gradiente electroquímico a través de la BHE y hacia el parénquima cerebral (Kitayama et al., 2001; Simard et al., 2012).

Durante la formación de edema iónico, la BHE permanece impermeable a las proteínas plasmáticas circulantes. Sin embargo, a medida que el edema cerebral madura, las células del EnVC se contraen y los microvasos pierden gradualmente su integridad estructural, induciendo la formación del edema vasogénico. En este caso, varios mecanismos favorecen la contracción celular. Entre estos destacan el aumento en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que induce la proliferación celular y de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), las cuales degradan proteínas de unión estrecha expresadas en la membrana que une las células endoteliales (e.g. Cludina, ZO-1, Occludina) (Kovács et al., 1996; Stokum et al., 2016; Victoria et al., 2020). En consecuencia, durante el edema vasogénico se observa el paso de proteínas del plasma a través de la BHE.

El deterioro vascular continua hasta permitir la extravasación de células del torrente sanguíneo (e.g. eritrocitos) y la progresión hacia a la hemorragia (Simard et al., 2007; Stokum et al., 2016) (*Figura 1*).

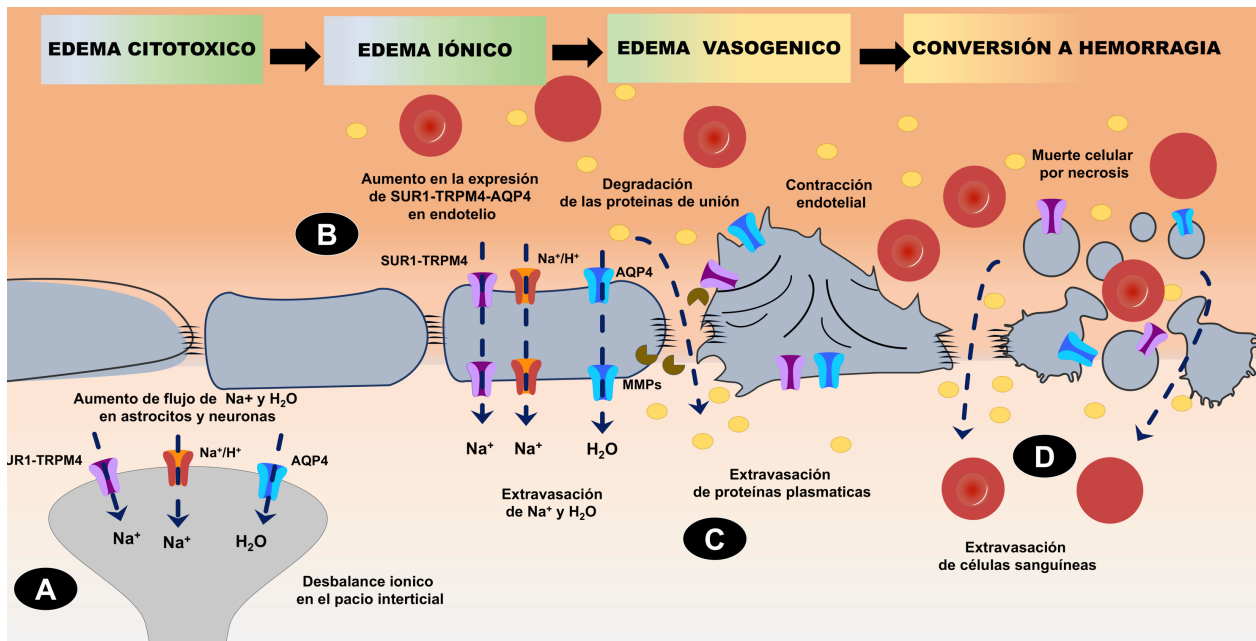


Figura 1. Mecanismo molecular del daño a la BHE y la formación del edema. Representación esquemática del inicio de la formación del edema y la conversión a hemorragia. **(A) Edema citotóxico.** El déficit energético durante la isquemia cerebral provoca la despolarización de las membranas celulares, induciendo la internalización de N^+ y agua desde el espacio intersticial en los astrocitos y neuronas. **(B) Edema iónico.** El desequilibrio de iones y agua en el espacio intersticial provoca un nuevo flujo de iones y agua desde el torrente sanguíneo a través canales iónicos permeables a Na^+ (e. g. SUR1-TRPM4, NKCC y NHE) expresados en las células endoteliales. **(C) Edema vasogénico.** El aumento en la expresión de factores de crecimiento endotelial como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) así como de las metaloproteinasas de matriz (MPPs) induce la ruptura de las proteínas de unión estrecha entre las células endoteliales, permitiendo el paso de macromoléculas. **(D) Edema hemorrágico.** El aumento de volumen celular induce la contracción endotelial y la muerte celular por necrosis, se pierde totalmente la integridad de la BHE permitiendo el libre paso de células sanguíneas y progresión hacia la hemorragia. (Modificado de Stokum et al 2016).

Actualmente, las terapias utilizadas para contrarrestar el edema cerebral solo minimizan las consecuencias críticas, ya que no son específicas de la fisiopatología subyacente. Por ejemplo, la craniectomía descompresiva no inhibe el aumento en el volumen cerebral, sino que permite que el cerebro se expanda fuera del cráneo reduciendo así la presión generada. Si bien las terapias hiperosmóticas como el uso

de manitol intravenoso reducen la acumulación de agua en el parénquima y el aumento de volumen cerebral, simplemente compiten con las fuerzas impulsoras que promueven la formación de edema en lugar de inhibirlas, lo que eventualmente puede revertirse teniendo como consecuencia el fenómeno de rebote (McManus y Soriano, 1998; Stokum et al., 2016).

Debido a lo anterior, recientemente se ha intensificado la búsqueda de blancos terapéuticos para combatir la formación del edema cerebral desde sus inicios.

1.5 El receptor de sulfonilurea 1 (SUR1) en el SNC

La superfamilia de proteínas con casete de unión a ATP (ABC) incluye proteínas que poseen sitios de unión a ATP. La mayoría de ellas hidrolizan ATP para mover solutos a través de membranas biológicas. Son transportadores con una estructura modular clásica de cuatro dominios estructurales característicos: dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) y dos dominios transmembranales (TMD1 y TMD2), cada uno con 6 a 10 hélices transmembranales.

Dentro de esta superfamilia de proteínas se encuentra la familia de receptores a sulfonilureas (SUR) tipo 1 y 2. Existen dos variantes de SUR2, resultado de corte y empalme alternativo denominados SUR2A y SUR2B, que difieren entre sí en los últimos 42 aminoácidos (Chutkow et al., 1996; Isomoto et al., 1996; Yamada y Kurachi, 2005). A diferencia del resto de las proteínas ABC, los receptores SUR contienen un módulo adicional de cinco hélices transmembranales (TMD0) que conecta a TMD1 por un bucle citosólico largo conocido como el enlace CL3 (Aittoniemi et al., 2009) (Figura 2).

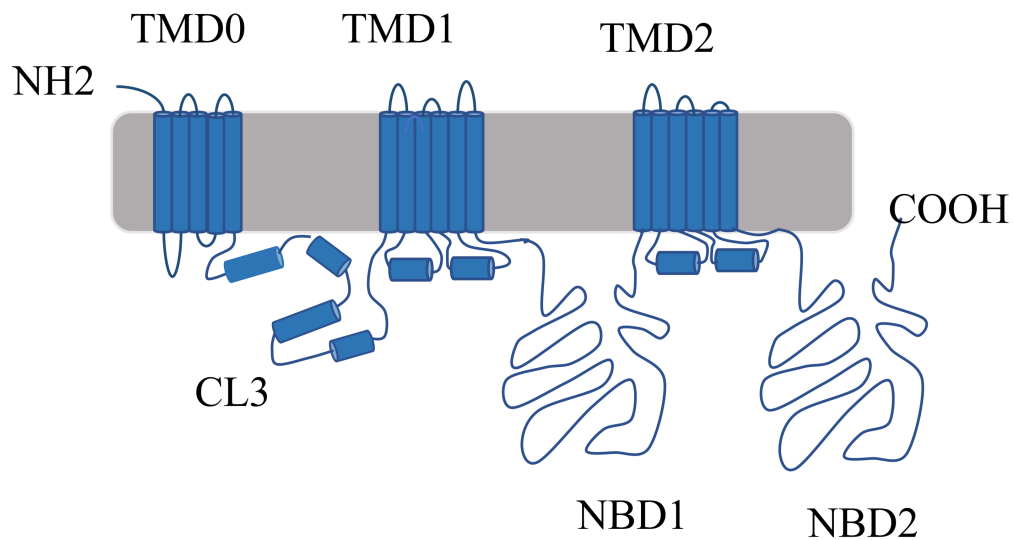


Figura 2. Representación esquemática de la estructura clásica del receptor a sulfonilurea 1 (SUR1). SUR1 posee 2 dominios principales (TM1 y TM2) de 6 segmentos transmembranales, comunes a las proteínas ABC. Además, tiene un tercer dominio TM0 con 5 segmentos transmembranales. TM0 está unido a TM1 a través de un bucle citosólico CL3. Los dominios TM1 y TM2 poseen bucles de unión a nucleótidos (NBF) que proporcionan los sitios de regulación de la proteína (Modificado de Matsuo et al., 2000).

Las proteínas SUR, no realizan ninguna función de transporte conocida; sin embargo, en condiciones fisiológicas participan en el ensamblaje heteromultimérico en estequiometría 4:4 con canales permeables a K^+ Kir6 (Kir6.1 y Kir6.2), para formar los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP). Entre los canales KATP más estudiados constituidos por Kir6 y SUR se encuentran SUR1-Kir6.2, SUR2A-Kir6.2, SUR2B-Kir6.2 y SUR2B-Kir6.1 (Ämmälä et al., 1996; Aguilar-Bryan et al., 1998; Seino, 2003). Las subunidades Kir6 poseen un sitio de unión a ATP mientras que SUR posee dos (Aguilar-Bryan et al., 1995; Tucker et al., 1997). Por ello, el canal resultante es un complejo muy grande en términos de tamaño con 96 hélices transmembranales y 12 sitios reguladores dependientes de la unión a ATP (Simard

et al., 2012b). Debido a lo anterior, la actividad de los canales KATP depende directamente de las concentraciones intracelulares de ATP/ADP y por lo tanto está directamente relacionada al estado metabólico celular (Figura 3 A).

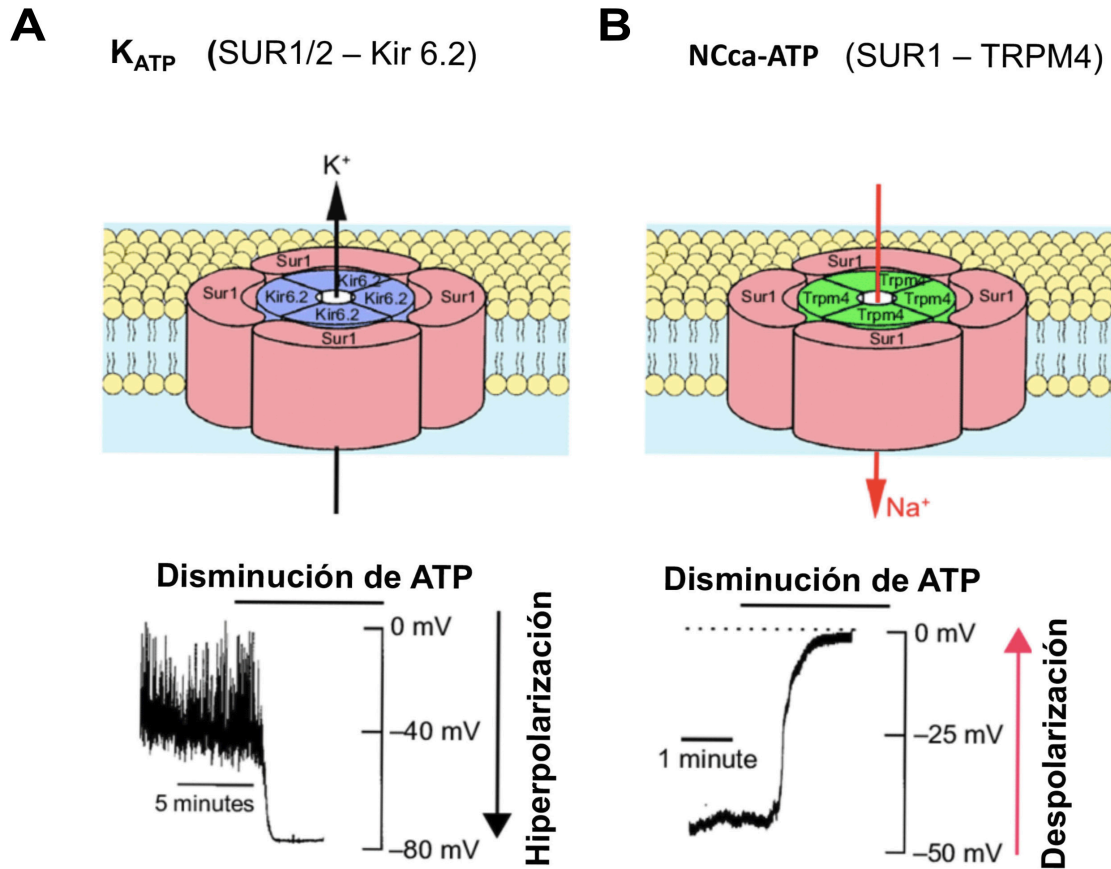


Figura 3. Representación esquemática de los canales KATP (SUR1-Kir6) y NCCa-ATP (SUR1-TRPM4). (A) Estructura del canal KATP. Posee una estructura heterooctamérica que comprende cuatro subunidades SUR1 y cuatro subunidades Kir6. Es activado por agotamiento de ATP lo que conduce a un flujo saliente de K^+ que resulta en hiperpolarización de la célula. (B) Estructura del canal NCCa-ATP. Está formado por cuatro subunidades SUR1 y cuatro subunidades TRPM4, al igual que el canal KATP es activado por el agotamiento de ATP. En este caso, el flujo entrante de Na^+ induce la despolarización celular (Modificado de Simard et al 2007).

Los canales KATP se expresan en diferentes tejidos siendo abundantes en el pancreático donde cumple funciones fisiológicas importantes (e. g. SUR1-Kir6.2 es crítico en la secreción de insulina) (Miki et al., 1998; Seino, 2003); mientras que en tejido cardiaco, donde se expresan casi todas las variantes de canales KATP (e. g. SUR1-Kir6.2, SUR2A-Kir6.2, SUR2B-Kir6.2 y SUR2B-Kir6.1) regulan la contractibilidad celular (Nichols, 2016). En el tejido cerebral, SUR1-Kir6.2 se expresa constitutivamente en regiones específicas como hipocampo, hipotálamo y estriado (Ohno-Shosaku and Yamamoto, 1992; Liss and Roeper, 2001). La actividad del canal KATP en neuronas regula la excitabilidad neuronal, lo que a su vez, conduce un flujo saliente de K^+ dependiente de la actividad eléctrica (Laming, 2000). Adicionalmente, el cambio en la concentración externa de K^+ podría acoplar la demanda metabólica local por aumento en la actividad neuronal y la perfusión cerebrovascular, ya que el aumento leve en la concentración de K^+ extracelular es un potente inductor de vasodilatación local (Nguyen et al., 2000).

Por otro lado, SUR1 normalmente está ausente en oligodendrocitos, astrocitos, endotelio y muchos tipos neuronales (Sullivan y Harik, 1993). De manera interesante, en muchas enfermedades cerebrales como la isquemia, la expresión del gen *Abcc8* que codifica para SUR1 aumenta progresivamente en todas las células de la UNV (Mehta et al., 2015); mientras que la expresión del gen *Kcnj11* que codifica para Kir6.1 permanece sin cambios (Simard et al., 2006). Por consiguiente, la participación de los canales de KATP en condiciones de isquemia cerebral continúa sin ser esclarecida y se conoce poco de la función de SUR1.

1.6. Participación del canal SUR1-TRPM4 durante la isquemia cerebral

En isquemia cerebral, SUR1 adquiere la capacidad de asociarse a canales de Na^+ como el receptor a melastatina de potencial transitorio 4 (TRPM4). El canal iónico SUR1-TRPM4 anteriormente denominado NCca-ATP es un canal no selectivo, permeable a iones monovalentes (Na^+ , K^+ y Cl^-) e impermeable a iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) (Simard et al., 2006; Vennekens y Nilius, 2007) (Figura 3).

Se ha demostrado que TRPM4 se expresa en numerosos tejidos humanos incluyendo placenta, músculo esquelético, corazón, riñón, hígado, páncreas, timo, bazo, próstata, intestino delgado, colon y pulmón (Xu et al., 2001; Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003). En ratón, TRPM4 se ha encontrado expresado en estómago, intestino, placenta, esófago, endotelio aórtico, riñón, corazón, páncreas y placenta sin encontrar expresión en leucocitos y en tejido cerebral (Nilius et al., 2003). Sin embargo, la expresión *de novo* de SUR1-TRPM4 aumenta en todas las células de la UNV después de una lesión cerebral (Simard et al., 2006, 2010b; Mehta et al., 2015).

Otra diferencia importante entre SUR1-TRPM4 y SUR1-Kir6.2 es la asociación de SUR con Kir6, que favorece el tráfico y la localización del canal en la membrana celular. Cuando se expresan de forma independiente, tanto SUR1 como Kir6.2 se estancan en el retículo endoplásmico debido a la exposición de la señal de retención (tripéptido RKR) (Gullo et al., 1991; Kawaki et al., 1999; Partridge et al., 2001). Mientras que TRPM4 puede migrar a la membrana celular de manera independiente a SUR1. Sin embargo, durante la isquemia cerebral se desarrollan condiciones de expresión aún no identificadas, que promueven el ensamblaje previo de ambas proteínas; este ensamblaje proporciona características funcionales importantes al canal, entre las que destacan la sensibilidad a ATP y la respuesta a glibenclamida (Tabla 1) (Simard et al., 2012a; Woo et al., 2013).

Tabla 1. Propiedades de los canales SUR1-TRPM4 y TRPM4.

	SUR1-TRPM4	TRPM4
Conductancia del canal	25 a 35 pS	25 pS
Conductividad a cationes divalentes	No	No
Radio del poro	0.41 nm	----
Activación por Ca ²⁺ (EC ₅₀)	1.12 a 1.5 µmol/L	1.3 µmol/L
Bloqueo por ATP (EC ₅₀)	0.8 µmol/L	0.13 a 1.7 µmol/L
Bloqueo por ADP, AMP	No	Si
Dependencia de voltaje	No	Si
Activación por PIP2	Si	Si
Activación por PKC	No	Si
Bloqueo por glibenclamida (EC ₅₀)	48 nmol/L	10 a 100 µmol/L

EC, dosis efectiva; AMP, monofosfato de adenosina; ADP Difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PKC, proteína cinasa C.

Los datos fueron tomados de Simard et al., 2012a.

En condiciones fisiológicas, TRPM4 se expresa de manera constitutiva y está involucrado en la regulación de la entrada de Ca^{2+} (Vennekens y Nilius, 2007; Guinamard et al., 2012). Debido a que TRPM4 es un canal no selectivo permeable a cationes monovalentes, su activación induce la despolarización celular, por lo tanto al activarse se reduce la fuerza impulsora que moviliza Ca^{2+} (Sattler y Tymianski, 2000; Bano y Nicotera, 2007). Es por ello que las células que expresan TRPM4 acumulan menos Ca^{2+} intracelular en comparación con las aquellas que no lo expresan (Woo et al., 2013). Esto sugiere un papel funcional de SUR1-TRPM4 en isquemia cerebral; es decir, es probable que el incremento en su expresión sea un mecanismo endógeno para proteger a las células de la internalización masiva de Ca^{2+} que ocurre en esta patología (Woo et al., 2013). Sin embargo, debido a que los canales SUR1-TRPM4 son sensibles a ATP, la disminución súbita en su concentración como ocurre durante la isquemia cerebral puede provocar la activación persistente de los canales (Chen et al., 2003). Lo anterior implica que el mecanismo molecular que debería cumplir una función protectora, se transforma inadvertidamente en un mecanismo de daño celular.

De hecho, el agotamiento de ATP y el aumento del Ca^{2+} intracelular en células que expresan SUR1-TRPM4 estimulan la actividad del canal, lo que conduce al aumento en el volumen celular debido al influjo de Na^+ (Simard et al., 2006). Esto confirma que el canal SUR1-TRPM4 contribuye a la pérdida de la homeostasis iónica durante la isquemia y la reperfusión en el SNC y que involucra a todos los miembros de la UNV (Simard et al., 2007b, 2012b; Besancon et al., 2008) (Figura 3 B). Además, SUR1 interacciona físicamente con AQP4 formando el complejo heteromultimérico (SUR1-TRPM4-AQP4) el cual favorece el acoplamiento osmótico de iones/agua y por lo tanto la formación del edema celular (Stokum et al., 2016, 2018) (Figura 4).

Por lo anterior, SUR1 podría ser un componente decisivo en la conformación de un canal funcional cuya actividad está involucrada en el inicio y desarrollo del edema cerebral. Por lo tanto, la proteína SUR1 ofrece un enfoque terapéutico

interesante para el tratamiento del EVC de tipo isquémico y sus complicaciones como el edema cerebral y que validan nuestro interés en su investigación.

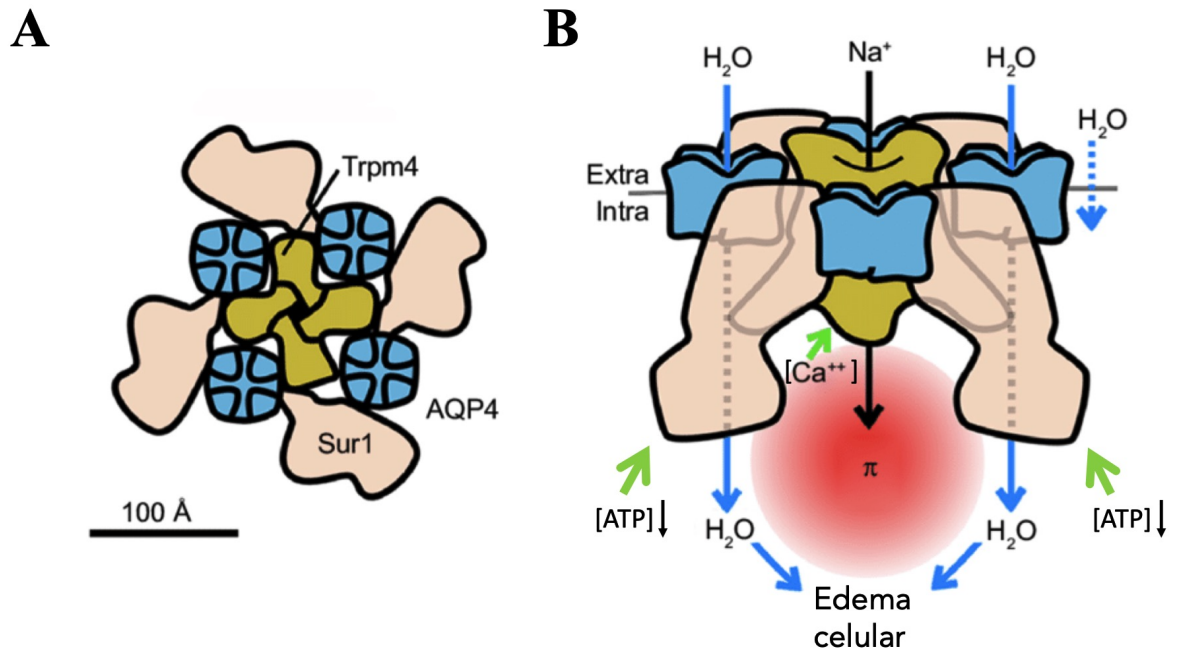


Figura 4. Representación del canal SUR1-TRPM4-AQP4. (A) Modelo del heterocomplejo SUR1-TRPM4-AQP4 que muestra tetrámeros de AQP4 (azul) intercalados entre monómeros SUR1 (rosa) que a su vez interactúan con el canal tetramérico TRPM4 en el centro (amarillo) vista superior. (B) Modelo de flujo de agua a través del heterocomplejo SUR1-TRPM4-AQP4 vista frontal. La disminución intracelular de ATP y el aumento de Ca^{2+} activan al canal SUR1-TRPM4 y favorece el influjo de Na^+ , lo que resulta en un aumento presión osmótica local (π). A su vez, impulsa un flujo de agua (flechas azules) a través de AQP4, lo que produce un aumento de volumen celular (edema celular). Además, parte del flujo de agua ocurre a través de rutas independientes de AQP4, incluso a través de la membrana plasmática (flecha punteada) vista lateral (Modificado de Stokum et al., 2018).

1.7 Regulación transcripcional del gen *Abcc8* en isquemia cerebral

El gen *Abcc8* que codifica para SUR1 contiene 39 exones distribuidos en 80,580 pb (Genebank NM_0130392) (Hernandez-Sanchez et al., 1999). El marco de lectura abierto del ADN complementario de SUR1 de rata codifica para una proteína de 1582 aminoácidos con una masa de 177,209 Da y las proteínas SUR1 típicas tienen un peso de aproximado de 170 kDa (Aguilar-Bryan et al., 1995).

En humanos y en roedores la expresión de la proteína SUR1 es extremadamente variable entre tejidos, así como en las diferentes regiones cerebrales (Karschin et al., 1997; Liss and Roeper, 2001). En consecuencia, los factores de transcripción expresados específicamente en cada tejido controlan la transcripción de *Abcc8*. El promotor basal de *Abcc8* carece de las cajas CAAT y TATA. En su lugar, este promotor contiene un elemento Inr que dirige la transcripción (Smale, 1997). Este es el mecanismo utilizado por los genes de mantenimiento; particularmente, para aquellos genes que están sujetos a regulación de retroalimentación negativa (Reynolds et al., 1984).

Se han identificado algunos factores de transcripción que controlan la expresión específica de *Abcc8* en los diferentes tejidos. El fragmento -660/+ 20 del promotor contiene un elemento de unión a BETA2, un factor transcripcional específico de las células β que también participa en la expresión del gen de la insulina (Kim et al., 2002). BETA2 se localiza en ciertas regiones cerebrales donde adquiere el nombre de NeuroD, mostrando un patrón de distribución similar a la expresión de SUR1 (Karschin et al., 1997; Liu et al., 2000; Kim et al., 2002).

El promotor también contiene un elemento de unión sensible a AMPc (CRE) en la posición -480/-420 (Cho et al., 2012). La proteína de unión a CRE (CREB) y BETA2 juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa al mediar la expresión de hormonas por efecto del estado metabólico celular en células β pancreáticas (Cho et al., 2012). Por lo tanto, es posible que CREB participe en la expresión SUR1 a través de la interacción con NeuroD en cerebro (Karschin et al., 1997; Liu et al., 2000; Kim et al., 2002).

En las células β , la expresión de SUR1 también es regulada por el factor transcripcional de la caja a2 de Forkhead (Foxa2) (Sund et al., 2001; Lantz et al., 2004; Lee et al., 2005) y por el transductor de señal y el activador de la transcripción 3 (STAT3) (Gorogawa et al., 2004). Curiosamente, la localización conservada del grupo de ambas subunidades del canal KATP en el genoma humano y del ratón sugiere que los promotores *Abcc8* y *Kcnj11* podrían compartir elementos reguladores de la transcripción. No obstante, Foxa2 es esencial para la expresión de SUR1 y Kir6.2, mientras que Kir6.2 no requiere de STAT3 (Gorogawa et al., 2004; Lantz et al., 2004). Además, en isquemia cerebral el aumento en la expresión del ARNm y de la proteína SUR1 tiene lugar sin el aumento de la proteína Kir6.2 (Simard et al., 2006). Estos datos indican la regulación altamente específica de la expresión de SUR1 en los diferentes tejidos ante estímulos específicos.

En el contexto de la isquemia y la reperfusión cerebral otros mecanismos están involucrados en la expresión de SUR1. La proteína específica 1 (SP1) y la proteína específica 3 (SP3) son factores que se expresan de forma ubicua y regulan significativamente la actividad transcripcional de los promotores sin caja TATA. El promotor de *Abcc8* contiene 5 sitios de unión a SP (5'-GGGCGG-3') ubicados en la región proximal al sitio de inicio de la transcripción (-86 a +24). Aunque SP no parece ser específicos para la inducción de *Abcc8*, son necesarios para activar o reprimir la transcripción de *Abcc8* dependiendo del estado REDOX celular (Hernández-Sánchez et al., 1997; Wierstra, 2008; Woo et al., 2012). Ambos factores compiten por la misma secuencia consenso (Bouwman y Philipsen, 2002; Yu et al., 2003); sin embargo, mientras que el factor SP3 se comporta como un represor de la actividad transcripcional, SP1 lo hace como un potenciador (Yu et al., 2003; Li et al., 2004). Un mecanismo de regulación propuesto sugiere que el aumento del estrés oxidante durante la isquemia y la reperfusión conduce a la oxidación de SP3 impidiendo su unión al ADN y favoreciendo la unión de SP1, incrementando así la transcripción de *Abcc8* (Hota et al., 2010).

Por otro lado, el factor 1 inducible por la hipoxia (HIF-1) que participa en la respuesta a la concentración reducida de oxígeno, podría incrementar la expresión

de *Abcc8* durante el periodo de isquemia. En el promotor de *Abcc8* existen 5 elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) ubicados en la región -521/+62 (Woo et al., 2012). En condiciones de normoxia, las proteínas prolinhidroxilasas (PHD) hidroxilan 2 residuos de prolina en la subunidad α del HIF-1 α en forma dependiente de O₂ y Fe²⁺ (Fong y Takeda, 2008; Nguyen y Durán, 2016). El HIF-1 α hidroxilado se une a la proteína Von Hippel-Lindau (VHL) del complejo E3 ligasa de ubiquitina, es poliubiquitinado y posteriormente degradado por vía proteasomal (Fong y Takeda, 2008; Nguyen y Durán, 2016). Sin embargo, durante la hipoxia la actividad de las PHD se inhibe, HIF-1 α no se degrada y se transloca al núcleo donde se une a la subunidad HIF-1 β para formar el HIF-1 activo. De esta forma, HIF-1 α podría mediar la expresión de *Abcc8* durante la isquemia (Nguyen y Durán, 2016). Además, las ERO inhiben la actividad de las PHD, por lo que el estrés oxidante podría regular la expresión de *Abcc8* durante la reperfusión (Cash et al., 2007). Aunque HIF-1 es necesario para inducir la transcripción de *Abcc8*, la mutación de los sitios HRE no afecta su expresión basal. En cambio, lo hace la mutación de los sitios de unión a SP1, ya que es necesaria la activación secuencial de HIF-1 y SP1 (la transcripción de este último es activada por HIF-1), siendo SP1 el responsable directo de la regulación de la transcripción de SUR1 en condiciones de isquemia y reperfusión (Woo et al., 2012).

Así mismo, la región promotora de *Abcc8* (-357 to -348) contiene 2 sitios de unión para el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B)(Simard et al., 2009). En condiciones basales NF κ B se encuentra en el citosol anclado a I κ B. La hiperfosforilación de I κ B por las cinasas IKK α e IKK β favorece su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal, liberando a NF κ B y permitiendo su translocación hacia el núcleo (McInnis et al., 2002). El estrés oxidante activa/inactiva proteínas sensibles al estado REDOX como las cinasas IKK α y IKK β (Kamata y Hirata, 1999). En consecuencia la actividad de NF κ B responde a los cambios en el estado REDOX del citoplasma y se transloca al núcleo en respuesta al estrés oxidante celular (Li et al., 2011; Morgan y Liu, 2011). Además, la transcripción de SUR1 podría incrementarse en un contexto inflamatorio

y depender de la actividad de NF κ B (Fan y Cooper, 2009; Kawabori y Yenari, 2015).

En resumen, el aumento en la expresión de *Abcc8* depende de diversos factores; sin embargo, durante la isquemia y reperfusión cerebral podría estar ligado al incremento en la actividad de factores transcripcionales sensibles al estado REDOX como SP1 y NF κ B (Liang et al., 2007; Simard et al., 2009; Woo et al., 2012).

1.8 Regulación de la vía PTEN/PI3K/AKT por estrés oxidante

La proteína cinasa B (PKB), también conocida como AKT, es una proteína cinasa de serina y treonina que juega un papel crítico en el control del equilibrio entre la apoptosis y la supervivencia celular en el contexto de isquemia cerebral (Omori et al., 2002). Actualmente se conocen tres isoformas (AKT1, AKT2 y AKT3) siendo AKT1 la isoforma predominante en cerebro de mamíferos (Friguls et al., 2001; Yalcin et al., 2010; Chetram et al., 2013). La vía clásica de activación de AKT depende principalmente de la 3-cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K), una cinasa que fosforila al 4, 5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) dando a origen al 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3). Este último actúa como segundo mensajero activador de la cinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1) la cual una vez activa, fosforila a AKT en la Thr308, lo que conduce a su activación (P-AKT).

A su vez, la p-AKT fosforila a IKK α e IKK β induciendo la translocación nuclear de NF κ B (Kane et al., 1999). Así mismo, AKT fosforila y activa directamente al factor transcripcional SP1 (Pore et al., 2004). Por otro lado, el PIP3 es rápidamente metabolizado por la fosfatasa de inositol (PTEN) antagonizando la función de PI3K (Stoker, 2005; Simone et al., 2011).

Las ERO generadas durante la isquemia y la reperfusión inducen un aumento considerable en la actividad de AKT al inducir la inhibición de PTEN (Friguls et al., 2001; Song et al., 2008). Las ERO promueven la S-nitrosilación, la ubiquitinación y posterior degradación de PTEN (Gupta et al., 2017). Un estímulo isquémico severo (e. g., el observado en la zona de infarto) provoca la disminución drástica de la actividad de PTEN mientras que un estímulo moderado (e. g., en la zona de

penumbra) permite que PTEN conserve parcialmente su actividad. Tal diferencia regional sugiere una relación importante entre el grado de la lesión isquémica, el equilibrio REDOX celular y el aumento en la actividad de AKT. De esta manera, estos factores determinan la activación de una vía de señalización de supervivencia o de muerte (Omori et al., 2002; Wang et al., 2019).

1.9. Resveratrol como terapia en la isquemia cerebral

El trans-3, 4', 5-trihydroxil-ystilbeno o también llamado resveratrol (RSV) es una fitoalexina natural que se encuentra en muchos frutos y semillas, siendo abundante en la piel y las semillas de la uva (Vang et al., 2011). Este compuesto tiene una hidrosolubilidad de ~ 3 mg/100 mL, propiedad que lo hace prácticamente insoluble en agua; sin embargo, presenta una alta permeabilidad a la membrana debido a que es altamente soluble en lípidos (Amri et al., 2012). Esta propiedad, favorece la absorción del RSV por difusión pasiva o bien formando complejos con transportadores de membrana como las integrinas a nivel intestinal y cerebral en la BHE (Planas et al., 2012). Una vez que el RSV llega a la circulación sistémica, se metaboliza rápidamente formando el glucurónido y el sulfato de RSV, hasta ser completamente metabolizado después de 8.0 h (Frombaum et al., 2012). Tanto el RSV como sus metabolitos pueden unirse a albúmina y a lipoproteínas. Dado que el RSV tiene una alta afinidad por la albúmina se sugiere que ésta podría ser un reservorio natural de este compuesto y por lo tanto jugar un papel importante en su biodisponibilidad (Walle, 2011; Frombaum et al., 2012; R. Neves et al., 2012).

Entre las propiedades del RSV, destaca su bajo perfil de toxicidad que ha sido confirmado tanto en animales de laboratorio como en humanos. Dosis diarias de 0.5, 1, 2.5 y 5 g de RSV durante 29 días a voluntarios sanos no provocan efectos adversos graves. Tan sólo se reportan efectos gastrointestinales leves con las dosis de 2.5 y 5 g (Boocock et al., 2007; Brown et al., 2010; Cottart et al., 2014). Su valor NOAEL (Nivel de efecto adverso no observable) es de 200 mg/kg/día en ratas y 300 mg/kg/día en perros (Crowell et al., 2004; Johnson et al., 2011). A la fecha no se han identificado interacciones farmacológicas que puedan reducir o aumentar el efecto de otros fármacos cuando son co-administrados con el RSV. Además, dado

que la biodisponibilidad del RSV es baja, se requieren de altas concentraciones para inducir toxicidad (Sergides et al., 2016). En conclusión, el RSV es una molécula con un perfil de toxicidad relativamente bajo en estudios de administración a corto plazo.

El RSV posee un amplio espectro de actividades biológicas que validan el interés en su investigación, entre las que se encuentran propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, cardioprotectoras y analgésicas (Vauzour, 2012; Rauf et al., 2018). Además, el RSV destaca por sus propiedades antioxidantes, específicamente por su gran capacidad para capturar O_2 (Sun et al., 2008; Gülçin, 2010; Le et al., 2019). Por lo tanto, el RSV se ha estudiado como agente terapéutico para enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y recientemente con una relevancia creciente para los trastornos neurológicos, incluidos los tumores cerebrales, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Andrade et al., 2018).

Los efectos protectores del RSV también se han valorado en diversos modelos de isquemia cerebral (Pineda-Ramírez et al., 2018) En estos modelos, el RSV disminuye significativamente el estrés oxidativo, e incrementa la expresión y actividad de la sirtuina 1 (SIRT1) de manera dosis dependiente (Meng et al., 2015). SIRT1 puede actuar sobre numerosas proteínas como histonas y factores de transcripcionales y a menudo su actividad está asociada con la represión transcripcional (Cohen et al., 2012; Pineda-Ramírez et al., 2017). Lo anterior, sugiere que los efectos neuroprotectores y antioxidantes del RSV en el contexto de isquemia cerebral dependen de la regulación de la expresión génica a través de SIRT1 (Meng et al., 2015; Pineda-Ramírez et al., 2017).

Además, recientemente se ha descrito que el RSV mejora la producción de óxido nítrico, mejorando el equilibrio redox en las células endoteliales que forman la vasculatura, inhibiendo la respuesta al daño proinflamatorio y metabólico como ocurre durante la isquemia cerebral (Schmitt et al., 2010). En nuestro laboratorio previamente demostramos que una sola dosis de RSV administrada al inicio de la reperusión, disminuye la producción de ERO en un modelo in vivo de isquemia

cerebral inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) (Trejo quiñones et al 2013).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las muertes por complicaciones de la isquemia cerebral están entre las primeras causas de muerte en México y en el mundo. El edema cerebral no controlado, una complicación frecuente de la isquemia cerebral, se asocia con mayor mortalidad, siendo de mal pronóstico en los accidentes cerebrovasculares, incluso aquellos de poca o moderada gravedad. Las opciones terapéuticas para revertir los efectos del edema cerebral son limitadas y no suelen mitigar sus secuelas. Además, algunas maniobras que se emplean, como la terapia osmótica o la craniectomía, tienen resultados impredecibles, e incluso pueden complicar el cuadro clínico (Deng et al., 2016). Por ello, es urgente identificar nuevos blancos terapéuticos que ayuden a prevenir o disminuir el edema cerebral secundario a la isquemia cerebral y mitigar sus secuelas, incluida la cuantiosa inversión en hospitalización y cuidado de los sobrevivientes.

En el inicio de la formación del edema cerebral está involucrada la participación de un canal iónico permeable a Na^+ y agua (SUR1-TRPM4-AQP4), el cual aumenta su expresión en las EnVC respondiendo a estímulos como la falta de oxígeno y el estrés oxidante generados durante la isquemia y la reperfusión. Lo anterior debido a que las regiones promotoras del gen *Abcc8* (SUR1) tienen sitios de unión a diversos factores transcripcionales sensibles al estrés oxidante, entre los que destacan los factores transcripcionales SP1, HIF-1 y $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Hernández-Sánchez et al., 1997; Wierstra, 2008; Simard et al., 2009; Woo et al., 2012). Además, se ha demostrado, que la inhibición de la expresión del gen *Abcc8* y de *Trpm4* previene el daño a la BHE y disminuye la formación del edema cerebral (Riccio et al., 2002; Gerzanich et al., 2009; Simard et al., 2010).

Por otro lado, en nuestro laboratorio previamente demostramos que una sola dosis de RSV administrada al inicio de la reperfusión, disminuye la producción de

ERO en un modelo in vivo de isquemia cerebral inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) (Trejo quiñones et al 2013).

En este contexto, es posible que el mecanismo protector del RSV se deba a la inhibición de la formación del edema cerebral desde sus inicios a través de la regulación de la expresión de SUR1. Por lo tanto, planteamos la siguiente hipótesis

III. HIPÓTESIS

El RSV reduce la actividad de factores de transcripcionales sensibles al estado REDOX como Sp1, HIF-1 y NF κ B, lo cual a su vez disminuye la expresión del gen *Abcc8* que codifica para SUR1. La disminución en la expresión de SUR1 reduce el daño al EnVC inhibiendo la formación del edema cerebral desde sus inicios, preservando la integridad de la BHE.

En consecuencia, para evaluar el efecto protector del RSV en el daño a la BHE y la formación del edema cerebral, se plantearon los siguientes objetivos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del RSV en la expresión de SUR1 como mecanismo de prevención en la formación de edema en isquemia cerebral.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1.1 Evaluar si el RSV reduce la formación del edema en condiciones de isquemia cerebral.
- 4.1.2 Establecer si el RSV disminuye la expresión del ARNm y de la proteína de SUR1 en condiciones de isquemia cerebral
- 4.1.3 Establecer si el RSV regula la transcripción de SUR1 modulando la actividad de los factores transcripcionales sensibles al estrés oxidante.
- 4.1.4 Evaluar el efecto del RSV en la actividad del canal SUR1-TRPM4 en condiciones de isquemia cerebral.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 280 a 320 g de peso corporal procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. Los animales fueron mantenidos en jaulas de acrílico, bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 h 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 establecidos por la Norma Oficial Mexicana para la Producción Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

5.2 Modelo experimental para la inducción de isquemia cerebral focal transitoria

La oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) es una de las causas más comunes de accidente cerebrovascular de tipo isquémico en humanos. Por lo tanto, para inducir la isquemia cerebral transitoria se utilizó el modelo de MCAO descrita por Longa et al., (1989). Las ratas 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, un monofilamento de nylon de 3-0 se introdujo a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm). En este punto el filamento ocluyó el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media. Después de 2 h de oclusión el filamento se retiró cuidadosamente; los animales en esta etapa fueron anestesiados y suturados nuevamente con la finalidad de permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperusión). Los animales se mantuvieron 15 min una temperatura de 37°C durante la recuperación de la anestesia. Posteriormente, las ratas fueron

decapitadas a diferentes tiempos después de iniciada la reperfusión dependiendo del método utilizado para analizar el tejido.

5.3 Tratamiento

Después de 2 h de MCAO y al inicio de la reperfusión, los animales fueron anestesiados e inyectados en la vena caudal con un volumen total de 100 μ L de vehículo (etanol preparado al 50% diluido en agua) utilizando una dosis final de 132 mg /kg de peso corporal o RSV (R5010, Sigma-Aldrich) utilizando una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal. Debido a la baja biodisponibilidad del RSV y a su baja toxicidad, se utilizó la concentración soluble más alta en 100 μ L de vehículo. Los compuestos antioxidantes curcumina (+CUR) y N-acetilcisteína (+NAC) se utilizaron como controles antioxidantes, y fueron administrados a concentraciones equimolares tomando como referencia la concentración de RSV (27.7 mM). Por lo tanto, se utilizó una dosis de ~3.0 mg/kg de peso corporal de CUR y 1.35 mg/kg de peso corporal de NAC diluidas en dimetilsulfóxido al 25% y solución salina, respectivamente.

5.4 Diseño experimental

Los animales fueron incluidos aleatoriamente en los siguientes grupos: 1) CT, animales sometidos a MCAO simulada; 2) +VH, animales sometidos a 2 h de MCAO e inyectados con vehículo; y 3) +RSV, +NAC, o +CUR, animales sometidos a 2 h de MCAO e inyectados con RSV, NAC, o CUR. Un total de 63 animales fueron utilizados para el estudio, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en todos los grupos. El número de animales varió en cada experimento.

5.5. Supervivencia

Con el objetivo de evaluar el efecto del RSV en la supervivencia de los animales sometidos a isquemia cerebral, se calculó el porcentaje de animales que sobrevivieron por un periodo de 24 h después de haberse iniciado la reperfusión. Para la obtención del porcentaje de animales vivos y no vivos, se consideró como 100% el número total de individuos pertenecientes a cada grupo. En seguida, se

realizo una tabla de contingencia y el análisis de chi-cuadrada fue utilizada para el análisis estadístico.

5.6 Evaluación del estado neurológico

El territorio que irriga la MCA comprende regiones somatosensoriales involucradas con el movimiento y el control de la postura, en consecuencia la hemiplejía o déficit motriz se observa con frecuencia en animales sometidos a MCAO. Por lo tanto, para el estudio fisiopatológico y evaluación de terapias farmacológicas, es importante evaluar el deterioro de la función motora.

Se evaluó el efecto del RSV sobre la función neurológica y la integración sensorio motriz de los animales sometidos a isquemia cerebral utilizando la prueba de asimetría o desviación en el uso de las extremidades delanteras (BIAS). La prueba se realizó 24 h después de la reperfusión en condiciones de poca luz y bajo ruido ambiental. El método se describió previamente y de manera detallada por Roof et al. (2001) En resumen, las ratas fueron colocadas en un cilindro acrílico transparente (25 cm de diámetro, 40 cm de altura) (Figura 9 A), en donde el comportamiento fue registrado en video durante 5 minutos. Para cuantificar la asimetría locomotriz se registró el número de contactos que los animales realizaron con las extremidades delanteras en la pared del cilindro. De estos, se obtuvo el número de contactos realizados con la extremidad ipsilateral a la lesión (no alterada), la contralateral a la lesión (alterada) y el número de contactos realizados simultáneamente con ambas extremidades. En seguida, se calculó el porcentaje de contactos con cada extremidad (Ipsi- y contra-lateral) en relación con el número total de contactos.

$$\% \text{ de contactos (ipsi o contralateral)} = \frac{\text{Número contactos (ipsi o contra lateral)} \times 100}{\text{Numero total de contactos}}$$

Finalmente, se calculó la desviación en el uso de las extremidades (BIAS) restando el porcentaje de uso de la extremidad contralateral a la lesión al porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral a la lesión.

$$\% \text{BIAS} = \% \text{contactos ipsilaterales} - \% \text{contactos contralaterales}$$

5.7 Evaluación de la permeabilidad de la BHE

Con el objetivo de evaluar el efecto del RSV sobre la integridad de la BHE, se utilizó la técnica de extravasación del azul de Evans. La técnica evalúa la presencia de la albúmina sérica plasmática en el parénquima cerebral. El fundamento de la técnica consiste en la capacidad del colorante azul de Evans para unirse a la albúmina sérica en el torrente sanguíneo (Reeve, 2006). Dado que la albúmina plasmática no atraviesa la BHE en condiciones fisiológicas, la acumulación del colorante en el tejido cerebral permite estimar de forma fácil y confiable el daño a la BHE.

Se inyectó por vía intravenosa una solución de azul Evans (E2129, Sigma-Aldrich) diluido al 2% en solución salina (NaCl al 0.9%) a una dosis de 4 mL/kg de peso. A continuación, se permitió la circulación del colorante durante 24 h siguiendo el método de (Manaenko et al., 2011). Posteriormente, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg/kg de peso; i.p.) (Q7833215, PiSA) y decapitados. Los cerebros fueron removidos y congelados a -70 °C durante 6 min. A continuación, se obtuvieron cortes coronales seriales de 2,5 mm de grosor, se ordenaron por ubicación y se fotografiaron. La extravasación del azul de Evans provoca la tinción del tejido de un color azul, por lo que se cuantificó la proporción de tejido azul en comparación del tejido normal. El área total de cada corte coronal se consideró como el 100% y el porcentaje correspondiente al tejido “azul” en cada corte fue calculado. Después, para obtener el porcentaje total cerebral todos los valores fueron sumados. La cuantificación se realizó utilizando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

5.8 Evaluación del contenido de agua cerebral

El edema cerebral está definido como un aumento neto de la masa de agua en el cerebro y está presente en la mayoría lesiones agudas del SNC (SNC) (Bell et al., 1985). En el modelo de MCAO el porcentaje de agua cerebral es un indicador de contenido de agua en el tejido y por lo tanto del edema cuando se encuentra aumentado. Se establece al calcular la relación entre el peso húmedo y el peso seco del tejido.

Con el objetivo de evaluar el efecto del RSV sobre la formación del edema cerebral, se evaluó el contenido de agua cerebral. Los animales se anestesiaron y decapitaron 24 h después de la reperfusión. En seguida, se disecaron los cerebros y los hemisferios (ipsi- y contra-lateral a la lesión) fueron separados y pesados en fresco de forma independiente para obtener el peso húmedo. Posteriormente, el tejido fue sometido a una temperatura de 105 °C durante 24 h en una estufa de calor seco; a continuación, el tejido fue pesado nuevamente y registrado su peso seco. El porcentaje de agua cerebral contenida en cada hemisferio se calculó utilizando la siguiente ecuación (Yousuf et al., 2009):

$$\% \text{ Agua en el hemisferio} = \frac{[(\text{Peso húmedo}) - (\text{Peso seco}) * 100]}{\text{peso húmedo}}$$

Finalmente, el de cambio en el contenido de agua entre ambos hemisferios se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Cambio individual de agua (\%)} = \text{contenido de agua ipsilateral (\%)} - \text{contenido de agua contralateral (\%)}$$

5.9 Evaluación del volumen de infarto cerebral

Con el objetivo de evaluar el efecto del RSV sobre el daño tisular, se midió el volumen de infarto utilizando la técnica de tinción con 2, 3, 5-trifenil tetrazolio cloruro (TTC) de acuerdo al método de (Chen et al., 2009). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg/kg; i.p.) (Q7833215, PiSA) y decapitados 24 h después de la reperfusión. El cerebro fue rápidamente disecado y congelado a -70 °C por 6 min para facilitar el corte del tejido. En seguida, el cerebro se cortó

en secciones coronales seriales de 2,5 mm de grosor. A continuación, los cortes fueron separados y colocados individualmente en una placa para cultivo celular de 24 pozos. Los cortes fueron incubados en 1 ml de solución de TTC (T8877, Sigma-Aldrich) diluido al 2% en amortiguador de fosfatos (61.86 mM KH₂PO₄, 38.14 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad y agitación orbital constante en una incubadora con rotor (3528, Eviron Lab-line) a 60 rpm. A continuación, los cortes fueron lavados con 1 mL de amortiguador de fosfatos salino 0.1 M (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Después del lavado el PBS fue retirado y reemplazado con paraformaldehído (158127, Sigma-Aldrich) al 4% diluido en PBS permitiendo la fijación por 1 h. Los cortes fueron retirados del paraformaldehído y alineados para ser fotografiados.

La sección que mostró el mayor efecto fue la corteza somatosensorial, ubicada aproximadamente en la región Bregma -2.16 a -4.20 mm. Por lo tanto, esta región fue considerada para el análisis de imagen utilizando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Paxinos y Watson, 2007). Para evitar la influencia del edema tisular, se considero como área total no infartada las areas tanto del hemisferio ipsilateral como contralateral. (Swanson y Sharp, 1994). En seguida, el volumen de infarto se calculó utilizando la siguiente fórmula, donde el volumen total de la rebanada se consideró como 100%.

$$\% \text{ de Volumen de infarto} = (\text{Area infartada} * 2.5 \text{ mm})(100)/(\text{Area total} * 2.5 \text{ mm})$$

5.10 Análisis de la región promotora del gen *Abcc8*

Con el objetivo de demostrar que la expresión de SUR1 depende de la actividad de factores transcripcionales sensibles al estado REDOX. Se realizó la predicción de los sitios de unión del factor transcripcional SP1, HIF-1 y NFκB en el promotor del gen *Abcc8*. Para el análisis, se consideraron 3000 pb (-2000 a +1000) a partir del codón de inicio de la transcripción (ATG) utilizando el portal Bioinformática ExpASy (<http://www.expasy.Org/genomics>).

Adicionalmente, debido a que la proteína AQP4 y su gen *Aqp4* forman un

complejo con SUR1 y también aumentan su expresión durante la isquemia cerebral (Taniguchi et al., 2000). Realizamos un análisis de predicción de sitios de unión en el promotor de *Aqp4* utilizando las mismas condiciones para el análisis.

5.11 Ensayos de actividad de unión al ADN de factores transcripcionales

Durante la isquemia y reperusión cerebral la expresión del gen *Abcc8* podría estar ligada al incremento en la actividad de factores transcripcionales sensibles al estado REDOX como el factor transcripcional SP1 (Woo et al., 2012). Por lo tanto, con el objetivo de evaluar el efecto del RSV sobre la actividad de unión del factor transcripcional SP1 en el modelo de MCAO se realizaron ensayos de unión al ADN.

5.11.1 Obtención de extractos nucleares

Las proteínas nucleares se extrajeron de acuerdo al método de (Schreiber et al., 1989). Se utilizaron 5 g de tejido de la corteza cerebral ubicada aproximadamente en la región Bregma -2.16 a -4.20 mm (Paxinos y Watson, 2007). El tejido fue lisado utilizando 500 μ L del amortiguador A (10 mM HEPES pH 7,9, KCl de 10 mM, EDTA de 0,1 mM, EGTA de 0,1 mM, DTT de 1 mM) complementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich) y fosfatasas (P2850, Sigma-Aldrich) (dilución 1:100). La mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min y a continuación se adicionó Nonidet P-40 (5%). La mezcla se centrifugó a 12,000 g durante 30 s en una centrifuga (Eppendorf, Modelo 5417R). Inmediatamente, se eliminó el sobrenadante (proteínas del citoplasma) y a la pastilla (núcleos) se le añadieron 50 μ L de amortiguador B (20 mM HEPES pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) más inhibidores de proteasas y fosfatasas. El concentrado nuclear se agitó suavemente durante 30 min a 4 °C; en seguida se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante (proteínas nucleares) fue recuperado. A continuación, se cuantificó el contenido proteico usando el método del ácido bicinconinico (BCA1KIT, Sigma-Aldrich) y se hicieron alícuotas de 15 μ g de proteína las cuales fueron mantenidas a -70 °C hasta su uso.

5.11.2 Alineamiento y marcaje de oligonucleótidos de unión para el factor SP1

Los oligonucleótidos con la secuencia del sitio de unión al factor transcripcional SP1 (Tabla 2, anexo I.) fueron marcados con biotina en los extremos OH-3' utilizando el Kit DNA 3' End Biotinylation (89818, Thermo scientific). Para lo anterior, se preparó un total de 29 μL de mezcla de reacción (1X amortiguador de reacción deoxinucleotidil transferasas terminales (TdT), 100 nM oligonucleótidos de la muestra, 0.5 μM Biotina-11-UTP, 0.2 U/ μL TdT diluidas) mezclando los reactivos que se muestran en la Tabla 3 (anexo I). La mezcla de reacción de incubó a 37 °C durante 30 min. En seguida se adicionaron 2.5 μL e EDTA 0.2 M para detener la reacción y 50 μL de la mezcla de cloroformo: alcohol isomílico (24:1) para extraer las TdT. En seguida, la mezcla se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 16,000 rpm durante 2 min para separar las fases, se retiró el sobrenadante y se almacenó.

El marcaje de los oligonucleótidos complementarios se realizó por separado y posteriormente se alinearon. Para ello, se mezclaron volúmenes iguales de cada oligonucleótido (volumen final 40 μL) y en seguida la mezcla se desnaturalizó en baño maría a 90 °C por 1 min, la cual se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente.

5.11.3. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay) en gel

La detección de actividad de unión al ADN del factor transcripcional SP1 en el modelo *in vivo* se realizó utilizando el kit de EMSA de Quimiluminiscencia de LightShift (20148, Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se mezclaron 15 μg de extracto nuclear y 0.2 ng de oligonucleótidos alineados marcados con biotina (10 fmol) en la mezcla de reacción (1 mM de EDTA, 5 mM MgCl_2 , 2.5% Glicerol, 25 ng/ μL poly dI:dC) (Tabla 4, anexo I). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación, se añadieron 5 μL de amortiguador de carga 6x (0.03% azul de bromofenol, 0.03% xileno cianol FF, 60%

glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6). Inmediatamente, la mezcla se cargó en geles de poliacrilamida [5% Acrilamida, 0.5X TBE (450 mM Tris, 450 mM ácido bórico, 10 mM EDTA)] en condiciones no desnaturalizantes. La electroforésis se corrió con amortiguador TBE 0.5X frío a 50 V por 2 h. Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nylon cargadas positivamente (60207, Biodyne). La transferencia se realizó en una cámara húmeda de transferencia (Bio-Rad) empleando amortiguador TBE 0.5X frío a 380 mA por 45 min. Para unir las proteínas a la membrana, las membranas se reticularon a 120 mJ/cm² en un “*crosslinker*” automático (Amersham Biosciencias) por 1 min.

5.11.4. Revelado de ensayos EMSA

La detección del factor transcripcional SP1 a los oligonucleótidos marcados se realizó con el *kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (89880, Thermo sicientific). La membrana se incubó con 15 mL de amortiguador de bloqueo a temperatura ambiente por 30 min en agitación suave. En seguida se adicionaron 50 µL del conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano diluido en 15 mL de amortiguador de bloqueo (1:300) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en agitación suave. Pasados los 30 min el amortiguador de bloqueo con conjugado se desechó y fue sustituido por 5 mL de amortiguador de lavado 1X para retirar el exceso de conjugado (no unido específicamente); se realizaron 4 lavados con 15 mL de amortiguador de lavado 1X por 5 min a temperatura ambiente en agitación suave. En el último lavado el amortiguador de lavado 1X fue sustituido por 15 mL de sustrato para peroxidasa de rábano (HRP) equilibrado y la membrana se incubó por 5 min.

Para detectar la señal se adicionó 1 mL de la solución de luminol + peróxido de hidrógeno (1:1). La detección se realizó por quimiluminiscencia en un fotodetector (Fusion SOLO S, Vilber Lourmat) utilizando ~10 min de exposición. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

5.11.5 Ensayos de competencia

Con la finalidad de determinar la especificidad de unión del factor SP1, a los oligonucleótidos con su respectiva secuencia consenso, se realizaron ensayos de competencia utilizando oligonucleótidos con secuencias homólogas (específica) y heterólogas (inespecífica), pero sin marcar con biotina. Las mezclas de reacción utilizadas fueron las siguientes: 1) Extracto nuclear (15 µg) + oligonucleótido homólogo-biotina (10 fmol), 2) Extracto nuclear (15 µg) + oligonucleótido homólogo-biotina (10 fmol) + un exceso de oligonucleótido homólogo no marcado (10 nM), y 3) Extracto nuclear (15 µg) + oligonucleótido homólogo-biotina (10 fmol) + un exceso de oligonucleótido heterólogo no marcado (10 nM).

Cuando se adicionó un exceso de oligonucleótido homólogo no marcado (10 nM) la señal desapareció, debido a la competencia específica por el sitio de unión. Cuando el oligonucleótido heterólogo no marcado se adicionó en exceso (10 nM) la señal permaneció, ya que no hubo competencia específica. Este experimento nos indicó que las proteínas se unen de manera específica al oligonucleótido homólogo. Se observaron resultados similares con los factores transcripcionales SP1, HIF-1 y NFκB (Figura 11 A).

5.12. Evaluación de la expresión de ARN mensajero

5.12.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Con el objetivo de evaluar los niveles de expresión del ARNm del gen *Abcc8* se realizó la extracción de ARN total utilizando 5 mg de tejido de la corteza cerebral ubicada aproximadamente entre las coordenadas Bregma -2.16 a -4.20 mm (Paxinos y Watson, 2007). El tejido fue homogenizado en 1 mL de TRIzol® Reagent (15596018; Thermo scientific). Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. En seguida, se agregaron 200 µL de cloroformo (6117781EA, Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol. Después, se agitaron vigorosamente en vortex durante 15 s y se incubaron nuevamente a temperatura

ambiente durante 3 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionaron 0.5 mL de isopropanol (I9516, Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol. Las muestras se mezclaron suavemente y se incubaron a 4 °C durante toda la noche para permitir la precipitación del ARN. Después, se centrifugaron a 12,000 x g por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 1 mL de etanol (E7020, Sigma-Aldrich) al 75% (en H₂O-DEPC). Las muestras se mezclaron vigorosamente en vortex y posteriormente se centrifugaron a 7,500 x g durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. En seguida el ARN se disolvió en 50 µL H₂O-DEPC y se cuantificó inmediatamente, manteniéndose siempre a 4 °C.

Para sintetizar el ADNc se mezclaron 5 µg de ARN total y 2.5 µM de hexámeros al azar (N8080127, Applied Biosystems), la reacción se llevó a un volumen final de 17.5 µL con H₂O-DEPC. La mezcla se incubó durante 7 min a 65°C. Inmediatamente la reacción se transfirió a hielo y se agregaron los otros componentes de la reacción: amortiguador de reacción M-MLV- 1X (M1701, Promega), 200 µM de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) (1969064, Roche), 25 U de inhibidor de ARNasas (RNasin®, N2115, Promega), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV-RT (M1701, Promega) (Tabla 5, anexo I). La mezcla de reacción se incubó 1 h a 37 °C.

5.12.2. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El análisis del gen *Abcc8* realizado en varios tejidos utilizando la técnica de Northern blot ha mostrado que el transcrito posee 4749 nucleótidos distribuidos en 39 exones (Aguilar-Bryan et al., 1995). Mediante RT-qPCR, utilizando la sonda dirigida a los exones 38-39 (Rn01476317_m1, TaqMan® FAM) se evaluó el nivel de expresión del ARNm en nuestro modelo. Como control endógeno se determinó la expresión del ARN ribosomal de la subunidad 18S (ARNr-18S) (4308329, TaqMan®

VIC) y/o la proteína de unión a caja TATA (tbp) (Rn01455648_m1, TaqMan®VIC) (Tabla 6, anexo I).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: master mix (2X), 40 μ M sonda TaqMan, 10 μ M oligonucleótido anti sentido, 10 μ M oligonucleótido sentido, 1 μ L de ADNc (dilución 1:20) y H₂O-DEPC libre de nucleasas; se realizó por triplicado (Tabla 7 y Tabla 8, anexo I). A continuación, se cargaron por triplicado 11 μ L de la mezcla en tubos cónicos para la amplificación. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y un min 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 and Schmittgen, 2001)

5.13. Ensayos de inmunodetección en fase sólida (Western Blot)

Con el objetivo de evaluar la expresión de las proteínas SUR1 en nuestro modelo y de manera adicional la expresión de la proteína AQP4 se realizaron ensayos de Western blot. Se disecó tejido de la región donde el RSV mostró un mayor efecto protector, esto fue entre las coordenadas Bregma -2.16 a -4.20 mm (Paxinos y Watson, 2007). A continuación, se extrajeron proteínas totales utilizando 5 mg de tejido cortical. Al tejido se le agregaron 500 μ L de amortiguador para ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA) (150 mM NaCl, 1%, Nonidet-P40, 1% desoxicolato de sodio, 5 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH 7,5) al que se le agregaron inhibidores de proteasas y fosfatasas a una dilución 1:100. El tejido se disgregó mecánicamente utilizando un sonicador (VCX130, Sonic vibra cell) con una amplitud del 60% durante 20 s. En seguida, la suspensión de tejido se mezcló con vortex durante 5 min y a continuación se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min. El sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteínas utilizando el método del ácido bicinónico. Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga de Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -

mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) y se desnaturalizaron en baño María a 100 °C durante 5 min.

Las proteínas fueron separadas por peso molecular empleando electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida al 10% (SDS-PAGE). Se cargaron 60 µg de proteína por pozo. La electroforesis (cámara mini Bio-Rad) se realizó durante 1.5 h a 120 V en amortiguador de electroforesis (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS). Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (1620112, Bio-Rad) utilizando una cámara húmeda de electroforesis (Bio-Rad) durante 1 h a 400 mA en amortiguador de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol). Las membranas fueron bloqueadas por 1 h con leche baja en grasa al 5% diluida en TBS-T (10 mM Tris-base, 200 mM NaCl y 0.1% Tween 20, pH 7.5). Posteriormente, fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en leche al 5% en TBS-T utilizando la dilución especificada en la Tabla 9. La membrana fue lavada 4 veces por 10 min con amortiguador TBS-T y enseguida incubada durante toda la noche a 4 °C con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa según fue requerido (Tabla 10). La membrana fue lavada 4 veces por 10 min con amortiguador TBS-T y posteriormente se realizó la detección por quimioluminiscencia empleando 1 mL de la mezcla de luminol y sustrato para HRP (WBLUF0100, Milipore). La quimioluminiscencia se registró en un fotodetector (Fusion SOLO S, Vilber Lourmat).

Para normalizar la cantidad de proteína cargada en el gel, las membranas fueron incubadas dos veces con amortiguador de desnudado (200 mM glicina, 3,5 mM SDS y 1% Tween 20, pH 2.2) durante 5 min, seguido de bloqueo por 1 h. Finalmente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti α -Tubulina, proteína que fue utilizada como control de carga (ver tabla 9) siguiendo por el proceso descrito anteriormente.

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en Wester blot e inmunofluorescencia.

ANTICUERPO	CATALAGO	(WB)	FLUORESENCIA)
Anti-HIF-1 α - Anticuerpo monoclonal de ratón	SC-13515	-----	1:200
Anti-SP1 - Anticuerpo monoclonal de ratón	SC-4020	-----	1:200
Anti-NFB κ /p52 - Anticuerpo monoclonal de ratón	SC-7386	-----	1:200
Anti-GADPH - Anticuerpo monoclonal de ratón	SC-47724	1:2000	-----
Anti-GADPH - Anticuerpo policlonal de conejo	SC-25778	-----	1:600
Anti-SUR1 - Anticuerpo policlonal de cabra	SC-5789	1:500	1:200
Anti-SUR1 - Anticuerpo monoclonal de ratón	AB-134292	1:1000	1:200
Anti-Actina - Anticuerpo monoclonal de ratón	SC-8432	-----	1:600
Anti-AQP4 - Anticuerpo monoclonal de ratón	SC-32739	1:1000	1:200
Anti-AKT- Anticuerpo policlonal de conejo	9272	1:750	-----
Anti-p-AKT (ser-473) - Anticuerpo policlonal de conejo	40602	1:750	-----
Anti-Tubulina - Anticuerpo monoclonal de ratón	SIGMA, T9026	1:5000	-----
Anti- Ocludina - Anticuerpo policlonal de ratón	GTX114949	-----	1:200
Anti-GFAP -Anticuerpo monoclonal de raton	AB-190288	-----	1:200
Anti-GFAP -Anticuerpo monoclonal de conejo	DAKO-Z0334	-----	1:200

Tabla 10. Anticuerpos secundarios utilizados en Western blot e inmunofluorescencia

ANTICUERPO	CATALAGO	(WB)	(FLUORESENCIA)
Anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa	JIR-705-035-003	1:2500	----
Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa	JIR-115-035-062	1:5000	----
Anti-gG de conejo conjugado con peroxidasa	JIR-111-035-003	1:3000	----
Anti-IgG de cabra conjugado Alexa Fluor® 594-IgG	JIR-705-585-147	----	1:500
Anti-IgG de ratón conjugado con DyLight™ 488-IgG	JIR-715-485-150	----	1:500
Anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor® 594-IgG	JIR- 711-585-152	----	1:500
Anti-IgG de conejo conjugado con DyLight™ 488-IgG	AB-1500-73	----	1:500

5.14. Inmunofluorescencia en cortes cerebrales de tejido

Se ha demostrado en humanos y en modelos animales de isquemia cerebral que SUR1 aumenta su expresión en todos los miembros de la UNV en condiciones de isquemia (Simard et al., 2006; Mehta et al., 2015). Siendo las células del EnVC las células donde tiene especial importancia debido a que participa en la evolución del edema cerebral y daño a la BHE (Woo et al., 2012).

Por lo tanto, para evaluar la expresión de SUR1 específicamente en las células del EnVC que conforman la BHE en la corteza cerebral, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en cortes coronales de tejido. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg/kg de peso corporal; vía *i.p.*; Q7833215, PiSA) y se perfundieron por vía intracardiaca con 200 mL de PBS 0.1 M frío, seguido de 200 mL de paraformaldehído al 4% diluido en PBS 0.1 M frío para fijar el tejido. A continuación, se disecó el cerebro y se sumergió en paraformaldehído al 4% diluido en PBS 0.1 M durante 24 h; posteriormente el tejido se transfirió de manera secuencial a una solución con una concentración creciente (10, 20 y 30%) de sacarosa (S8501, Sigma- Aldrich) durante tres días a 4 °C. Del tejido fijado se obtuvieron secciones coronales (15 µm) utilizando un micrótopo por congelación (27, Sartorius-Werke). Las secciones de tejido se almacenaron a -20 °C en una solución crioprotectora (30% de etilenglicol, 20% de glicerol en PBS 0.1 M, pH 7,4) hasta su uso.

Las secciones se montaron en portaobjetos tratados con silano y se secaron por 24 h a 4 °C. Posteriormente, fueron bordeadas utilizando un marcador hidrofóbico (50310, Pan Pen) y se permeabilizaron con 100 µL de Tritón X-100 al 0.1% en PBS 0.1 M durante 30 min. En seguida se incubaron en solución de bloqueo (10% suero normal de burro, 1% albúmina sérica bovina (BSA) y 0.1% Tritón X-100 en PBS 0.1 M) durante 1 h. Y se lavaron 5 veces con solución de lavado (0.5% BSA en PBS 0.1 M). Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios anti-SUR1 y anti ocludina (marcador específico de EnVC). Adicionalmente, se evaluó la

expresión de AQP4 en astrocitos por lo que se utilizó un anticuerpo primario anti proteína ácida fibrilar (GFAP) como marcador específico de astrocitos (ver Tabla 9) para inmunofluorescencia diluidos en 100 μ L de solución de incubación (1% BSA, 0.1% Tritón X-100 diluido en PBS 0.1 M). Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4 °C durante toda la noche (ver Tabla 9). Después, las secciones se lavaron 5 veces con 100 μ L solución de lavado (0.5% BSA en PBS 0.1 M) seguido de 5 lavados (100 μ L de PBS 0.1 M) para retirar los anticuerpos primarios. En seguida, el tejido se incubó por 2 h con los anticuerpos secundarios conjugados según fue requerido en 100 μ L de solución de incubación (0.05% Tween-20 en PBS 0.1 M) (ver Tabla 10). Para eliminar el anticuerpo secundario el tejido se lavó 5 veces con 100 μ L de solución de lavado (0.5% BSA en PBS 0.1 M) seguido de 5 lavados con PBS 0.1 M. Luego, las secciones fueron incubadas durante 15 min con 1 mg/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) para detectar núcleos. Los cortes fueron montados con medio Mowiol (4.8% Mowiol 4.88, 0.1% p-fenilendiamina, 12% glicerol, 0.02% NaN₃, y 0,2 M Tris-HCl). Las imágenes se adquirieron en un microscopio invertido Olympus modelo 1X71 (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, EE. UU.) utilizando el objetivo seco fuerte 40X. Para el análisis se consideraron 4 campos por sección de tejido analizándose 2 secciones por cerebro en 3 experimentos diferentes. El análisis de imagen se realizó utilizando el software Image J 1.8.0 (Rasband, 1997). El análisis de co-localización se realizó de la siguiente manera: 1) los canales se separaron con la función dividir canales; 2) la localización de los canales de interés verde (SUR1 o AQP4) y rojo (Ocludina o GFAP) se analizó utilizando la función Analyze > co-localization > colo-calization threshold. La co-localización fue reportada como % de co-localización SUR1/occludina o AQP4/GFAP.

5.15. Ensayos de electrofisiología en células enteras de cortes corticales de tejido

Para evaluar el efecto del RSV sobre la actividad de SUR1, evaluamos la conductancia total en neuronas corticales localizadas entre las coordenadas Bregma -2.16 a -4.20 mm (Paxinos y Watson, 2007). Los experimentos se

realizaron como se describió anteriormente (Hernández-Abrego et al., 2018). Se obtuvieron rebanadas cerebrales de ratas Wistar (peso 280 - 320 g). Las ratas fueron decapitadas, el cerebro rápidamente removido (~ 3 min) y colocado en una solución de preservación (250 mM sacarosa, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucosa, pH 7,4) fría (~ 4 °C).

Los cortes coronales (350 µm de espesor) fueron realizados en ~ 5 min empleando un vibratomo (VT 1000, Leica) y sumergidas inmediatamente en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,23 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucosa, pH 7,4). Los cortes se estabilizaron en esta solución durante al menos 1 h antes del registro eléctrico.

Un corte se transfirió a una cámara y se perfundió durante el experimento con ACSF a una velocidad de ~2 mL/min. Las neuronas corticales se visualizaron usando un microscopio de contraste por interferencia diferencial infrarroja (BX51W1, Olympus) dotado de objetivo 80x de inmersión en agua. Los registros se realizaron utilizando el método de fijación de voltaje "*Voltage-Clamp*" en configuración de células enteras (Hamill et al., 1981). Para lo anterior se utilizó una PC-ONE (Dagan Corporation, MN, EE.UU.) con un sistema de adquisición Digidata 1440A (Molecular Devices, CA, USA). Así mismo, se utilizaron pipetas de "*Patch Clamp*" con una resistencia de 3-7 MΩ llenadas con solución interna (140 mM KCl, 5 mM NaCl, 1 MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM EGTA, pH 7,4). Inmediatamente después de entrar en contacto con una neurona cortical se inició el registro en la configuración de células enteras (1-2 s), potencial de -70 mV y pulso despolarizante (20 mV, 30 s). Este pulso temprano permitió obtener la corriente de iones en condiciones celulares iniciales (II), justo antes de que la solución de la pipeta entrará en equilibrio con la solución intracelular, lo cual toma aproximadamente 4-60 s (Pusch y Neher, 1988). El pulso despolarizado se aplicó continuamente para monitorear los cambios en la corriente de iones. Bajo las condiciones experimentales correspondientes la corriente de iones en respuesta al pulso de 2 mV se evaluó al principio (1-2 s, II) y al final del experimento (3 min, if) como la relación: if/II; Suponiendo que en este último momento la neurona estaba en las

condiciones experimentales elegidas. El software pClamp 10 se utilizó para medir los cambios de corriente de iones. Origin 7 (Microcal software, MA, USA) fue utilizado para analizar y graficar los resultados. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio B12 de comunicación Celular y Neurotransmisión del Instituto de Neurobiología de la UNAM con la asesoría del Dr. Jesús García Colunga.

5.16. Cultivos celulares

Con el objetivo de entender el mecanismo de acción del RSV en la regulación de la expresión de SUR1 en la BHE, utilizamos la línea de células de EnVC humano (HBEC-5i, ATCC® No. CRL-3245™). Las células HBEC-5i se originaron de pequeños fragmentos de corteza cerebral humana obtenidos de pacientes que fallecieron por diversas causas careciendo de anomalías patológicas cerebrales. Las células HBEC-5i retienen muchas de las características de las células endoteliales: expresan patrones estables de marcadores de células del EnVC como la VE-cadherina, el factor von Willebrand VIII y la ocludina periférica; además, exhiben estructuras características de células que expresan proteínas de unión estrecha. En resumen, las células HBEC-5i son células inmortalizadas que pueden utilizarse para estudiar la respuesta de las células que integran la BHE.

Las células HBEC-5i fueron mantenidas a 37 °C, 5% de CO₂ y 18% de O₂ en una incubadora (INCO108med, Memmert). Se usó gelatina al 0.5% (S-006-100, Gibco) diluida en H₂O bidestilada como sustrato y medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco's (DMEM/F12; D1152-1L, Sigma-Aldrich) de alta glucosa enriquecido con el suplemento de crecimiento microvascular (MVGS; S-005-25, GIBCO) y suero fetal bovino (SFB; S1650-500, Biowest) para obtener concentraciones finales de: 10 % v/v SFB, 1 mg/mL hidrocortisona, 3 ng/mL factor de crecimiento de fibroblastos humano, 10 mg/mL heparina, 1 ng/mL factor de crecimiento epidérmico humano y 0,08 mM AMP cíclico.

5.17. Modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD)

Para evaluar el efecto de la isquemia cerebral en las células endoteliales utilizamos un modelo in vitro de isquemia cerebral inducido por OGD. Para inducir el modelo se reemplazó el medio de cultivo por una solución fisiológica KHB sin glucosa (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 4.2 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.6). En seguida los cultivos fueron transferidos a una incubadora (INCO108med, Memmert) equipada con controlador de O₂, CO₂ y N₂ manteniendo condiciones de 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ y 37 °C durante 2 h. Después de 2 h de OGD las células fueron retiradas de la condición de hipoxia y la solución fisiológica fue reemplazada nuevamente por medio de cultivo fresco y las células incubadas en condiciones de 18% de O₂, 5% de CO₂ y 37 °C (periodo denominado de recuperación). El grupo control fue sometido a cambio de medio (control de manipulación) en condiciones de 18% de O₂, 5% de CO₂ y 37 °C.

5.18. Grupos experimentales

Para todos los experimentos, los cultivos celulares fueron divididos en los siguientes grupos: 1) CT, células control; 2) +VH, cultivo celular sometido a OGD con administración de vehículo; y 3) +RSV, +NAC o +CUR, cultivos celulares sometidos a OGD y administrados con RSV, NAC, o CUR; 4) +MIT A, +NFκBin, o +AKTin, cultivos celulares sometidos a OGD y la administración de mitramicina A (inhibidor de SP1), el inhibidor de NFκB o inhibidor de AKT (Tabla 11).

Tabla 11. Antioxidantes e inhibidores utilizados en cultivo celular		
ANTIOXIDANTES E INHIBIDORES	CATALAGO	MARCA
RESVERATROL	R5010	SIGMA
CURCUMINA	C1386	SIGMA
N-Acetyl- L- Cystein	A7250	SIGMA
MITRAMICINA A (SP1 INHIBITOR)	M6891	SIGMA
NFκB ACTIVATION INHIBITOR IV	481412	CALBIOCHEM
AKT- INHIBITOR	A6730	SIGMA

5.19. Tratamientos en cultivo celular

Se pesaron 0.9 mg de RSV el cual fue diluido en 250 μ L de vehículo (DMSO, D2630, Sigma-Aldrich), 250 μ L EtHO (E7020, Sigma-Aldrich) o 500 μ L KHB sin glucosa para obtener un stock de 4 mM. En seguida, se adicionaron 5 μ L del stock por cada 4 mL de medio o KHB para obtener una concentración final de 5 μ M (a excepción de la dosis respuesta). Los antioxidantes e inhibidores fueron administrados en concentraciones equimolares y se mantuvieron durante y después de la OGD (Tabla 11).

5.20. Evaluación del edema celular en las células HBEC-5i

La muerte celular por necrosis presenta cambios morfológicos importantes, caracterizados por hinchazón (aumento de volumen celular) y la pérdida de estructuras celulares (Loh et al., 2018). Para evaluar el efecto de la OGD en el volumen celular, las células HBEC-5i se sembraron en placas de 60 mm de diámetro (densidad de 800,000 células/placa) previamente tratadas con gelatina al 0.5%. Las

células se sometieron a OGD por 2 h y diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h). Las imágenes se registraron digitalmente en un microscopio invertido (MBL 3200, Kruss Optronix) utilizando un filtro de contraste de fases y el objetivo 10x. Se contó el número células hinchadas (con aumento de volumen celular). Para el análisis se consideraron 4 campos por cultivo en 3 experimentos diferentes y se calculó el porcentaje de edema celular utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Edema celular (\%)} = \frac{(n \text{ células hinchadas por campo})(100)}{(n \text{ total de células por campo})}$$

5.21. Ensayo de viabilidad con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,2-difeniltetrazolio (MTT) en células HBEC-5i

El ensayo MTT implica la conversión del colorante amarillo hidrosoluble MTT en una sal de formazán color púrpura insoluble en agua por la acción de las reductasas (principalmente mitocondriales) lo que permite detectar el daño y la viabilidad celular (Loh et al., 2018). Las células HBEC-5i se sembraron en placas de 96 pozos (densidad de 30,000 células/pozo) previamente tratadas con gelatina al 0.5%. Las células se sometieron a 2 h de OGD y 24 h de recuperación, después se adicionaron al medio 10 μ L del stock de MTT (5 mg/mL) diluida en amortiguador de fosfatos (10 mM KH_2PO_4) por pozo. Las células se incubaron por 1.5 h en condiciones de 18% de O_2 , 5% de CO_2 y 37 $^\circ\text{C}$. En seguida se retiró cuidadosamente el medio y se adicionaron 150 μ L de DMSO (67685, Fermont) para disolver los cristales de MTT. En seguida la placa se sometió a agitación durante 15 min. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 570 nm y 690 nm en un lector de placas. Esta última es la longitud de referencia para restar el fondo, por lo tanto los valores de absorbancia se expresaron mediante las diferencias de 570-690 nm.

5.22. Ensayo de liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) en células HBEC-5i

Se ha demostrado que la muerte celular por necrosis representa un mecanismo importante de muerte en la isquemia cerebral que ocurre en muchos tipos celulares del SNC, incluyendo a las células del EnVC. Así mismo, la LDH, es una enzima citoplasmática que se libera rápidamente hacia el sobrenadante del cultivo celular cuando la membrana plasmática se daña debido al aumento descontrolado del volumen celular, una característica importante de las células que sufren muerte celular por necrosis (Kumar et al., 2018).

Con el objetivo de evaluar la muerte celular por necrosis se evaluó la actividad de la LDH en el medio de cultivo. Las células HBEC-5i fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro (800,000 células/placa) previamente tratadas con gelatina al 0.5% y sometidas a 2 h de OGD y 24 h de recuperación. Después se recuperaron 50 μ L de medio de cultivo el cual se mezcló con 150 μ L de la solución de reacción (320 μ L de piruvato 23 mM y 160 μ L de β -NADH 14 mM diluidos en 9.25 mL de amortiguador de fosfatos KH₂PO₄ 0.01 M). La actividad de LDH se evaluó en placas de 96 pozos mediante una cinética enzimática. La absorbencia se midió a 340 nm (lecturas cada min durante 10 min, 37 °C) en un lector Sinergy™ HT. Se estimó el cambio en la absorbencia cada minuto (Δ Abs/min) y se realizó una regresión lineal para obtener la pendiente (m). Finalmente, se aplicó la siguiente fórmula para obtener la actividad enzimática:

Actividad enzimática:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(m \Delta \text{Abs}/\text{min})}{(\epsilon)(l)} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6$$

Donde (m) es de la pendiente, (ϵ) el coeficiente de extinción enzimática a 340 nm (6.23 x 10³ L/mol/cm), (L) la trayectoria óptica de la cubeta (1 cm), (V) es el volumen final de la prueba (200 μ L) y (v) es el volumen de la muestra (50 μ L). Los resultados fueron representados en unidades por litro (U/L).

5.23. Ensayos de determinación de ERO en células HBEC-5i

En isquemia cerebral las ERO aumentan considerablemente, pero es durante los primeros minutos de la reperfusión donde se generan grandes cantidades (Peters et al., 1998), impidiendo la activación de vías de señalización. Por ello la regulación de su concentración es esencial.

La generación de ERO se evalúa usando la técnica de oxidación de la dihidroetidina (DHE), la cual una vez internalizada es oxidada por las ERO a etidio el cual se intercala en el ADN mitocondrial y nuclear emitiendo una señal fluorescente que es proporcional al estado REDOX celular.

Para el ensayo, las células HBEC-5i fueron sembradas sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro previamente tratados con gelatina al 0.5% como sustrato a una densidad de 10,000 células/cubre. A continuación, las células fueron incubadas con DHE (SIGMA D7008) 20 μ M en solución KHB durante y después de la OGD. Después de la OGD y la recuperación (0, 15, 30, 60, 120 y 240 min) se retiró la solución y las células fueron fijadas con metanol (323415, Sigma-Adrich) frío \sim 20 °C durante 5 min. Posteriormente, el metanol fue retirado y las células mantenidas en PBS 0.1 M frío hasta su uso. La fluorescencia emitida por la DHE oxidada se detectó utilizando un filtro de excitación 518/emisión 606 nm en un microscopio invertido (Olympus 1X71, Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) objetivo 20X y de inmersión 100X y 20X. Además, se detectó la expresión de actina siguiendo el protocolo para inmunofluorescencia en cultivo celular (ver abajo). Para el análisis, se consideraron 4 campos (20X) por cubreobjetos en 3 experimentos diferentes. La intensidad de señal se calculó con el software Image J de la siguiente manera: 1) los canales se separaron con la función dividir canales; 2) el área de interés fue seleccionada con la función de gestor de ROI y la media de píxeles de fluorescencia total del campo fue evaluada.

5.24. Ensayos de unión al ADN en células HBEC-5i

4.24.1 Obtención de extractos nucleares

Los mecanismos transcripcionales que participan en la expresión de SUR1 parecen ser específicos de las células del EnVC (Woo et al., 2012). Por lo tanto, se realizaron ensayos de unión al ADN (EMSA) en cultivos de células de EnVC sometidas OGD. Se siguió el protocolo utilizado en el modelo in vivo con las siguientes modificaciones:

Primero se extrajeron proteínas nucleares de acuerdo al método de (Schreiber et al., 1989). Para la extracción, las células HBEC-5i se sembraron en placas de 60 mm de diámetro previamente tratadas con gelatina al 0.5% a una densidad de 1,500,000 células/ placa. En seguida, se sometieron a OGD por 2 h y diferentes tiempos de recuperación. Después, las células se cosecharon con 500 μ L de tripsina 2.5 X (0.25% Tripsina, 0.53 mM EDTA) en un tubo cónico de 1.5 mL. A continuación, la suspensión celular se centrifugó a 125 x g durante 5 min, después se retiró la tripsina y se adicionaron 500 μ L de KHB frío y fueron nuevamente centrifugadas a 125 x g durante 5 min. En seguida, el KHB fue retirado y el botón celular fue lisado utilizando 50 μ L del amortiguador "A" complementado con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (dilución 1:100). La mezcla se mantuvo en hielo durante 15 min y a continuación se adicionó Nonidet P-40 (5%). La mezcla se centrifugó a 12,000 g durante 30 seg en una centrifuga (Eppendorf, Modelo 5417R). Inmediatamente, se eliminó el sobrenadante (proteínas del citoplasma) y a la pastilla (núcleos) se le añadieron 40 μ L de amortiguador "B" más inhibidores de proteasas y fosfatasas. A continuación, se continuo con el protocolo indicado para la extracción de proteínas nucleares en tejido cerebral.

5.24.2. Ensayos EMSA

Los oligonucleótidos con la secuencia de los sitios de unión a los factores transcripcionales SP1, HIF-1 y NF κ B (Tabla 2, anexo I) fueron marcados con biotina en los extremos OH-3' utilizando el Kit ADN 3' End Biotinylation (89818, Thermo

siccientific) siguiendo las indicaciones de marcaje previamente a detalle en el modelo vivo. Así mismo, la detección de actividad de unión al ADN de estos factores se realizó siguiendo instrucciones del fabricante y el protocolo descrito previamente para el modelo in vivo.

5.25. Inmunofluorescencia en células HBEC-5i

La técnica de inmunofluorescencia nos permite visualizar la localización de proteínas sin afectar la estructura celular. Por lo tanto, se utilizó para identificar la localización de los factores transcripcionales SP1, HIF-1 y NF κ B en el citosol y en el núcleo.

Las células HBEC-5i fueron sembradas sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro previamente tratados con gelatina al 0.5% como sustrato, a una densidad de 10,000 células/cubre. Después del estímulo de OGD y recuperación requerido, las células fueron fijadas con metanol (323415, Sigma-Aldrich) frío ~ -20 °C durante 5 min. En seguida, el metanol fue retirado y las células se mantuvieron en PBS frío hasta su uso. A continuación, las células se permeabilizaron y se incubaron en solución de bloqueo. Después, las células se incubaron con anticuerpos primarios contra SP1, HIF-1 α , NF κ B o SUR1 en combinación con un anticuerpo primario contra gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) el cual fue utilizado como marcador celular citosólico (ver Tabla 9) diluidos en 100 μ L de solución de incubación. Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4 °C durante toda la noche (ver Tabla 9). Después, las células se lavaron para retirar los anticuerpos primarios y se continuo con la incubación del anticuerpo secundario por 2 h (ver Tabla 10). Así mismo, las células fueron incubadas durante 15 min con 1 mg/mL de DAPI para detectar núcleos. En todo momento se siguió el protocolo para inmunofluorescencia indicado a detalle en el modelo *in vivo*. Las imágenes se adquirieron con un objetivo seco fuerte 40X en un microscopio invertido Olympus modelo 1X71 (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, EE. UU.). Para el análisis, se consideraron 4 campos (40X) por cubre objetos en 3 experimentos diferentes.

Para evaluar la intensidad de señal se utilizó el software Image J (Rasband, 1997) de la siguiente manera: 1) los canales se separaron con la función dividir canales; 2) el área de interés fue seleccionada con la función de gestor de ROI y la media de píxeles de fluorescencia total del campo fue evaluada y reportada en unidades arbitrarias (A.U). Así mismo, para evaluar la localización nuclear el análisis se realizó de la siguiente manera: 1) los canales se separaron con la función dividir canales; 2) la localización de los canales de interés azul (DAPI) y rojo (SP1, HIF-1 α o NF κ B) se analizó utilizando la función Analyze > colocalization > colocalization threshold. La colocalización fue reportada como % de colocalización Factor de transcripción/DAPI.

5.26. Evaluación de la expresión de ARNm en células HBEC-5i

Con el objetivo de evaluar los niveles de expresión del ARNm del gen *Abcc8* en las células del EnVC se realizó la extracción de ARN total. Para lo cual, las células HBEC-5i se sembraron en placas de 60 mm de diámetro previamente tratadas con gelatina al 0.5% a una densidad de 1,500,000 células/placa. Después, las células sometieron a OGD por 2 h y diferentes tiempos de recuperación.

Para extraer el ARN el medio de cultivo fue remplazado por 500 μ L de TRIzol® Reagent y la solución fue recolectada en tubos cónicos de 1.5 mL. A partir de este punto, se continuó con el protocolo indicado en el modelo *in vivo* para la extracción y síntesis de ADNc. Se utilizaron las sondas dirigidas los exones 1-2 (Hs01093751_m1, TaqMan® FAM) y a los exones 20-21 (Hs01093752_m1, TaqMan® FAM) del gen *Abcc8*. Como control endógeno se determinó la expresión del ARN ribosomal de la subunidad 18S (ARNr-18S; 4308329, TaqMan® VIC) (Tabla 6). La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación utilizadas se realizaron siguiendo el protocolo indicado en el modelo *in vivo*. El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

5.27. Ensayos de Western blot en células HBEC-5i

Con el objetivo de evaluar la participación de AKT en la vía de expresión de SUR1 en nuestro modelo, así como el efecto del RSV esta vía de señalización se realizaron ensayos de Western blot. Las células HBEC-5i se sembraron en placas de 60 mm de diámetro previamente tratadas con gelatina al 0.5% a una densidad de 1,500,000 células/placa. En seguida, las células se sometieron a OGD por 2 h y diferentes tiempos de recuperación. A continuación, se cosecharon con 500 μ L de tripsina 2.5X (0.25% Tripsina, 0.53 mM EDTA) en un tubo cónico de 1.5 mL. A continuación, las células se centrifugaron a 125 x g durante 5 min, después se retiró la tripsina y se adicionaron 500 μ L de KHB frío y fueron nuevamente centrifugadas a 125 x g durante 5 min. En seguida, el KHB fue retirado y el botón celular fue lisado utilizando 50 μ L del amortiguador RIPA conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (1:100). En seguida, la suspensión celular se mezcló y se centrifugó a 12,000 xg. El sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de ácido bicinónico. Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga de Laemmli y se desnaturalizaron en baño María a 100 °C durante 5 min.

Se utilizaron anticuerpos primarios p-AKT, AKT o SUR1 (ver Tabla 9) y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (ver tabla 10). Para normalizar la cantidad de proteína cargada en el gel, las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti α -tubulina o anti gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (ver tabla 9), siguiendo en todo momento el protocolo indicado a detalle para Western blot en el modelo *in vivo*.

5.28. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0c; utilizando un análisis de varianza ANOVA de una vía, Tukey para comparación de medias de más de 3 grupos; tomándose como resultado significativo una $p < 0.05\%$. El tamaño de muestra varió en cada experimento.

VI. RESULTADOS

6.1. El RSV reduce el daño a la BHE provocado por isquemia cerebral en ratas

Para evaluar el efecto del RSV sobre el daño inducido por la isquemia cerebral, examinamos las propiedades de permeabilidad de la BHE. Primero evaluamos la extravasación de azul de Evans, un indicador de la alteración de la integridad de la BHE. En ratas a las cuales se indujo isquemia por 2 h y fueron sacrificadas 24 h después de iniciada la reperusión, encontramos que la isquemia aumenta la extravasación del azul de Evans exclusivamente en el lado ipsilateral de la lesión (Figura 5 A - B). El porcentaje de extravasación azul de Evans para el grupo +VH fue de $14.68 \pm 1.07\%$ siendo este resultado estadísticamente significativo respecto al grupo CT ($0.2 \pm 0.0\%$) (CT vs +VH; $***p < 0.001$). Estos hallazgos demostraron que la isquemia afecta la integridad de la BHE. En contraste, cuando se administró el RSV se redujo la extravasación a $6.54 \pm 1.59\%$ siendo este resultado estadísticamente significativo (+VH vs +RSV; $**p < 0.01$) (Figura 5 C).

6.2. El RSV reduce el contenido de agua cerebral en ratas sometidas a isquemia cerebral.

Con la finalidad de evaluar el efecto del RSV en la formación del edema durante la isquemia cerebral, se calculó el cambio en el contenido de agua cerebral en nuestro modelo. Encontramos que 2 h de MCAO seguido de 24 h de reperusión induce un aumento en el contenido de agua cerebral respecto al grupo control siendo esta diferencia estadísticamente significativa (CT, $0.16 \pm 0.10\%$ vs +VH, $4.1 \pm 0.26\%$; $***p < 0.001$). Así mismo, observamos que en las ratas con isquemia la administración de RSV redujo el porcentaje de agua cerebral en comparación con el grupo al que se le administró el VH (+VH, $4.1 \pm 0.26\%$ vs +RSV, $2.9 \pm 0.32\%$; $**p < 0.01$) (Figura 6).

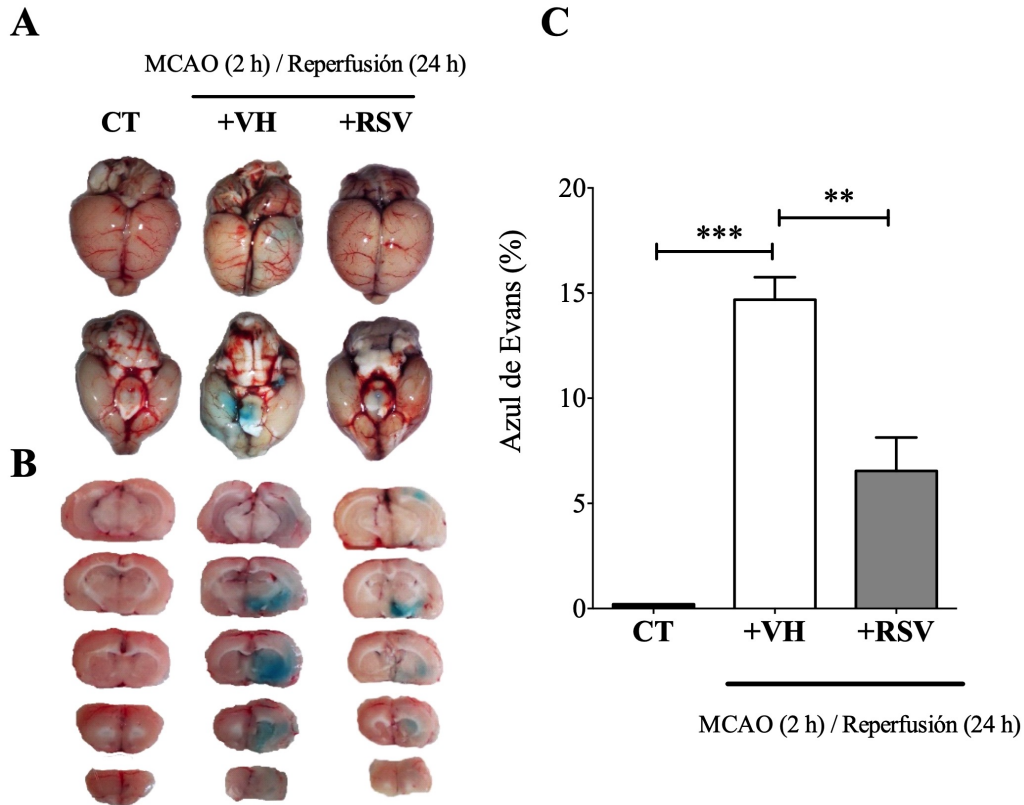


Figura 5. Efecto del RSV en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i.v.*) al inicio de la reperusión. **A.** Los cambios en la permeabilidad de la BHE se visualizaron midiendo la extravasación de azul de Evans en el cerebro total y **B.** Cortes coronales. **C.** La extravasación (%) se calculó midiendo el área azul en el hemisferio ipsilateral (n= 7). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, **p <0.01; ***p<0.001.

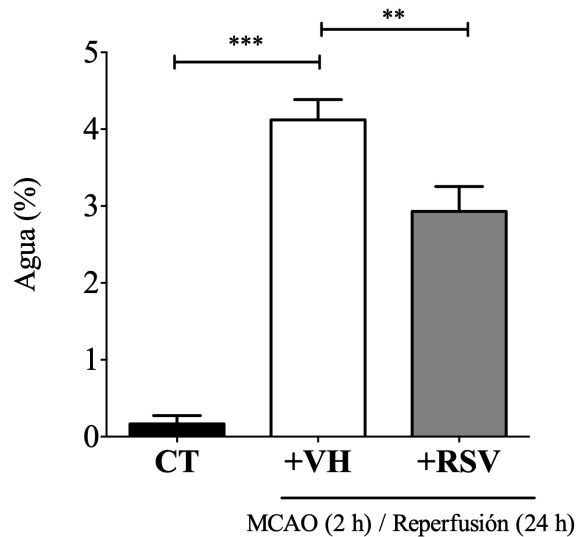


Figura 6. Efecto del resveratrol sobre el contenido de agua cerebral. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión. El contenido de agua cerebral se calculó como una proporción porcentual entre el peso del tejido cerebral húmedo y seco (n= 16). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, **p <0.01; ***p<0.001.

6.3 El RSV aumenta la supervivencia en ratas sometidas a isquemia cerebral

La formación del edema está asociada con el aumento de la mortalidad de los pacientes que sufren isquemia cerebral (Desilles et al., 2013). Por lo tanto, evaluamos si el tratamiento con RSV reduce la formación del edema y consecuentemente disminuye la mortalidad en los animales en los cuales se indujo isquemia cerebral. Observamos que 2 h de MCAO seguido de 24 h de reperusión disminuye significativamente el porcentaje de supervivencia respecto al grupo control (CT, 100% vs +VH, 61.9 %). Mientras que el tratamiento con RSV aumentó notoriamente la supervivencia a un 90.4, el análisis estadístico de estos datos empleando una tabla de contingencia arrojó un valor de chi-cuadrada igual a 12.36, con una $p < 0.0021$ siendo este resultado estadísticamente significativo, mostrando

que existe una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento con RSV y el número de animales vivos. (Figura 7).

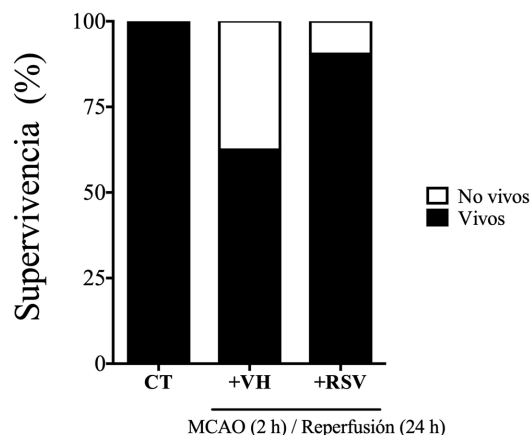


Figura 7. Efecto del RSV sobre la supervivencia. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión (n= 21). Los valores se expresaron como media, chi-cuadrada $p < 0.0021$.

6.4 El RSV disminuye el volumen de infarto en ratas sometidas a isquemia cerebral

Con el objetivo de evaluar el efecto del RSV en el daño tisular inducido por la isquemia se midió el volumen del infarto cerebral. Empleando la tinción con TTC se identificaron las regiones con células metabólicamente activas (zona roja) de las que carecen de actividad (zona blanca) (Figura 8 A). Los datos mostraron que la isquemia induce una lesión prominente respecto al grupo control (CT, 1.0% vs +VH, 28.08 ± 2.8 ; $***p < 0.001$). Por otro lado, el tratamiento con RSV ($20.7 \pm 1.6\%$) redujo significativamente el volumen del infarto (+VH vs +RSV; $*p < 0,05$) (Figura 8 B). Es

importante destacar que la protección otorgada por el RSV fue mayor en los cortes coronales posteriores. Por lo tanto, la evaluación del volumen del infarto también se midió de manera exclusiva en esta región cerebral (aproximadamente Bregman -2.16 a -4.20 mm). Los valores obtenidos fueron estadísticamente diferentes (+VH, $49.88 \pm 2.1\%$ vs RSV, $29.37 \pm 4.6\%$; $*p < 0.05$) (Figura 8 C), por lo tanto, esta región fue utilizada para realizar los análisis posteriores.

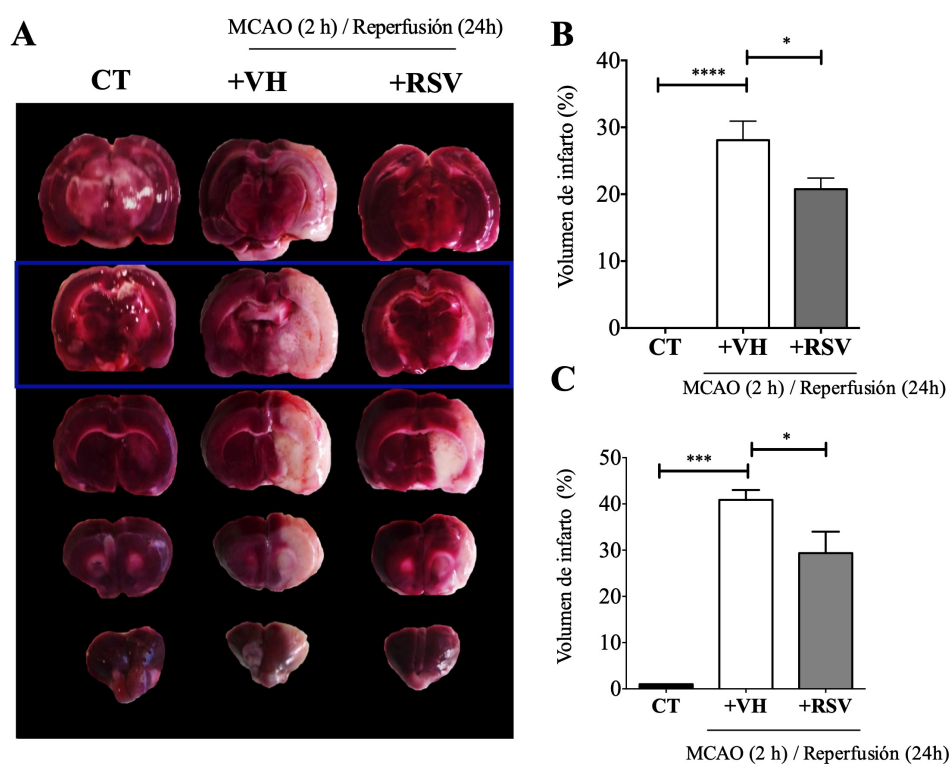


Figura 8. Efecto del RSV en el volumen de infarto. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión. **A.** Tinción con 2, 3, 5-trifenil tetrazolio cloruro (TTC) para identificar la zona de infarto. Cortes coronales de 2.5 mm de grosor. Región utilizada para análisis posteriores, localizada entre Bregma -2.16 a -4.20 mm. **B.** Volumen de infarto en

cerebro total (n=6). **C.** Volumen de infarto en la región caudal (Bregman -2.16 a -4.20 mm) (n=6). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05; ***p<0.001.

6.5 El RSV mejora el estado neurológico en ratas sometidas a isquemia cerebral

Para determinar el estado neurológico de los animales en los cuales se indujo isquemia por 2 h se realizó la prueba conductual del cilindro 24 h después de la reperusión (Garcia et al., 1995). Al determinar el número de contactos que el animal realiza con las patas delanteras en un periodo de 5 min, esta prueba evalúa la asimetría locomotora. Las ratas normales se levantaron y tocaron mayoritariamente con ambas patas las paredes del cilindro (Figura 9 A), mostrando una desviación muy baja en el uso de las extremidades delanteras (CT = $2.6 \pm 6.2\%$) (Figura 9 D). Por otro lado, en las ratas con isquemia cerebral, el número de contactos realizados con la pata derecha (contralateral a la lesión) disminuyó mientras que tanto el número de contactos con la pata izquierda como los contactos con ambas patas disminuyeron (Figura 9 B). Por lo tanto, este grupo mostró una desviación elevada en el uso de las extremidades (+VH = $52.2 \pm 10.0\%$) (CT vs +VH; ***p<0,001) (Figura 9 D). La administración del RSV mejoró notablemente el estado neurológico de los animales, los cuales se apoyaron con ambas patas a pesar de mostrar una deficiencia motora en la pata derecha (Figura 9 C). La desviación de uso de las extremidades entre el grupo no tratado y el tratado con RSV fue estadísticamente diferente (+VH, $52.2 \pm 10.0\%$ vs +RSV, $3.4 \pm 7.7\%$; **p<0,01) (Figura 9 D).

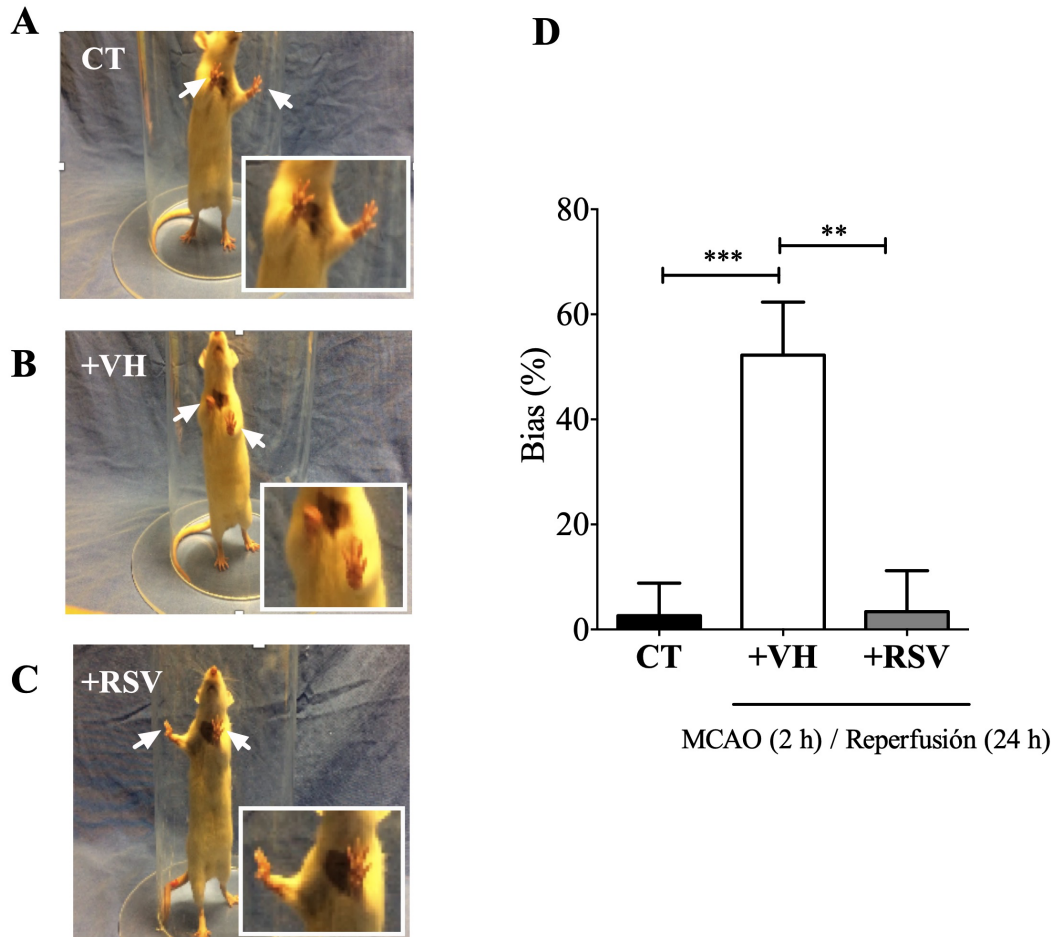


Figura 9. Efecto del RSV en el estado neurológico de ratas sometidas a isquemia cerebral. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión. **A-C** El estado neurológico se evaluó utilizando la prueba del cilindro, los animales sanos tocan la pared del cilindro con ambas extremidades extendidas, mientras que los animales con déficit neurológico mantienen la extremidad contralateral a la lesión retraída. **D.** El análisis de la asimetría de uso de las extremidades delanteras se determinó mediante el número de contactos que los animales realizan con la pata ipsi y contra lateral a la lesión (n= 8). Los valores se expresaron como media \pm DE. ANOVA, Tukey, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

6.6 El RSV disminuye la actividad de unión del factor transcripcional SP1 en ratas sometidas a isquemia cerebral

El factor de transcripción SP1 tiene un papel destacado en la inducción de la transcripción de los genes *Abcc8* y *Aqp4* que codifican para las proteínas SUR1 y AQP4, ambas involucradas en la formación de edema (Ashfield y Ashcroft, 1998; Hernández-Sánchez et al., 1999; Woo et al., 2012; Stokum et al., 2018) (Figura 10).

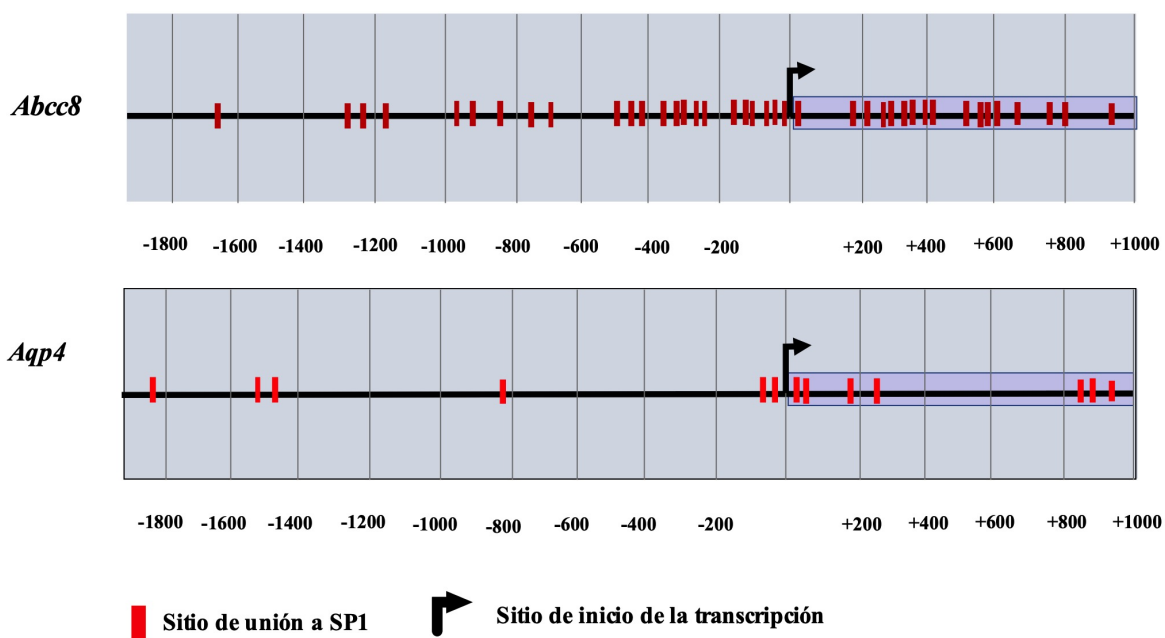


Figura 10. Análisis de los sitios de unión a SP1 en el promotor *Abcc8* y *Aqp4*. Análisis de predicción de sitios de unión a la proteína específica 1 (SP1) en el promotor de los genes *Abcc8* (SUR1) y *Aqp4* (AQP4) realizado con el programa “*Expasy Bioinformatics Resource*”, para el análisis se consideraron 3000 pb (-2000 a +1000) a partir del codón de inicio de la transcripción (ATG).

Evaluamos la actividad de unión al ADN del factor transcripcional SP1, la cual está influenciada por el estado REDOX celular. Primero, con el objetivo de establecer el tiempo en que el factor de transcripcional SP1 tiene su máxima actividad de unión, realizamos un curso temporal de activación. Se utilizaron extractos nucleares obtenidos de ratas en las cuales se indujo isquemia por 2 h

seguida de diferentes tiempos de reperfusión. La actividad de unión del factor SP1 en ratas con isquemia se encontró aumentada respecto al grupo control (CT, 1.0 ± 0.1 vs +VH, 1.9 ± 0.2). La máxima actividad de unión de SP1 se alcanzó a los 15 min de reperfusión (+VH15, 2.2 ± 0.27 ; ** $p < 0.01$). La actividad disminuyó gradualmente, regresando a la actividad basal después de 120 min de reperfusión (VH120 = 1.3 ± 0.02) (Figura 11 B).

Por lo tanto, decidimos evaluar el efecto del RSV en la actividad de unión de SP1 a los 15 min después de la reperfusión. Observamos que la actividad de unión de SP1 en los extractos nucleares obtenidos de ratas sometidas al tratamiento se mantiene en niveles basales (+RSV = 1.0 ± 0.13) (+VH vs +RSV; * $p < 0.05$) (Figura 11 C). Estos datos mostraron que el RSV tiene la capacidad regular la actividad de unión del factor transcripcional, la cual es inducida por la isquemia y la reperfusión; en consecuencia, el RSV podría alterar la expresión de genes dependientes de la actividad de este factor transcripcional.

6.7 El RSV disminuye la expresión del gen *Abcc8* (SUR1) en ratas sometidas a isquemia cerebral

Mediante RT-qPCR determinamos el nivel de expresión del ARNm de SUR1 en ratas en las cuales se indujo isquemia por 2 h seguida de diferentes tiempos de reperfusión (0.5, 3, 8 y 24 h). Encontramos que 2 h de isquemia incrementa los niveles de ARNm a los 30 min de reperfusión (+VH0.5 = 10.8 ± 4.2 veces) (CT vs +VH0.5; *** $p < 0.001$) (Figura 12 A). Este aumento coincide con en la actividad de unión de SP1 (Figura 11 C). La expresión basal del ARNm se observó después de 3 h (0.58 ± 0.14) y 8 h (0.47 ± 0.17) manteniéndose sin cambios significativos hasta las 24 h de reperfusión (0.65 ± 0.17) (Figura 12 A). Elegimos 0.5 h para evaluar el efecto del RSV, en donde encontramos que disminuye a nivel basal la expresión del gen *Abcc8* (+RSV = 1.64 ± 0.30) (+VH vs +RSV; *** $p < 0.001$) (Figura 12 B)

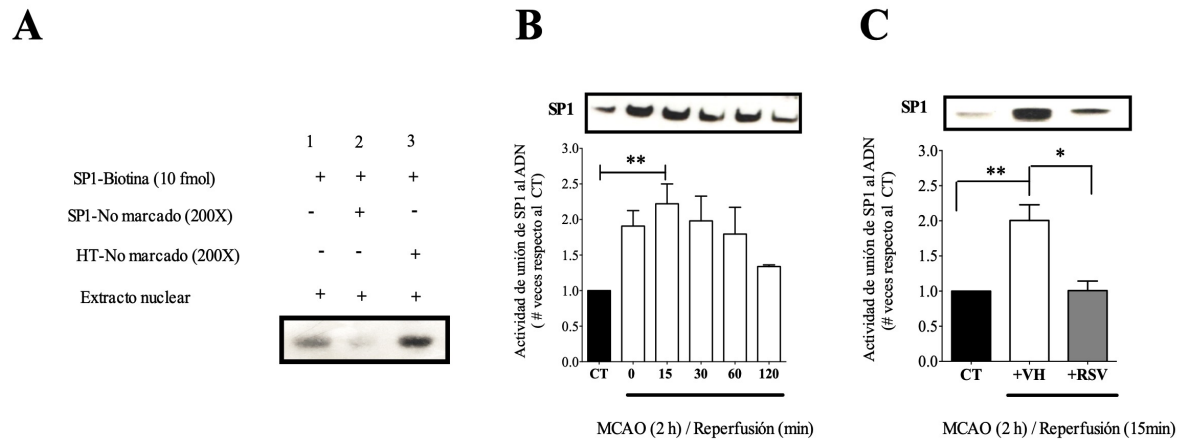


Figura 11. Efecto del RSV en la actividad de unión del factor transcripcional SP1. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de diferentes tiempos de reperusión (0, 15, 30, 60 y 120 min) mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión. La actividad de unión de SP1 al ADN se evaluó mediante ensayos EMSA para lo cual se extrajeron proteínas nucleares de la corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm). **A.** Ensayos de competencia. 1, Unión específica al oligonucleótido marcado con biotina; 2, Competencia específica debido a la presencia de un exceso (200X) de oligonucleótidos con sitios SP1 no marcados con biotina; 3, Ausencia de competencia por que el oligonucleótido no marcado y agregado en exceso (200X) tiene un sitio heterólogo a SP1 (HT). **B.** Curso temporal de unión de SP1 a su sitio consenso (n= 4). **C.** Efecto del RSV en la actividad de unión del factor SP1 a los 15 min de reperusión (n= 4). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

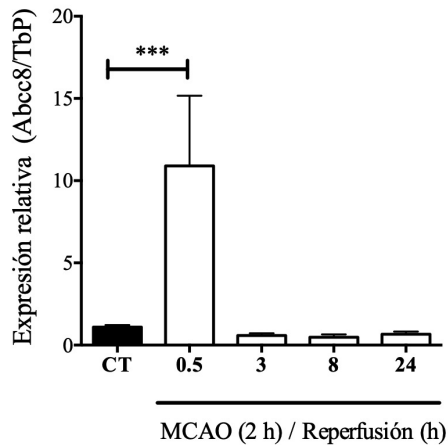
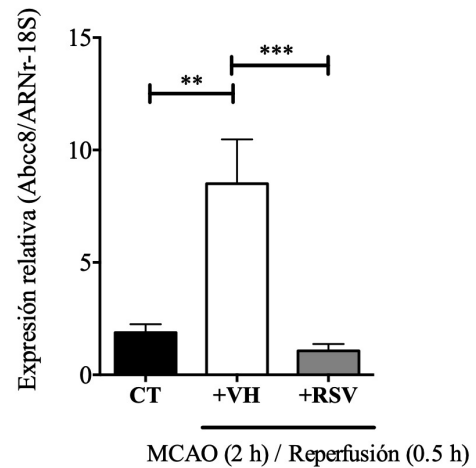
A**B**

Figura 12. Efecto del RSV sobre la expresión del gen *Abcc8* (SUR1). Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de diferentes tiempos de reperusión (0.5, 3, 8 y 24 h) mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión. Los niveles de ARNm se evaluaron por RT-qPCR en corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm). Los genes *Tbp* y *ARNr-18S* fueron usados para normalizar la expresión. **A.** Curso temporal de expresión del ARNm del gen *Abcc8* (n= 5). **B.** Efecto del RSV en la expresión del ARNm del gen *Abcc8* 0.5 h después de la reperusión (n= 7). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, **p<0.01; ***p<0.001.

6.8 El RSV disminuye la expresión de la proteína SUR1 en ratas sometidas a isquemia cerebral

Con la finalidad de verificar que el efecto del RSV en los niveles de ARNm del gen *Abcc8* estuviera asociado a una reducción en el nivel de la proteína SUR1, realizamos ensayos de Western blot. Encontramos que en el grupo control la proteína SUR1 es prácticamente indetectable (0.65 ± 0.17), mientras que 2 h de isquemia y 24 h de reperfusión aumentaron la expresión de una isoforma de SUR1 con un peso molecular aproximado de 65 kDa (+VH = 20.25 ± 2.7) (CT vs +VH; ** $p < 0.01$). La administración de RSV disminuyó la expresión de SUR1 (+RSV = 2.3 ± 1.2), siendo este resultado estadísticamente significativo respecto al grupo +VH (+VH vs +RSV; ** $p < 0.01$) (Figura 13).

6.9 Compuestos con capacidad antioxidante disminuyen la expresión de SUR1 en ratas sometidas a isquemia cerebral

Dado que el RSV redujo la actividad de unión al ADN de SP1, un factor transcripcional es sensible al estrés oxidante que regula la expresión de SUR1, decidimos evaluar el efecto de la curcumina (+CUR) y la N-acetil-cisteína (+NAC) en nuestro modelo. Estos dos compuestos tienen capacidad antioxidante y un efecto protector en isquemia por lo que podrían tener un efecto similar al RSV (Liu et al., 2014; Huang et al., 2018; Uemura et al., 2018). En ratas con isquemia, administramos la +CUR y la +NAC en concentraciones equimolares al RSV (27.7 mM) y encontramos que ambos disminuyen la expresión de SUR1 (+CUR = 1.4 ± 0.29 , +NAC = 1.2 ± 0.26) siendo estos valores estadísticamente significativos respecto al grupo sin tratamiento (+VH = 20.25 ± 2.7) (+VH vs +CUR; +VH vs +NAC; *** $p < 0.001$) (Figura 14).

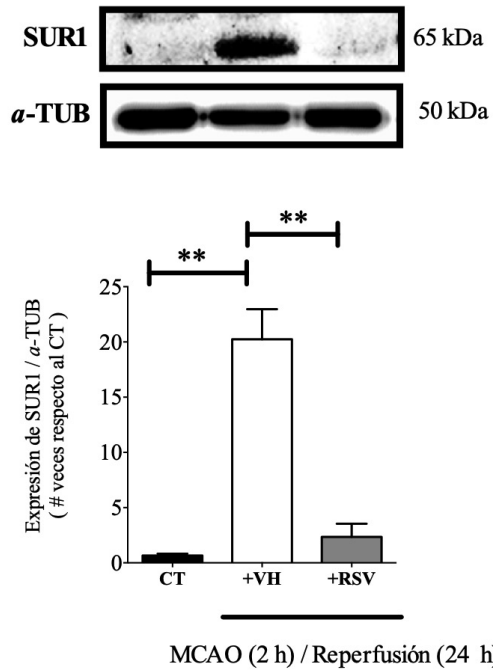


Figura 13. Efecto del RSV sobre la expresión de la proteína SUR1. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i.v.*) al inicio de la reperusión. La expresión de la proteína se detectó mediante Western blot en homogenizados de corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm) (n= 5). La proteína α -tubulina (α -TUB) se utilizó como control de carga. Los valores se expresaron como media \pm DE. ANOVA, Tukey, **p<0.01.

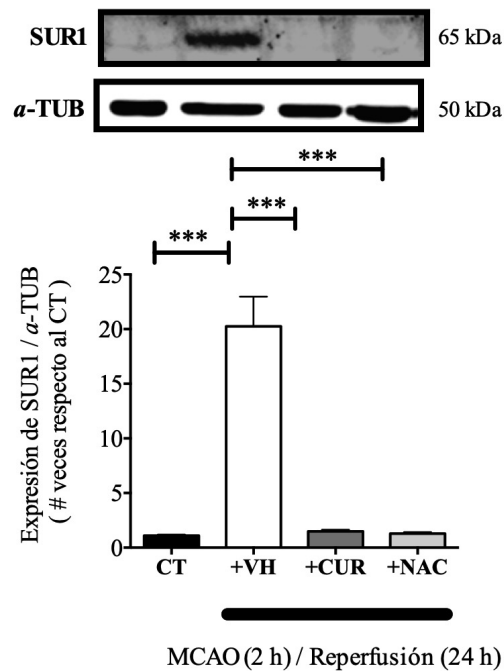


Figura 14. Efecto de compuestos con capacidad antioxidante en la expresión de SUR1. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de perfusión mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*), resveratrol +RSV, curcumina (+CUR) o N-acetil-cisteína (+NAC) a una concentración de 27.7 mM (*i. v.*) al inicio de la perfusión. La expresión de la proteína se detectó mediante Western blot en homogenizados de corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm) (n= 4). La proteína α -tubulina (α -TUB) se utilizó como control de carga. Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *** p <0.001.

6.10 El RSV disminuye la expresión de SUR1 en EnVC en ratas sometidas a isquemia cerebral

Con el objetivo de demostrar que el RSV ejerce su efecto protector a través de la regulación de la expresión de SUR1 en la BHE, usamos la técnica de inmunofluorescencia con doble inmunomarcaje en cortes coronales de cerebro para evaluar la expresión de SUR1 en células endoteliales que expresan ocludina específicamente (Figura 15 A). El análisis de imagen demostró que la isquemia incrementa la expresión de SUR1 en células positivas a ocludina (+VH = $9.25 \pm 2.1\%$) (CT vs +VH; * $p < 0.05$). Mientras que la administración de RSV previno este incremento en la expresión (+RSV = $2.2 \pm 1.9\%$), siendo este resultado estadísticamente significativo respecto al grupo +VH (+VH vs +RSV; * $p < 0.05$) (Figura 15 B).

6.11 El RSV disminuye la expresión de AQP4 en ratas con isquemia cerebral

Existe evidencia que señala que AQP4 al igual que SUR1 tiene un papel fundamental en la formación del edema al permitir la entrada masiva de agua al interior de la célula; además, SP1 participan en la regulación de su expresión (Simard et al., 2007). Utilizando la técnica de Western blot encontramos que la AQP4 tiene un comportamiento similar a SUR1, incrementa su expresión con la isquemia (+VH = 2.34 ± 0.64) (CT vs +VH; ** $p < 0.01$). Mientras que la administración de RSV previene el incremento en su expresión (+RSV = 0.6 ± 0.18) de manera significativa respecto al grupo +VH (+VH vs +RSV; * $p < 0.05$). (Figura 16).

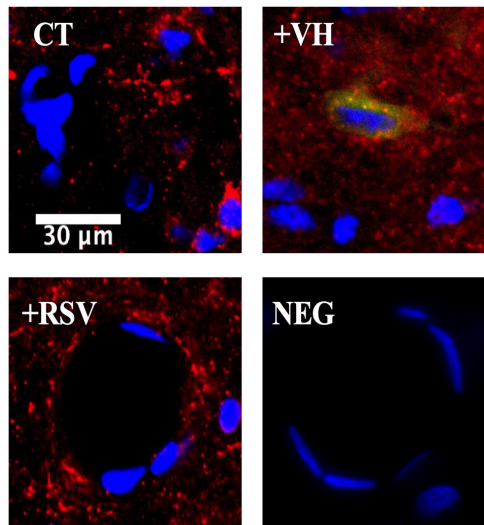
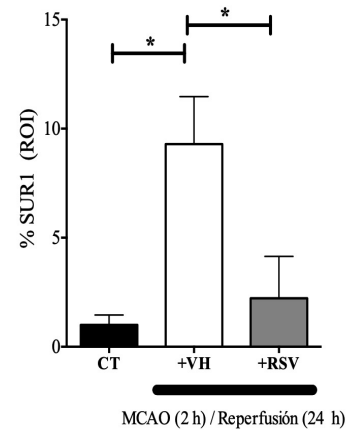
A**SUR1/Ocludina/DAPI****B**

Figura 15. Efecto del RSV en la expresión de SUR1 en endotelio vascular. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i. v.*) al inicio de la reperusión. **A.** Ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje en cortes coronales de cerebro de rata. Co-expresión de SUR1 (verde) y ocludina, un marcador de EnVC (rojo) en corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm). Los núcleos celulares marcados con DAPI (azul). NEG. Control negativo en el que no se incubó anticuerpo primario. **B.** Análisis de expresión de SUR1 en células endoteliales. Se calculó el % de co-localización de los canales verde (SUR1) y rojo (occludina) (ROI, del inglés *region of interes*) (n=3). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05.

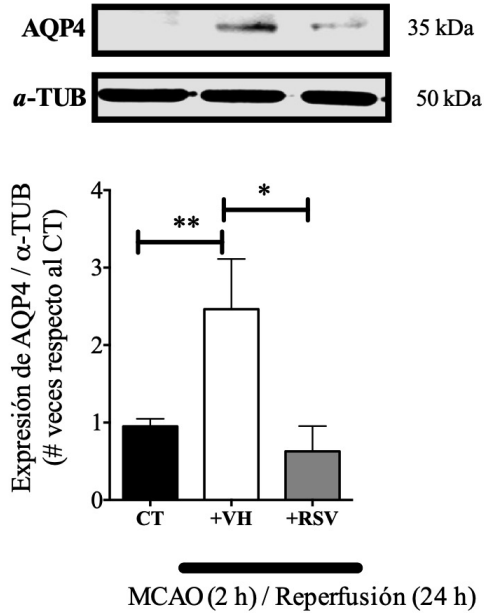


Figura 16. Efecto del RSV en la expresión de acuaporina 4 (AQP4). Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de perfusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i.v.*) al inicio de la perfusión. La expresión de AQP4 se detectó mediante Western blot en homogenizado total de corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm). La proteína α -tubulina (α -TUB) se utilizó como control de carga (n=4). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05; **p<0.01.

6.12 El RSV disminuye la expresión de AQP4 en astrocitos de ratas sometidas a isquemia cerebral

Recientemente se sugirió que SUR1 y AQP4 interactúan formando un gran complejo proteico que favorece la formación del edema en astrocitos (Stokum et al., 2018). Por ello, utilizando la técnica de inmunofluorescencia con doble inmunomarcaje en cortes coronales de tejido cerebral evaluamos la co-expresión de AQP4 y de la proteína acida fibrilar glial (GFAP), un marcador de astrocitos (Figura 17 A). El análisis de imagen mostró que en el tejido cerebral sano la co-

localización de AQP4 y GFAP es muy bajo, mientras que 2 h de isquemia y 24 h de reperfusión la aumentaron (CT, $1.2 \pm 0.9\%$ vs +VH, $15.89 \pm 3.7\%$; $**p < 0.01$). Por otro lado, la administración del RSV disminuyó la co-localización (+RSV = $3.1 \pm 2.8\%$) (+VH vs +RSV; $*p < 0.05$) (Figura 17 B). Es decir, el RSV ejerce el mismo efecto en la AQP4 que el observado para SUR1, lo que coincide con su mecanismo de regulación asociado a las condiciones de estrés durante la isquemia.

6.13 Evaluación de la corriente iónica en neuronas corticales de ratas sometidas a isquemia cerebral

La proteína SUR1 forma un complejo con el canal de Na^+ TRPM4 cuya activación depende de la concentración intracelular de ATP y Ca^{++} (Simard et al., 2006, 2012). Además, la glibenclamida, bloquea específicamente su actividad (Woo et al., 2013). Por lo tanto, se utilizó la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa para medir las corrientes iónicas macroscópicas de las neuronas corticales en ratas control (CT) y ratas en las cuales se indujo isquemia cerebral durante 2 h seguida de 24 h de reperfusión. Dentro de la pipeta de registro se utilizaron tres condiciones experimentales: con ATP (10 mM) en la solución interna, sin ATP y sin ATP más glibenclamida (1 mM). Debido al aumento en la expresión de SUR1 en ratas sometidas a MCAO, esperábamos que la falta de ATP promoviera un aumento significativo en la corriente iónica. Así mismo, esperábamos que la glibenclamida bloqueara el aumento provocado por la ausencia de ATP. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las corrientes iónicas entre las tres condiciones probadas (Tabla 12).

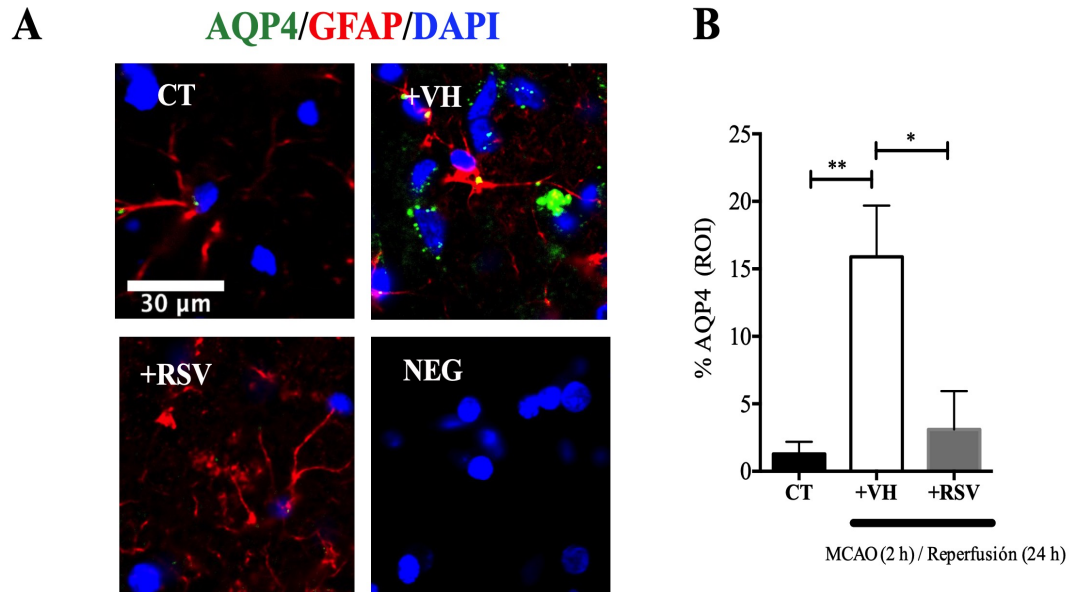


Figura 17. Efecto del RSV en la expresión de acuaporina 4 (AQP4) en astrocitos. Se indujo isquemia cerebral en ratas Wistar macho de 280 - 320 g de peso corporal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 2 h seguido de 24 h de reperusión, mientras que en los animales control (CT) se simuló la cirugía. Los grupos experimentales recibieron vehículo (+VH, etanol al 50%; *i. v.*) o tratamiento (+RSV, resveratrol a una dosis de 1.9 mg/kg de peso corporal; *i.v.*) al inicio de la reperusión. **A.** Ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje en cortes coronales de cerebro de rata. La expresión de AQP4 (Verde) y la proteína acida fibrilar glial (GFAP) un marcador de astrocitos (Rojo) fue evaluada en corteza cerebral (Bregma -2.16 a -4.20 mm), los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (Azul). NEG. Control negativo en el que no se incubó anticuerpo primario. **B.** Análisis de expresión de AQP4 en astrocitos. Se calculó el % de co-localización de los canales verde (AQP4) y rojo (GFAP). (ROI, del inglés *region of interes* (n= 3). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Tabla 12. Efecto de inhibidores del canal SUR1-TRPM4 en la corriente ionica de neuronas corticales.

	ATP [0 mM]	ATP [10 mM]	GLIB [1 mM]
CT	1.1 ± 0.46	0.99± 0.30	0.78± 0.18
+VH	1.01± 0.35	0.88± 0.31	0.76± 0.05
<i>CT- Animales con MCAO simulada</i>			
<i>+VH: Animales en los cuales se indujo isquemia cerebral mediante 2 h de MCAO/ 24 h de reperfusión con administracion de vehiculo</i>			
<i>GLIB -Glibenclamida; ATP- Adenosin trifosfato</i>			

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO PROTECTOR DEL RSV EN EnVC SOMETIDO A OGD

A pesar de que SUR1 aumenta su expresión en neuronas, astrocitos y células endoteliales en condiciones de isquemia (Simard et al., 2012), desde el punto de vista terapéutico la regulación de la actividad de SUR1 en las células del endotelio vascular cerebral tiene un papel estratégico debido a su participación en el inicio del edema iónico después de un evento isquémico. Por ello, para evaluar la funcionalidad de SUR1 e iniciar la caracterización del mecanismo molecular por el cual el RSV regula su actividad, decidimos utilizar un cultivo de EnVC y el modelo *in vitro* de OGD para reproducir los eventos que ocurren durante la isquemia cerebral focal transitoria. Empleamos la línea celular HBEC-5i, la cual es derivada de microendotelio vascular de la corteza cerebral de humano.

6.14 La OGD aumenta en el volumen celular del EnVC

Con el objetivo de evaluar la movilización de agua al interior de las células del EnVC por efecto de un estímulo isquémico, las células HBEC-5i se expusieron a OGD por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación. Encontramos que la OGD aumenta el volumen celular en forma dependiente del tiempo de recuperación: 1.1 ± 0.50 % (3 h), 1.1 ± 0.63 % (6 h), 1.2 ± 0.46 % (6 h), 2.5 ± 0.42 % (12 h) y 5.2 ± 0.64 % (24 h) alcanzándose valores significativos después de 24 h (CT vs 24 h; * $p < 0.05$) (Figura 18).

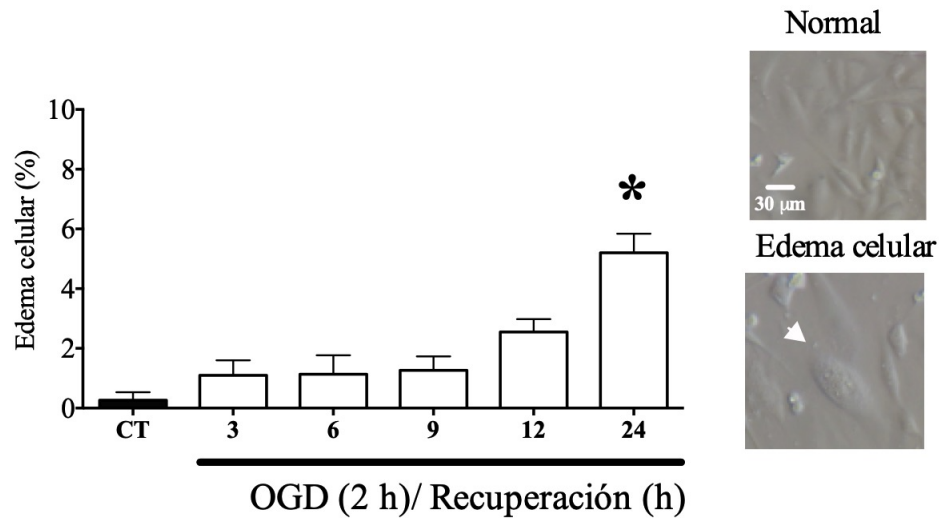


Figura 18. Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en el volumen celular. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El porcentaje de edema celular se obtuvo contando el número de células con aumento de volumen en 6 campos empleando un microscopio invertido MBL 3200, Kruss Optronic con filtro para contraste de fases, objetivo 20X (n= 3). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, *p <0,05.

6.15 La OGD aumenta la liberación de LDH en EnVC

El efecto del aumento en el volumen celular en la integridad de la membrana celular se midió con la liberación de la LDH. Esta enzima es liberada al medio de cultivo cuando las células mueren por procesos que provocan la ruptura de su membrana plasmática como la muerte celular por necrosis. La OGD aumentó de manera progresiva la liberación de LDH respecto al tiempo de recuperación: 83.18 ± 9.2 U/L (CT), 82.62 ± 7.3 U/L (3 h), 85.6 ± 6.7U/L (6 h), 96.24 ± 9.7U/L (9 h), 100.9 ± 12.13 U/L (12 h) y 184.9 ± 46.8 U/L (24 h) (Figura 19). Un aumento significativo en la liberación de LDH se observó después de 24 h de recuperación (CT vs 24 h; *p < 0.05)

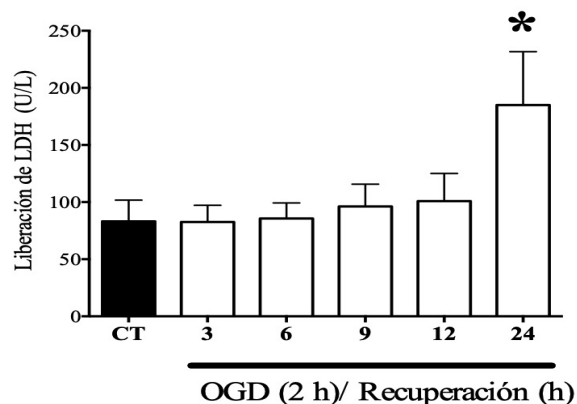


Figura 19. Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH). Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El daño a la membrana celular debido a la pérdida de la integridad de la membrana se evaluó mediante la liberación de la LDH al medio extracelular (n= 4). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *p <0.05.

6.16 La OGD incrementa la expresión de SUR1 en EnVC

Para determinar el nivel de expresión de la proteína SUR1 en las células HBEC-5i después de un estímulo isquémico, se indujo OGD por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación. Mediante ensayos de inmunofluorescencia y de Western blot observamos un incremento significativo en la expresión de la proteína (Figura 20 A, B). La cuantificación mostró que el incremento de la proteína SUR1 depende del tiempo de recuperación: 2.1 ± 0.41 (3 h), 2.5 ± 0.69 (6 h), 3.2 ± 0.87 (9 h), 4.2 ± 1.4 (12 h), la cual alcanzó los niveles máximos a 24 h de recuperación con valores de 4.2 ± 0.95 siendo este resultado estadísticamente significativo respecto al grupo CT (CT vs 24 h; *p < 0.05) (Figura 20 C). En las imágenes de inmunofluorescencia se observa que la distribución de SUR1 es homogénea (Figura 20 A).

6.17 El RSV disminuye el daño por OGD en EnVC

Debido a que el efecto máximo de daño y de expresión de SUR1 lo encontramos después de 2 h de OGD y 24 h de recuperación, utilizamos este tiempo para evaluar el efecto protector de diferentes dosis de RSV. Mediante ensayos colorimétricos basados en la reducción metabólica de la sal de tetrazolium MTT por las células viables, demostramos que la muerte celular ocasionada por la OGD en el grupo +VH (CT, 100.5 ± 0.7 5% vs +VH, 67.1 ± 8.5 %; * $p < 0.05$) se reduce con la administración de RSV en concentraciones de 3 (100.5 ± 2.6 %) y 5 μ M (111.6 ± 2.1 %) de manera estadísticamente significativa (+VH vs 3 μ M, +VH vs 5 μ M; ** $p < 0.01$). Así mismo encontramos que dosis mayores de RSV (100 a 500 μ M) tienen un efecto tóxico, ya que disminuyen la viabilidad a un 44.7 ± 4.0 % y 7.8 ± 2.2 %, respectivamente (Figura 21 A).

En seguida evaluamos el efecto de las dosis con efecto protector de 3 y 5 μ M de RSV en la liberación de LDH. Encontramos que ambas dosis previenen la liberación de LDH al medio manteniéndose los niveles del grupo control (CT = 107.1 ± 8.07 U/L; 3 μ M = 119.6 ± 18.7 U/L; 5 μ M = 123.5 ± 15.07 U/L) siendo estos valores estadísticamente significativos respecto al grupo sometido a OGD sin tratamiento (+VH = 198.6 ± 33.08 U/L) (+VH vs 3 μ M, +VH vs 5 μ M; * $p < 0.05$). (Figura 21 B).

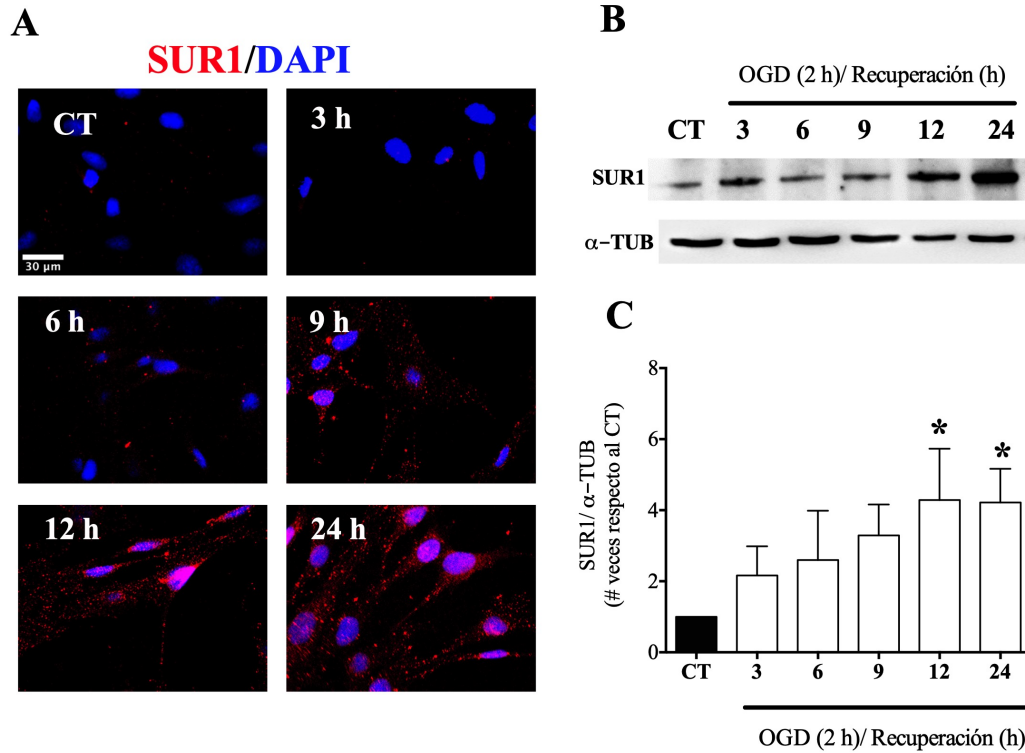


Figura 20. Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) sobre la expresión de la proteína SUR1 en las células HBEC-5i. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). **A.** La expresión de SUR1 (rojo) se evaluó mediante la técnica de inmunofluorescencia. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul), la fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo 40X **B.** Expresión de SUR1 evaluada por Western blot. La proteína α -tubulina (α -TUB) se utilizó como control de carga **C.** Análisis densitométrico de los ensayos de Western blot (n=6). Los valores se expresaron como media \pm DE. ANOVA, Tukey, * p <0.05.

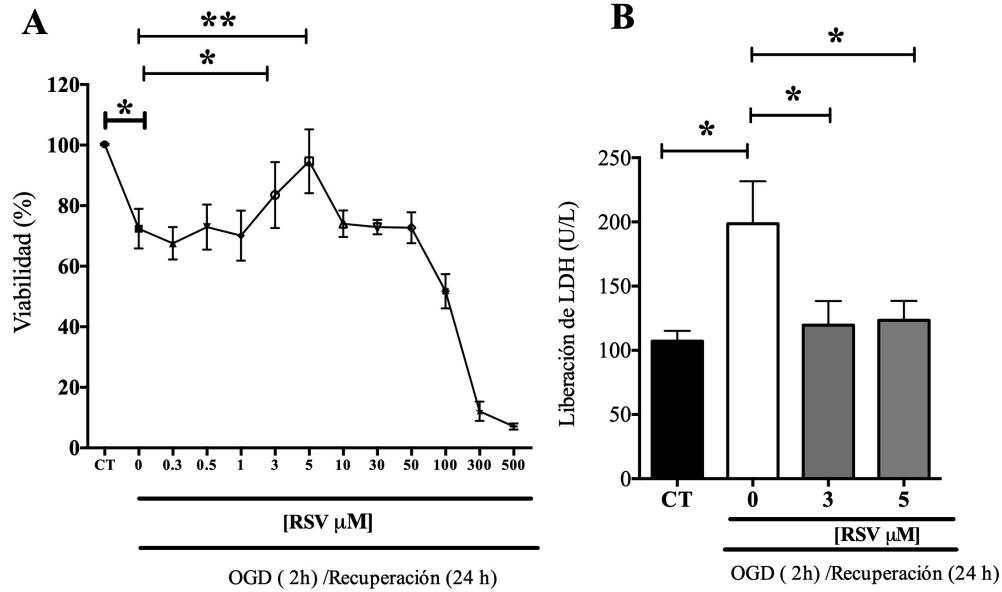


Figura 21. Efecto del RSV sobre la viabilidad celular. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV) fue administrado desde el inicio de la OGD y se mantuvo durante todo el experimento. **A.** El efecto de la dosis de RSV en la viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de reducción metabólica de la sal de tetrazolium MTT (n=4) **B.** El efecto protector de RSV 3 μM y 5 μM se evaluó mediante la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH) al medio extracelular (n=12). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, *p <0.05; **p<0.01.

6.18 Compuestos con propiedades antioxidantes disminuyen el daño por OGD en las células del EnVC

Para demostrar que el RSV ejerce su efecto protector debido a su capacidad antioxidante, evaluamos el efecto de dos compuestos con propiedades antioxidantes, los cuales fueron administrados en concentraciones equimolares al RSV (5 μ M). Encontramos que la administración de CUR y NAC aumenta la viabilidad celular a 91.1 ± 1.5 y $85.9 \pm 1.4\%$, respectivamente (+VH vs +NAC, +VH vs +CUR $p > 0.05$) (Figura 22 A).

Además evaluamos el efecto de CUR y NAC en la liberación de LDH y encontramos que ambos compuestos previenen la liberación de LDH con valores de 129.3 ± 16.19 y 127.2 ± 10.94 U/L, respectivamente; sin embargo, el efecto no fue estadísticamente significativo respecto al grupo +VH (180.0 ± 23.3 U/L) (+VH vs +NAC, +VH vs +CUR; $p > 0.05$) (Figura 22 B).

6.19 La OGD incrementa la generación de ERO en EnVC

Evaluamos la generación de ERO, las cuales son producidas en abundancia durante el periodo posterior a la hipoxia. Utilizamos el indicador dihidroetidio, el cual emite fluorescencia azul en el citosol hasta que se oxida a etidina y se intercala en el ADN de la célula (nuclear y mitocondrial) emitiendo fluorescencia rojo brillante. Además, mediante inmunofluorescencia se identificaron el citoesqueleto (β -actina) y los núcleos (DAPI) (Figura 23 A). Encontramos que después de 2 h de OGD y diferentes tiempos de recuperación el porcentaje de células positivas a etidina aumentó gradualmente respecto al tiempo de recuperación: $12.28 \pm 2.1\%$ (tiempo 0), $8.11 \pm 2.2\%$ (15 min), $13.06 \pm 0.81\%$ (30 min), 20.83 ± 3.87 (60 min), $48.7 \pm 7.1\%$ (120 min), encontrando su máximo nivel después de 240 min ($75.99 \pm 4.0\%$), siendo este resultado estadísticamente significativo respecto al grupo CT ($2.9 \pm 0.98\%$) (CT vs 240 min; $***p < 0.001$) (Figura 23 B).

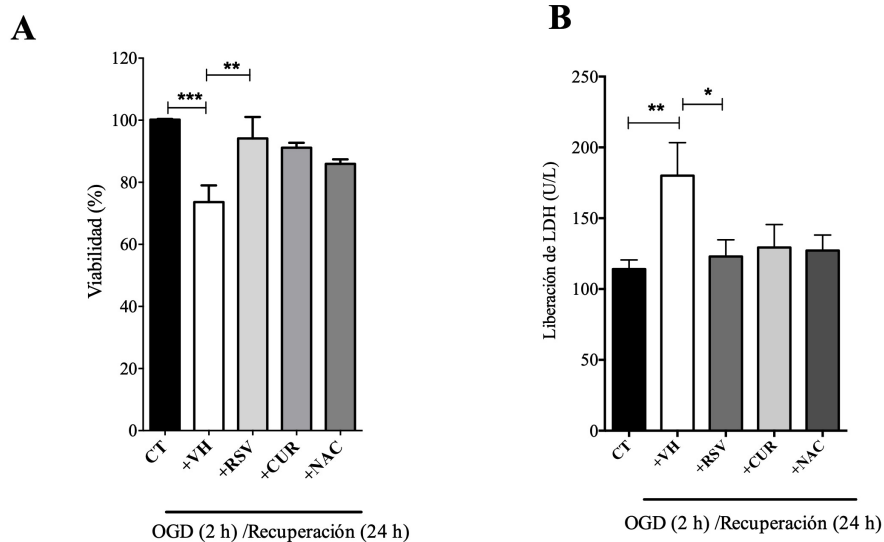


Figura 22. Efecto de compuestos antioxidantes sobre la viabilidad celular. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 24 h de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV) fue administrado desde el inicio de la OGD y se mantuvo durante todo el experimento. Los compuestos Curcumina (+CUR) y N-Acetil cisteína (+NAC) fueron administrados desde el inicio de la OGD y durante todo el experimento. Se usaron concentraciones equimolares al RSV (5 μM) utilizando DMSO al 0.01% como vehículo (+VH) (n= 5). **A.** El efecto protector de los compuestos antioxidantes se evaluó mediante la técnica de reducción metabólica de la sal de tetrazolium MTT y **B.** liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH) al medio extracelular (n=5). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, *p <0,05; **p<0.01; ***p<0.001.

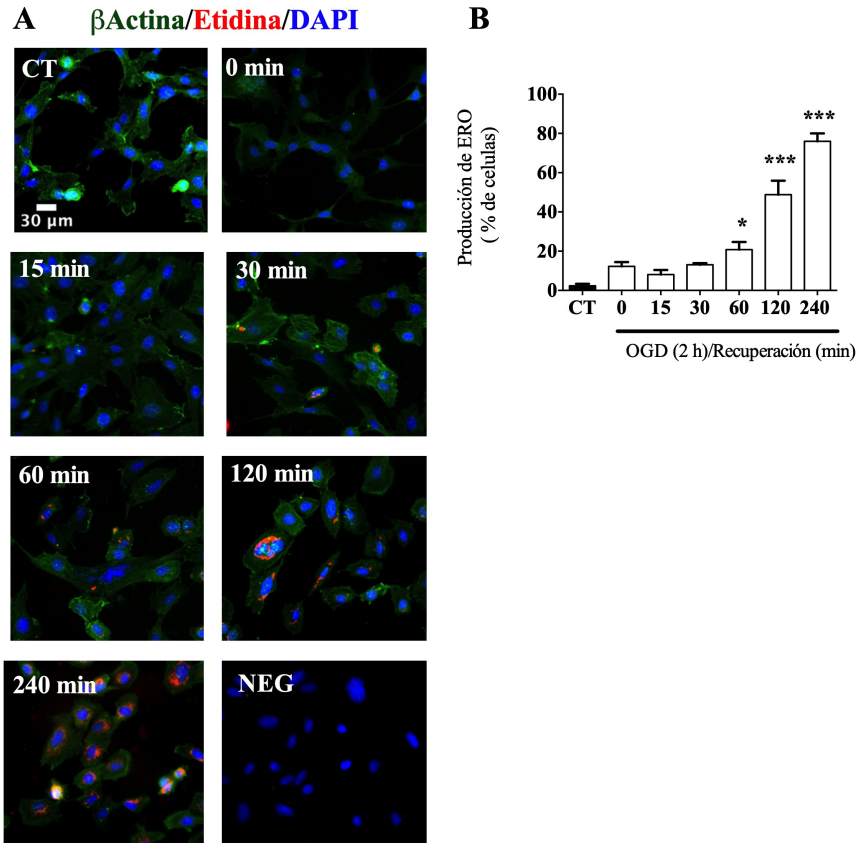


Figura 23. Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) sobre la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). **A.** La formación de ERO se evaluó mediante la oxidación del dihidroetidio a etidina (rojo). Núcleos celulares marcados con DAPI (azul) y citoesqueleto detectado con anticuerpo anti β -actina seguido de anti-IgG-DyLight™488 (verde). NEG. Control negativo en el que no se incubó anticuerpo primario. La fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo 20X. **B.** Análisis del % de células positivas a etidio por campo (n= 8). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

6.20 El RSV disminuye la generación de ERO por efecto de la OGD en EnVC

Mediante análisis de imagen evaluamos el efecto del RSV en la generación de ERO, evaluando la intensidad de la fluorescencia emitida por la etidina después de 2 h de OGD y 240 min de recuperación (Figura 24 A). Encontramos que la administración de una dosis de 5 μ M de RSV tiene la capacidad de prevenir significativamente la formación de ERO (+VH, 2.08 ± 0.45 vs +RSV, 0.6 ± 0.1 ; $p < 0.05$). (Figura 24 B).

6.21 La OGD activa a la proteína cinasa B (PKB/AKT) en EnVC

Los factores transcripcionales HIF-1, NF κ B y SP1 son activados por la vía de señalización dependiente de PKB/AKT la cual es activada por ERO (Friguls et al., 2001; Yalcin et al., 2010; Chetram et al., 2013). Dado que esta cinasa activa se encuentra fosforilada (p-AKT) (Pore et al., 2004), mediante Western blot evaluamos su participación en la OGD. Encontramos que los niveles de p-AKT aumenta gradualmente con el tiempo de recuperación: 0.90 ± 0.21 (tiempo 0), 1.16 ± 0.32 (15 min), 2.0 ± 0.65 (30 min), 2.0 ± 0.91 (60 min), 1.5 ± 0.36 (120 min). Alcanzó su máximo nivel de fosforilación después de 240 min con un valor de 3.2 ± 0.61 (CT vs 240 min; $**p < 0.01$) (Figura 25 A, B).

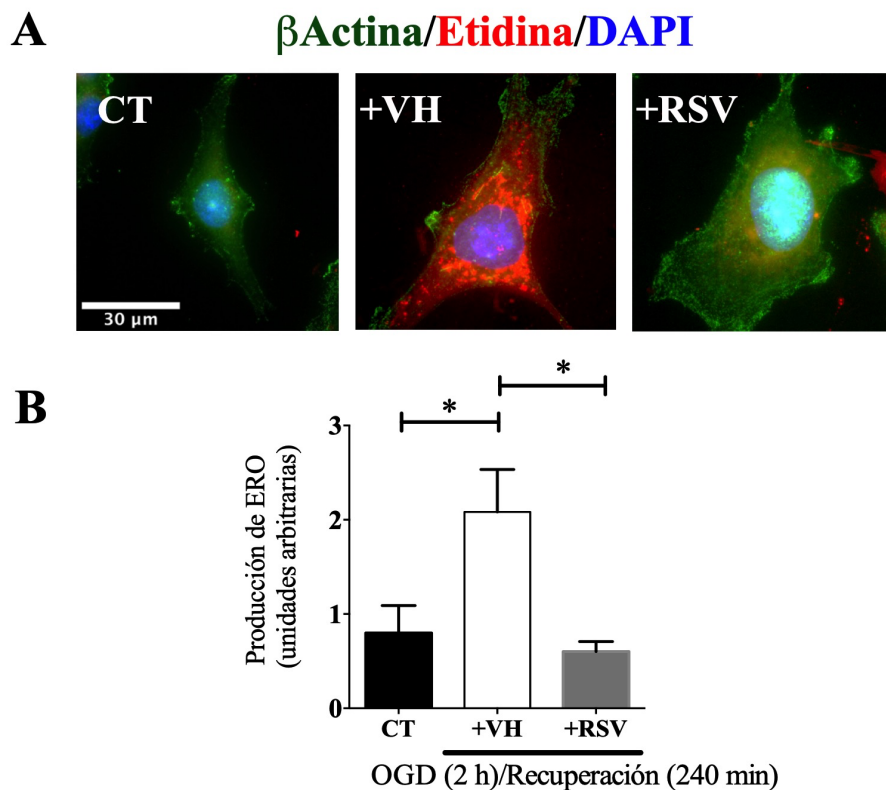


Figura 24. Efecto del RSV sobre la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 24 h de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV, 5 μM en 0.01% DMSO) fue administrado desde el inicio de la OGD y se mantuvo durante todo el experimento. **A.** La formación de ERO se evaluó mediante la oxidación de la dihidroetidina a etidina (rojo). Núcleos celulares marcados con DAPI (azul) y citoesqueleto detectado con anticuerpo anti β-actina seguido de anti-IgG-DyLight™ 488 (verde). La fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo de inmersión 100X. **B.** Análisis del % de células positivas a etidina por campo (20X) (n = 8). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05.

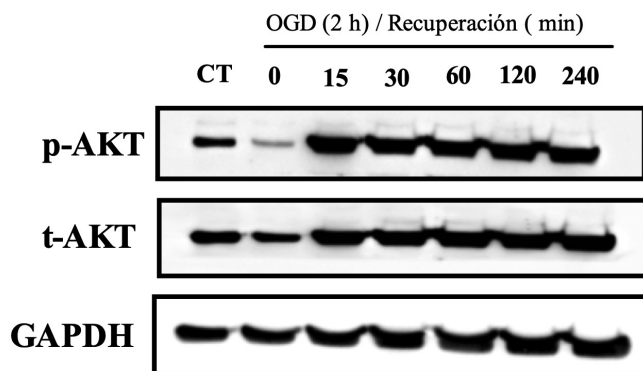
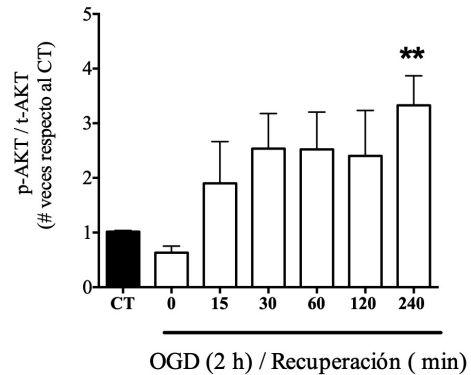
A**B**

Figura 25. Efecto de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) sobre la actividad de la proteína cinasa B (PKB/AKT). Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (3, 6, 9, 12 y 24 h) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). **A.** La actividad de la AKT se evaluó mediante la detección de la forma fosforilada de la enzima (p-AKT) normalizando con el nivel de la enzima total (t-AKT) y la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en ensayos de Western blot. **B.** Análisis densitométrico de los ensayos de Western blot (n= 9). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, **p<0.01.

6.22 El RSV disminuye la activación de la proteína cinasa B (PKB/AKT) en EnVC

Debido a que la OGD induce el aumento gradual en el nivel de p-AKT, lo que coincide con la generación de ERO, evaluamos el efecto del RSV. Encontramos que el RSV disminuye los niveles de p-AKT (+VH, 3.5 ± 0.54 vs +RSV, 2.4 ± 0.38; p> 0.05) sin ser un cambio estadísticamente significativo (Figura 26 A, B).

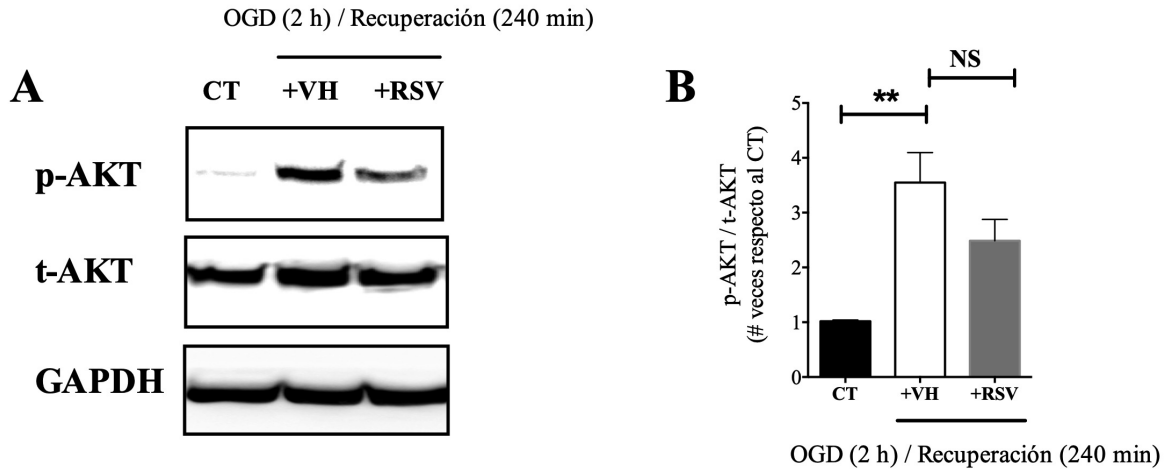


Figura 26. Efecto del RSV sobre la actividad de la proteína cinasa B (AKT). Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 240 min de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV) fue administrado (5 μM en 0.01% DMSO) al inicio de la OGD y se mantuvo durante todo el experimento. **A.** Se detectó la forma fosforilada de la enzima (p-AKT) normalizando con el nivel de la enzima total (t-AKT) y la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en ensayos de Western blot. **B.** Análisis densitométrico de los ensayos de Western blot (n=7). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, NS, no significativo, ** p<0.01.

6.23 La expresión de SUR1 depende de la activación de la proteína cinasa B (PKB/AKT) en EnVC

Para evaluar la participación de AKT en la regulación de la expresión de SUR1 evaluamos el efecto de un inhibidor específico de la cinasa. Encontramos que la inhibición de AKT previene el incremento en la expresión de SUR1 inducida por la OGD y 24 h de recuperación (+VH, 2.3 ± 04 vs +AKT_{inh}, 1.08 ± 0.16; *p< 0.05) siendo este resultado estadísticamente significativo (Figura 27).

6.24 El promotor del gen *Abcc8* (SUR1) posee múltiples sitios de unión a los factores transcripcionales HIF-1, SP1 y NFκB

Mediante el análisis en sílico de la región promotora del gen *Abcc8* que codifica para la proteína SUR1 se definieron los múltiples sitios de unión al ADN de los diferentes factores transcripcionales que deben participar en la regulación de su expresión. Entre estos nos interesaron aquellos que son sensibles al estrés oxidante: HIF-1, SP1 y NFκB (Figura 28). Por lo tanto, evaluamos la capacidad de unión al ADN de estos factores transcripcionales así como su localización celular en cultivo de las células HBEC-5i sometidas a OGD.

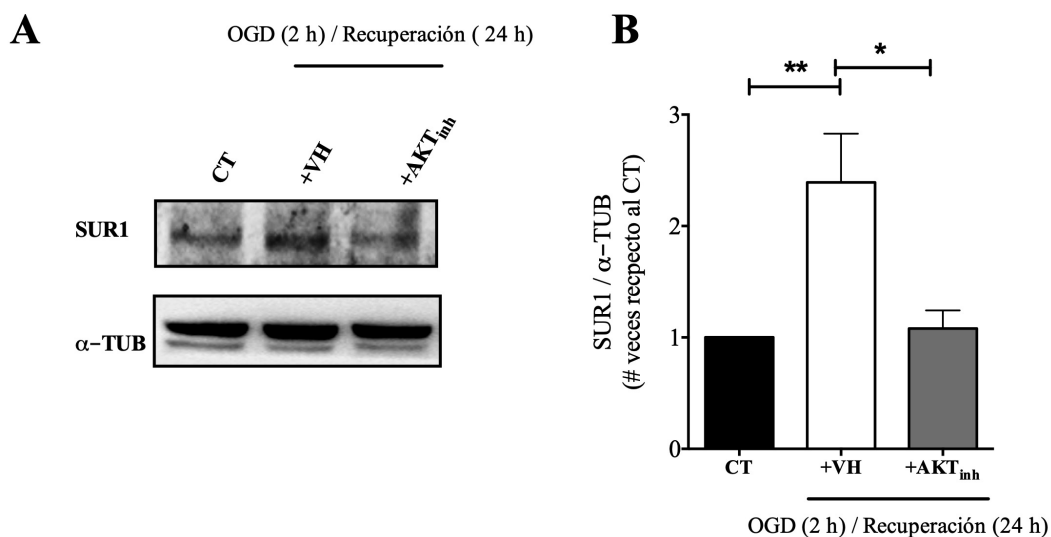


Figura 27. Efecto de la inhibición de la proteína cinasa B (PKB/AKT) sobre la expresión de SUR1. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 24 h de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El inhibidor de AKT (+AKTinh) fue administrado (5 μM en 0.01% DMSO) al inicio de la OGD y se mantuvo durante todo el experimento. **A.** La expresión de SUR1 fue evaluada por Western blot y normalizada con α-tubulina (α-TUB) **B.** Análisis densitométrico de los ensayos de Western blot (n= 6). Los valores se expresaron como media ± DE. ANOVA, Tukey, * p <0,05; ** p<0.01; *** p<0.001.

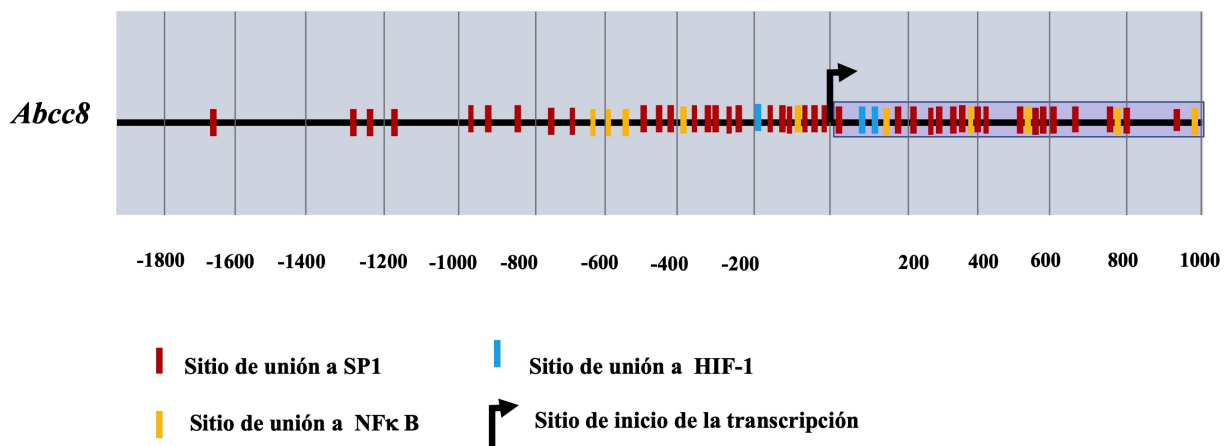


Figura 28. Representación esquemática del promotor de SUR1. Análisis de predicción de sitios de unión al ADN de la proteína específica 1 (SP1), el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) en el promotor del gen *Abcc8* (SUR1) realizado con el programa Expaty Bioinformatics Resource considerando 3000 pb (-2000 a +1000) a partir del codón de inicio de la transcripción (ATG).

6.25 La OGD aumenta la actividad de unión al ADN de HIF-1 en EnVC

El aumento en la actividad del factor transcripcional HIF-1 se ha asociado con la expresión de SUR1 (Woo et al., 2012). Por lo tanto, evaluamos su actividad de unión al ADN y su localización en el núcleo en células estimuladas durante 2 h de OGD y diferentes tiempos de recuperación. En ensayos de inmunofluorescencia encontramos que HIF-1 α presenta una localización nuclear baja en condiciones fisiológicas de oxígeno ($33.13 \pm 1.3\%$). Estos niveles aumentaron durante la OGD ($49.4 \pm 15.3\%$) y se mantuvieron elevados durante los primeros minutos de la recuperación (15 min = $59.6 \pm 18.05\%$). Y regresaron a los valores basales después de 30 min ($39.9 \pm 2.3\%$), manteniéndose sin cambio hasta 240 min después de la recuperación ($28.8 \pm 8.4\%$) (Figura 29 A, B). De la misma manera, utilizando los ensayos de unión al ADN observamos que HIF-1 está activo en condiciones control (1.0 ± 0.01), que aumenta su actividad durante la OGD (1.66 ± 1.1) la cual se mantiene en los primeros 15 min de la recuperación (1.61 ± 0.29), regresando a sus niveles basales a los 30 min de recuperación (1.4 ± 0.11) (Figura 29 C). Estos resultados coinciden con la respuesta canónica de la proteína HIF-1 ante un estímulo hipóxico; sin embargo, los cambios observados no fueron estadísticamente significativos con ninguna de las técnicas empleadas.

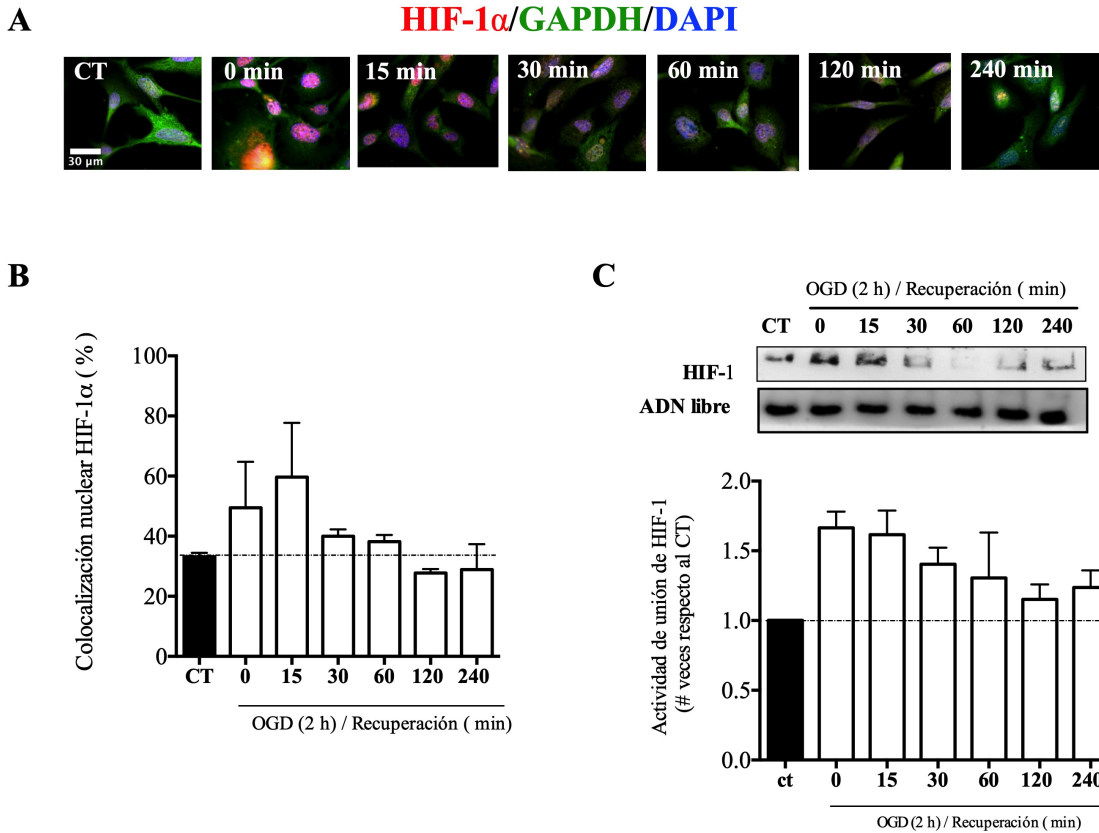


Figura 29. Efecto de la OGD/recuperación sobre la actividad de HIF-1. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (0, 15, 30, 60, 120 y 240 min) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). La línea punteada representa la actividad basal. **A.** La localización del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 α , rojo) se evaluó mediante inmunofluorescencia. Núcleos celulares marcados con DAPI (azul) y citoesqueleto detectado con anticuerpo anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) seguido de anti IgG-Alexa Fluor®594 (verde). La fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo 20X. **B.** Análisis del % de localización nuclear de HIF-1 α (HIF-1 α -DAPI) (n= 6). **C)** Ensayos de unión al ADN (EMSA, del inglés electrophoretic mobility shift assay) para HIF-1(n=12). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05.

6.26 La OGD incrementa la actividad de unión al ADN de SP1 en EnVC

En ensayos de inmunofluorescencia encontramos que SP1 tiene una localización nuclear eleva ($6.7 \pm 0.30\%$). Aun así, 2 h de OGD incrementan el nivel de localización nuclear en forma dependiente del tiempo de recuperación: $6.7 \pm 0.23\%$ (0 min), $8.2 \pm 0.87\%$ (15 min), $8.17 \pm 0.65\%$ (30 min), $7.04 \pm 0.44\%$ (60 min) y $10.60 \pm 2.05\%$ (120 min) hasta alcanzar su nivel máximo después de 240 min con un valor de $12.47 \pm 3.4\%$ (Figura 30 A, B). De manera similar utilizando los ensayos de unión al ADN (EMSA) observamos que SP1 tiene actividad en condiciones control (CT = 1.0 ± 0.01), la cual aumenta gradualmente durante la recuperación. Inicia en la OGD con un valor de 1.7 ± 0.35 y se incrementa a 2.3 ± 0.35 después de 240 min, siendo este valor estadísticamente significativo respecto al grupo control (CT vs 240 min; $**p < 0.01$) (Figura 30 C).

6.27 La OGD aumenta la actividad de unión al ADN de NFκB en EnVC

Estímulos asociados al proceso de inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) aumenta la expresión de SUR1 en células de EnVC. Por lo tanto, la activación de NFκB podrían estar involucrados en la expresión del gen *Abcc8* (Simard et al., 2009). La localización nuclear de la subunidad p52 del factor NFκB/fue máxima después de 2 h de OGD y 15 min de recuperación ($61.2 \pm 9.7\%$), esta se mantuvo elevada hasta 240 min (Figura 31 A, B). En los ensayos EMSA observamos que la actividad de unión al ADN de este factor aumentó gradualmente con la recuperación: 1.2 ± 0.05 (tiempo 0), 1.5 ± 0.31 (15 min), 1.8 ± 0.19 (30 min), 1.8 ± 0.29 (60 min), 1.9 ± 0.18 (120 min) alcanzando su máxima actividad después de 240 min de recuperación con un valor de 2.1 ± 0.3 , siendo este resultado estadísticamente significativo respecto al grupo CT (CT vs 240 min; $**p < 0.01$) (Figura 31 C).

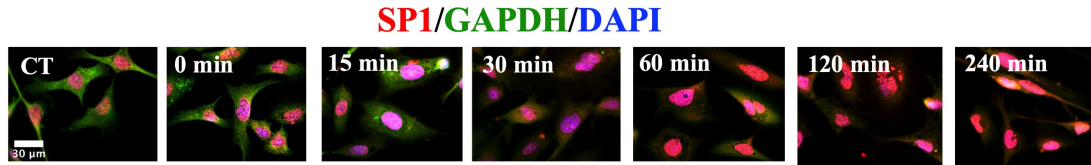
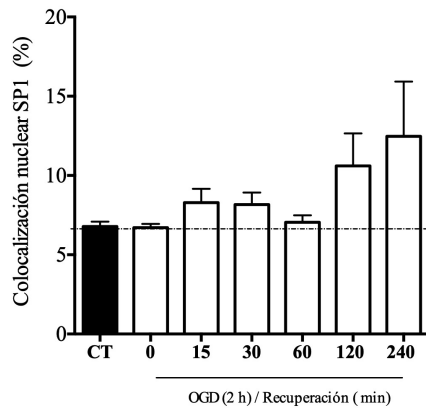
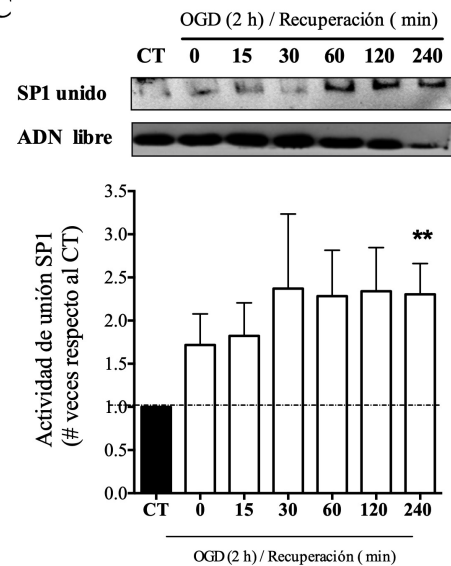
A**B****C**

Figura 30. Efecto de la OGD/recuperación sobre la actividad de SP1. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (0, 15, 30, 60, 120 y 240 min) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). La línea punteada representa la actividad basal. La línea punteada representa la actividad basal. **A.** La localización de la proteína específica 1 (SP1, rojo) se evaluó mediante inmunofluorescencia. Núcleos celulares marcados con DAPI (azul) y citoesqueleto detectado con anticuerpo anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) seguido de anti-IgG-Alexa Fluor®594 (verde). La fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo 20X. **B.** Análisis del % de localización nuclear de SP1 (SP1-DAPI) (n = 6) **C.** Ensayos de unión al ADN (EMSA, del inglés electrophoretic

mobility shift assay) para SP1 (n=12). Los valores se expresaron como media \pm DE. ANOVA, Tukey, **p<0.01

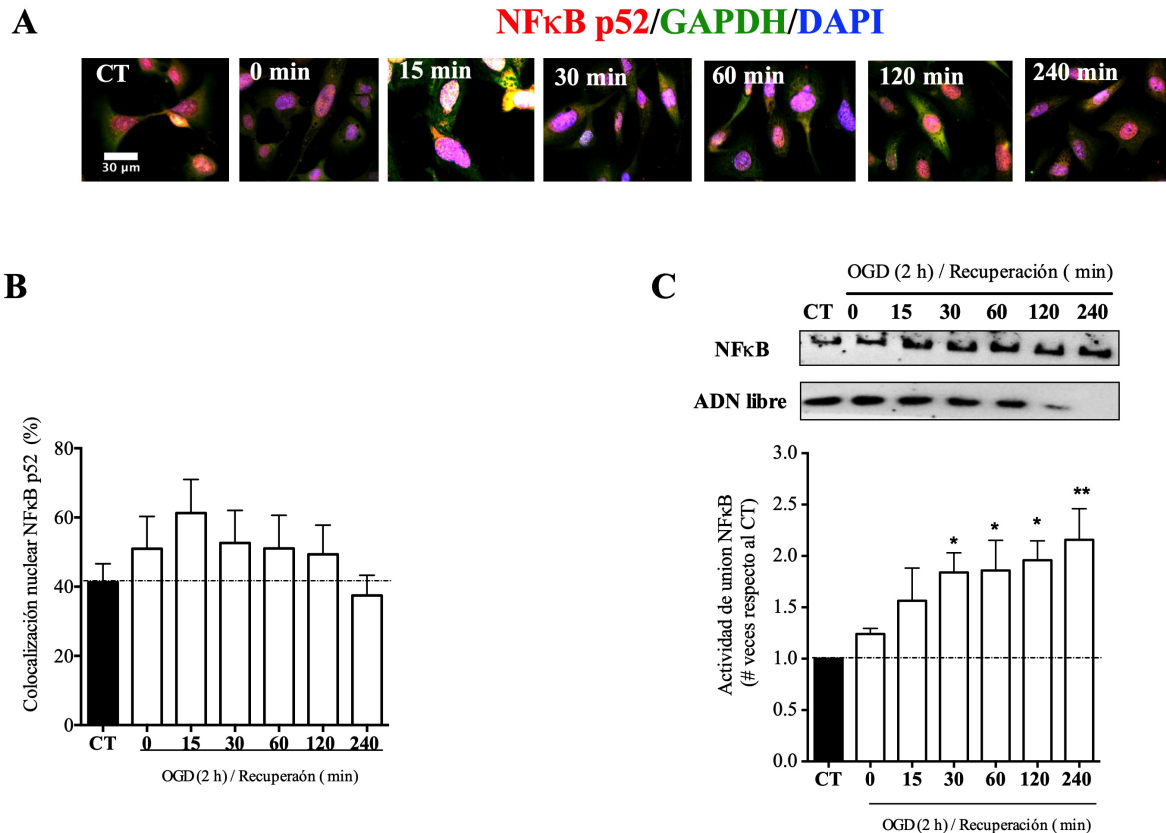


Figura 31. Efecto de la OGD/recuperación sobre la actividad de NFκB. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de diferentes tiempos de recuperación (0, 15, 30, 60, 120 y 240 min) con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). La línea punteada representa la actividad basal. **A.** La localización del factor potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB/p52, rojo) se evaluó mediante inmunofluorescencia. Núcleos celulares marcados con DAPI (azul) y citoesqueleto detectado con anticuerpo anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) seguido de anti-IgG-Alexa Fluor®594 (verde). La fluorescencia fue detectada con

un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo 20X. **B.** Análisis del % de localización nuclear de NFκB/p52 (NFκB/p52-DAPI) (n= 6). **C.** Ensayos de unión al ADN (EMSA, del inglés electrophoretic mobility shift assay) para NFκB (n= 12). Los valores se expresaron como media ± D.E. ANOVA, Tukey, *p<0.05; **p<0.01.

6.28 El RSV disminuye la actividad de unión al ADN de SP1 y NFκB en EnVC

Para evaluar el efecto del RSV en la actividad de unión al ADN de SP1 y NFκB inducida por la OGD seguida de 240 min de recuperación realizamos ensayos EMSA. Encontramos que el RSV disminuye la actividad de unión de SP1 (CT = 0.98 ± 0.08 , +VH = 2.3 ± 0.35 ; +RSV = 1.7 ± 0.31) sin ser valores estadísticamente diferentes (Figura 32 A). Por otro lado, el RSV previno el aumento en la actividad de unión al ADN del NFκB de manera significativa (+VH, 1.68 ± 0.12 vs +RSV, 0.9 ± 0.10 ; p< 0.05) (Figura 32 B).

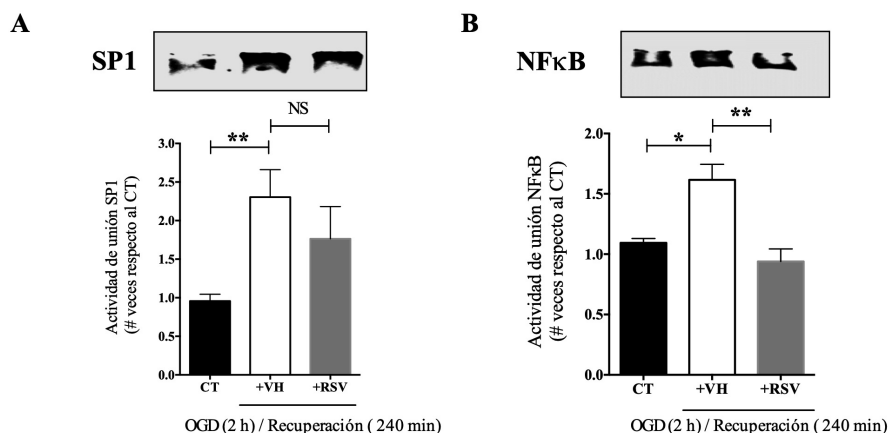


Figura 32. Efecto del RSV sobre la actividad de los factores transcripcionales SP1 y NF-κB. Las células HBEC-5i se se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 240 min de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV) fue administrado (5 μM en 0.01% DMSO) al inicio de la OGD y se mantuvo durante todo el experimento. **A.** La actividad de unión de la proteína específica 1 (SP1) (n= 12) y **B.** el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) se evaluaron en ensayos de unión al ADN (EMSA, del inglés

electrophoretic mobility shift assay) (n= 12). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, NS, no significativo; * p <0.05; ** p<0.01.

6.29 La inhibición de SP1 y NF κ B disminuye el daño inducido por la OGD en EnVC

Con el objetivo de evaluar la participación de SP1 y NF κ B en la vía de señalización que lleva a la muerte del EnVC se midió el efecto de los inhibidores de estos factores. La administración de mitramicina A (inhibidor de SP1) previno la reducción en la viabilidad inducida por la OGD (+VH, 73.64 \pm 5.3% vs +MIT, 92.14 \pm 2.1%; **p< 0.01). Notablemente, la administración del inhibidor de NF κ B tuvo un efecto superior, alcanzando valores similares a los observados a los del grupo control (CT, 100.2 \pm 0.2% vs +NF- κ B_{inh} 100.5 \pm 1.7; ***p< 0.001) (Figura 33 A). Así mismo, encontramos que ambos inhibidores reducen el efecto de la OGD en la liberación de LDH a (CT = 114.8 \pm 6.3 U/L, +MIT = 142.6.14 \pm 5.1 U/L, +NF- κ B_{inh}, 144. \pm 9.9 U/L) (Figura 33 B); sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

6.30 El RSV disminuye la expresión de SUR1 en EnVC

Con los experimentos anteriores demostramos que la OGD aumenta la expresión de SUR1 y que el RSV previene parcialmente la actividad de SP1 y NF κ B, siendo estos factores reguladores de la expresión de SUR1. Por lo tanto, con la finalidad de evaluar el efecto del RSV en la expresión de SUR1 realizamos ensayos de Western blot e inmunofluorescencia. Encontramos que el RSV disminuye el nivel de expresión de SUR1 inducido por la OGD. Este efecto se reprodujo con CUR y NAC (Figura 34 A). En el Western blot se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de SUR1 inducido por la OGD en ausencia y presencia de los tratamientos con antioxidantes (+VH = 3.05 \pm 0.65, +RSV = 1.07 \pm 0.22, +NAC = 1.14 \pm 0.52, +CUR = 1.41 \pm 0.46) (Figura 34 B,C). Así mismo, los inhibidores de SP1 y NF κ B disminuyeron la expresión de SUR1 (+MIT = 1.08 \pm 0.23,

+NF- κ B_{inh} = 1.02 ± 0.45) siendo estos valores estadísticamente diferentes al grupo +VH (+VH vs +MIT; +VH vs +NF κ B_{inh}; *p < 0.05)

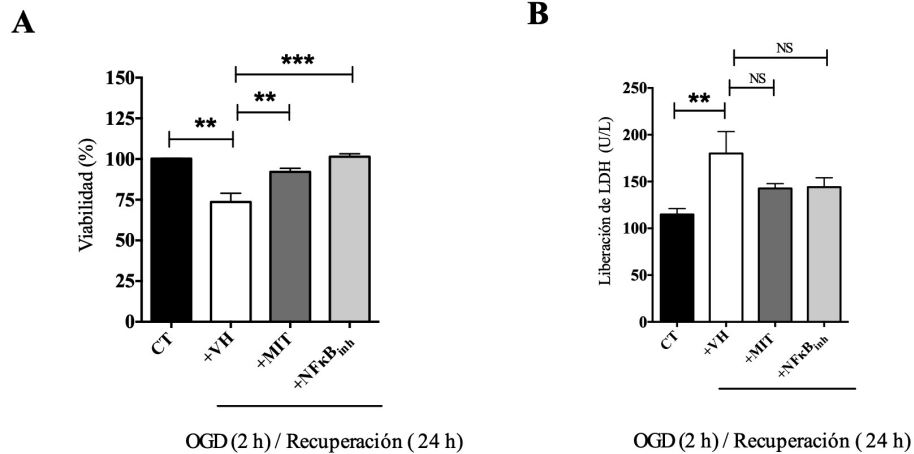


Figura 33. Efecto de la inhibición de SP1 y NF κ B sobre la viabilidad del EnVC. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 240 min de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV), el inhibidor específico de la proteína específica 1 (SP1) “mitramicina A” (+MIT) y el inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (+NF κ B_{inh}) fueron administrados (5 μ M en 0.01% DMSO) al inicio de la OGD y se mantuvieron durante todo el experimento. **A.** La viabilidad celular se midió mediante la reducción metabólica de la sal de tetrazolium MTT (n= 5). **B.** El efecto protector se evaluó mediante la actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) liberada al medio extracelular (n= 5). Los valores se expresaron como media \pm D.E. ANOVA, Tukey, NS, no significativo; **p < 0.01; ***p < 0.001.

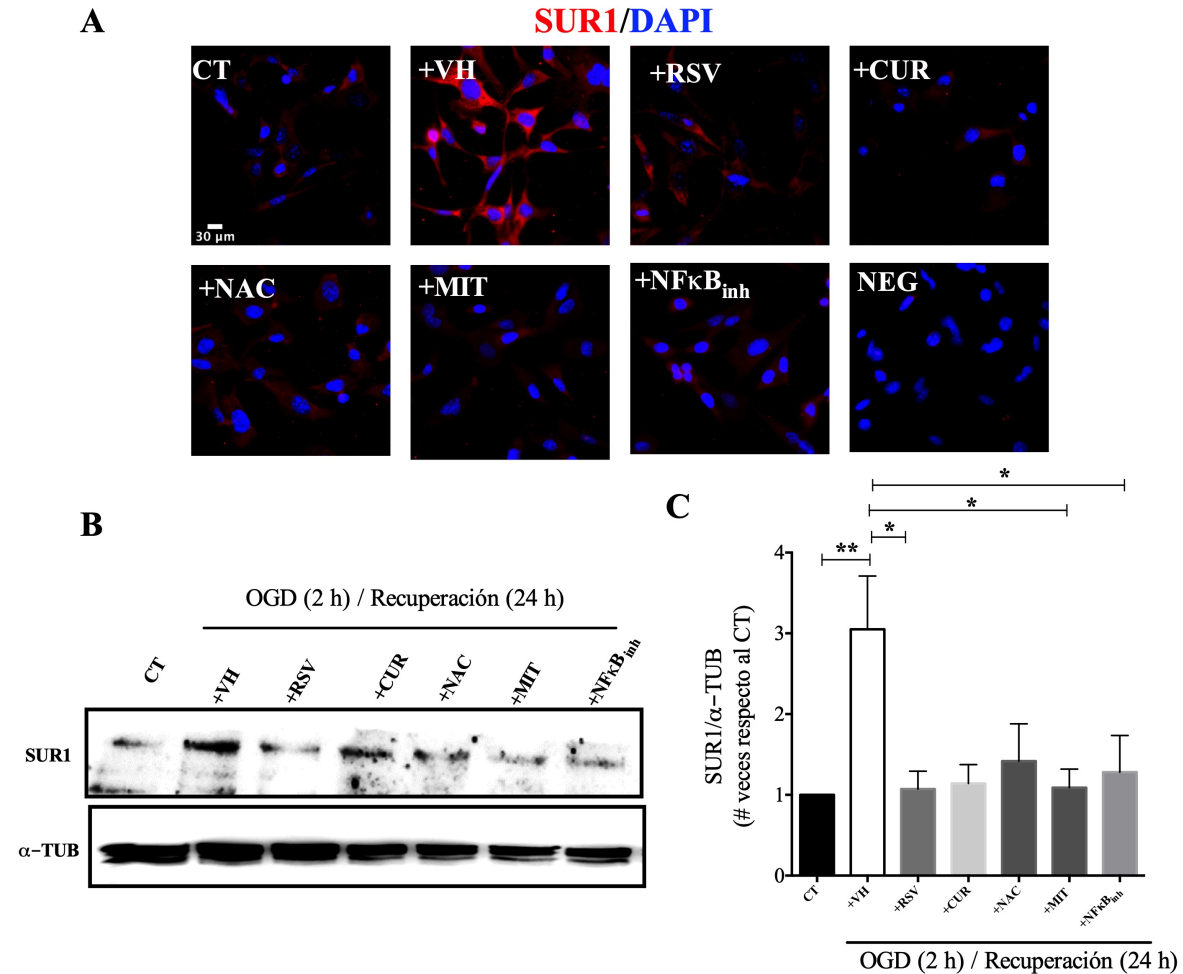


Figura 34. Efecto de compuestos antioxidantes e inhibidores de SP1 y NFκB sobre la expresión de SUR1. Las células HBEC-5i se privaron de oxígeno (1% O₂) y glucosa (OGD) por 2 h seguido de 24 h de recuperación con 21% O₂ y glucosa. En el control (CT) se cambió el medio y se mantuvieron en condiciones fisiológicas de oxígeno (21% O₂, con glucosa). El resveratrol (+RSV), la curcumina (+CUR) y la N-acetil-cisteína (+NAC) fueron administrados (5 μM en 0.01% DMSO) al igual que la mitramicina A (inhibidor de SP1) y el inhibidor del NFκB (+NFκB_{inh}) al inicio de la OGD y se mantuvieron durante todo el experimento. **A.** La expresión de SUR1 (rojo) se evaluó por inmunofluorescencia. Núcleos marcados con DAPI (azul). La fluorescencia fue detectada con un microscopio invertido Olympus modelo 1X71, objetivo 40X. **B.** Expresión de SUR1 evaluada por Western blot. **C.** Análisis densitométrico de los ensayos de Western blot normalizada con α-tubulina (α-TUB) (n= 6). Los valores se expresaron como media ± DE. ANOVA, Tukey, *p <0,05; **p<0.01.

VII. DISCUSIÓN

A pesar de que el daño a la BHE y la formación del edema cerebral puede aumentar la morbilidad y la mortalidad de los pacientes con isquemia cerebral, existen pocas terapias eficaces para contrarrestarlo (Desilles et al., 2013). El aumento en el volumen cerebral en estos pacientes a menudo es tratado con intervenciones farmacológicas no suficientemente probadas como el manitol y solución salina hipertónica, o con procedimientos quirúrgicos potencialmente mortales como la craniectomía descompresiva (Kurland et al., 2015). Por lo tanto, ha sido necesario y de manera urgente, proponer nuevos tratamientos para prevenir la formación del edema cerebral desde sus inicios, es decir, prevenir el daño a la BHE en lugar de intervenir cuando el edema ya está establecido.

Por otro lado, el RSV es un polifenol que posee un amplio espectro de actividades biológicas entre las que destacan sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Vauzour, 2012; Rauf et al., 2018). Es así, que se ha propuesto al RSV como un fármaco para el tratamiento de la isquemia cerebral en múltiples modelos (Pineda-Ramírez et al., 2018); sin embargo, dada las limitaciones de los modelos preclínicos, su mecanismo molecular de acción en la protección contra la isquemia cerebral sigue siendo desconocido. Por ello, en este proyecto, quisimos contribuir al evaluar la función del RSV en la formación del edema cerebral.

7.1 Efecto del daño a la BHE y la formación del edema cerebral en la supervivencia

En los últimos años la isquemia cerebral representó la segunda causa de muerte siendo responsables de 5,4 millones de muertes cada año a nivel mundial (Hacke et al., 1996; Soler and Ruiz, 2010; Guzik and Bushnell, 2017). Siendo los pacientes que desarrollan edema severo los que presentan los mayores índices de mortalidad, la cual oscila del 60% al 80% (Hacke et al., 1996; Berrouschot et al., 1998). Lo anterior debido a que el edema provoca la expansión del volumen cerebral y en consecuencia un aumento de la presión intracraneal, que afecta los centros respiratorios en el tronco encefálico y con frecuencia induce hernia transtentorial,

causando la muerte en la mayoría de los pacientes que padecen esta patología (Hacke et al., 1996; Desilles et al., 2013). Así mismo, en modelos animales en rata las primeras 24 h después de iniciado un insulto isquémico son críticas, debido a que el máximo índice de mortalidad (~65%) es alcanzado durante este periodo (Simard et al., 2006). En este sentido, nuestros hallazgos coinciden con los antecedentes, ya que el RSV disminuye el edema y aumenta la supervivencia en ratas sometidas a 2 h de isquemia cerebral y 24 h de reperusión. Además, el RSV mejoró notablemente el estado neurológico de los animales que sobrevivieron, a juzgar por la recuperación funcional parcial de la extremidad afectada. Esta mejora podría estar asociada con una actividad compensatoria originada en la corteza somatosensorial, una zona involucrada en funciones motoras, como el control de la postura (Kaulmann et al., 2017). En nuestro modelo, esta región corresponde a la corteza somatosensorial, la cual fue predominantemente protegida por el RSV, como se demostró con el ensayo de tinción con TTC.

7.2 Efecto del RSV en la función de SUR1 en el daño a la BHE y la formación del edema durante la isquemia y la reperusión

Se ha demostrado que en los inicios de la formación del edema está implicada la participación del canal iónico SUR1-TRPM4 (Simard et al., 2006). En condiciones fisiológicas normales, este canal no se expresa constitutivamente, sin embargo, su expresión aumenta después de una lesión del SNC (Simard et al., 2012b; Woo et al., 2012). Aunque durante la isquemia todas las células de la UNV, incluidas las neuronas, los astrocitos, la microglia, los oligodendrocitos y el EnVC expresan los canales SUR1-TRPM4 (Mehta et al., 2015), es el EnVC que forma la BHE, en donde la expresión del canal cobra importancia estratégica, ya que su activación persistente puede provocar la muerte celular (Sullivan and Harik, 1993; Gerzanich et al., 2009; Loh et al., 2014).

Lo anterior debido a que la apertura prolongada del canal SUR1-TRPM4 permite la entrada excesiva de Na⁺ y el arrastre consecuente de agua a través de las AQP4, lo que resulta en el aumento de volumen y muerte celular por necrosis, alterando la integridad de la BHE (Simard et al., 2012). Esto es reproducible tanto en los modelos

animales (Simard et al., 2006, 2010b; Kurland et al., 2016) como en humanos (Simard et al., 2013; Mehta et al., 2015). Además, concuerda en nuestros modelos con el aumento gradual en el volumen y la muerte celular observada después de la OGD y con la formación del edema después de la MCAO.

Notoriamente, la inhibición de SUR1-TRPM4 mediante glibenclamida en varios modelos preclínicos de isquemia cerebral ha demostrado tener efecto protector sobre la integridad de la BHE al reducir el edema (Simard et al., 2009, 2010a, 2014; Caffes et al., 2015; King et al., 2018). Además, la glibenclamida reformulada para inyección intravenosa, conocida como BIIB093, se ha probado en pacientes con infarto hemisférico grande, demostrando que reduce el edema cerebral y el daño al tejido (Pergakis et al., 2019). Dado que el RSV desplaza a la glibenclamida de su sitio de unión a SUR1, es probable que existan analogías estructurales entre estos compuestos (Hambrock et al., 2007; Ackermann et al., 2009). Por lo tanto, inicialmente hipotetizamos que el RSV tendría la capacidad de bloquear la actividad del receptor SUR1 de manera similar a la glibenclamida e inhibir la formación del edema otorgando protección (Vennekens y Nilius, 2007; Ackermann et al., 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos electrofisiológicos no fueron concluyentes por lo que para demostrar experimentalmente este efecto será necesario realizar ensayos adicionales.

7.3 Regulación de la expresión de SUR1 y el daño a la BHE durante la isquemia y la reperusión

Simard y colaboradores (2006), utilizando un modelo de isquemia cerebral permanente en rata, demostraron que los niveles de ARNm del gen *Abcc8* aumenta 2.5 veces después de 3 h de isquemia y la proteína SUR1 alcanza estos niveles a las 8 h. Así mismo, otros estudios demostraron que 1.5 h de MCAO incrementa la expresión de SUR1 después de 1 h de reperusión en EnVC y después de 3 h en neuronas (Woo et al., 2012).

Acorde con estos estudios, nuestros ensayos mostraron que la expresión de SUR1 se regula transcripcionalmente durante las primeras horas después de la inducción

de isquemia cerebral. En el modelo in vivo observamos que los niveles del ARNm del gen *Abcc8* aumentan rápidamente después de 2 h de MCAO y 30 min de reperfusión mientras que los niveles de proteína SUR1 se encuentran aumentados hasta después de 24 h de reperfusión. De manera similar, en el modelo de OGD observamos que los niveles de proteína aumentan gradualmente desde las 3 h manteniéndose elevados hasta las 24 h de reperfusión en EnVC.

La inhibición de la expresión del gen *Abcc8* previene el daño a la BHE y disminuye la formación del edema cerebral (Gerzanich et al., 2009; Simard et al., 2010b; Loh et al., 2014). Y está ampliamente demostrado que numerosos mecanismos celulares están fuertemente influenciados por el equilibrio redox celular, entre ellos, la expresión génica (Riccio et al., 2006; Valko et al., 2007; Hota et al., 2010). Por lo tanto, sugerimos que el efecto protector del RSV podría deberse a su capacidad de activar o inactivar vías de señalización de manera dependiente de sus propiedades antioxidantes y su habilidad para interactuar directamente con proteínas. Estudios previos apoyan fuertemente esta hipótesis que apunta a que la función del RSV ocurre a través de la inhibición de la expresión de SUR1.

7.4 Función del RSV en la regulación de la expresión de SUR1 mediada por estrés oxidante

El proceso de reperfusión inducida en la práctica clínica (i.e. con el uso de trombolíticos) y en nuestros modelos, coincide con una producción masiva de ERO durante los primeros minutos de la reperfusión (Peters et al., 1998). Por ello, desde el punto de vista terapéutico, el tiempo (inicio de la reperfusión) y la ruta de administración (vía intravenosa) representan un momento estratégico para aplicar compuestos antioxidantes (Aguilera et al., 2010; Levchenkova et al., 2016; Xie et al., 2018). Nosotros hipotetizamos que el mecanismo de regulación génica utilizado por el RSV ocurre contrarrestando las ERO generadas durante el inicio de la reperfusión. Esto es apoyado por la gran capacidad del RSV para capturar $O^{\cdot -}$ la principal ERO producida durante la isquemia y la reperfusión (Gülçin, 2010; Sun et al., 2018; Le et al., 2019). Este efecto fue claramente observado en EnCV, en donde

el RSV previno el incremento en ERO generadas por la OGD.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que una parte sustancial del efecto protector del RSV es atribuible a los cambios en la expresión génica de SUR1 mediada por sus propiedades antioxidantes. En muchos modelos de isquemia cerebral los efectos del RSV son mediados por la proteína sirtuina 1 (SIRT1) (Pineda-Ramírez et al., 2018). El RSV al disminuir el estrés oxidante, incrementa la expresión y actividad de la SIRT1 de manera dependiente de la dosis (Meng et al., 2015). SIRT1 actúa sobre numerosas proteínas como histonas, cinasas y factores de transcripción modulando positiva o negativamente su actividad (Cohen et al., 2012; Pineda-Ramírez et al., 2019). Pero es por este mecanismo, la regulación del estrés oxidante, que el RSV modula una amplia gama de vías de señalización (e.g. producción de óxido nítrico) (Xia et al., 2014).

Recientemente, se ha demostrado que SIRT1 tiene la capacidad de inhibir la actividad de AKT (Kauppinen et al., 2013; Carnevale et al., 2017; Wang et al., 2018). AKT es una proteína cinasa de serina y treonina que juega un papel crítico en el control del equilibrio entre la apoptosis y la supervivencia celular en el contexto de isquemia cerebral (Omori et al., 2002). Así mismo, las ERO generadas durante la isquemia y la reperfusión inducen un aumento considerable en su actividad. Por ejemplo, en modelos in vivo la actividad de P-AKT aumenta desde 1 h manteniéndose activa hasta las 6 h después de la reperfusión (Friguls et al., 2001; Song et al., 2008). A su vez, AKT tiene la capacidad de fosforilar a IKK α e IKK β induciendo la translocación nuclear de NF κ B (Kane et al., 1999), así como fosforilar y activar directamente al factor transcripcional SP1 (Pore et al., 2004). Esto coincide con nuestros hallazgos, ya que observamos que la actividad de AKT se incrementa con el estímulo de OGD y aumenta gradualmente durante la recuperación coincidiendo con la generación de ERO y con la actividad de unión al ADN y localización nuclear de los factores transcripcionales NF κ B y SP1.

De manera notable, el inhibidor específico de AKT disminuye la expresión de SUR1 en EnVC, lo que confirma su participación en este proceso durante la isquemia. De

acuerdo a ese resultado, Kim y Kang, (2017) demostraron en un modelo de estado epiléptico inducido que el 3-indol de cloroacetilo (inhibidor de AKT) disminuye el daño al EnVC y reduce la formación del edema cerebral (Kim y Kang, 2017) Es así que nuestras observaciones sugieren que el RSV tiene la capacidad de disminuir la actividad de AKT en EnVC otorgando protección al prevenir la expresión de SUR1 y la formación del edema.

Sin embargo, el papel de AKT en diferentes modelos de isquemia cerebral es controversial. Contrario a nuestras observaciones, recientemente (Wang y colaboradores, (2019) demostraron que tras un estímulo isquémico de 2 h y 24 h de reperfusión la actividad de AKT se encuentra disminuida. Del mismo modo, Lei y Chen, (2018) demostraron que el RSV incrementa el nivel de P-AKT y de esta forma atenúa el déficit neurológico y disminuye el edema cerebral en ratas sometidas a isquemia; además, estos efectos fueron abolidos por la administración de LY294002, inhibidor de la vía PI3K/AKT. Del mismo, otros estudios han asociado la muerte celular con la disminución de P-AKT y la inactivación de otras vías de supervivencia (Janelidze et al., 2001). Por ejemplo, la disminución de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual protege del daño cerebral inducido por la isquemia aliviando el deterioro cognitivo (Yang et al., 2018). Por lo que en estos estudios sugieren que el incremento en el nivel de P-AKT inducido por RSV después de 24 h podría estar asociado al establecimiento de estas vías.

Este contraste con nuestras observaciones podría explicarse por el tiempo en el que se realizó la evaluación de la actividad de AKT. En el modelo de OGD, nosotros encontramos el incremento en AKT después de 4 h mientras que la mayoría de los estudios evalúan la actividad después 24 h de reperfusión, quizá tiempos muy tardíos para evaluar la actividad de una cinasa. Además, algunos estudios han sugerido una relación entre la fosforilación temprana de AKT y la activación de vías de muerte celular como la escisión de caspasa-9, que es tomada como indicativo de la participación de P-AKT con vías en la muerte celular después de un insulto isquémico (Noshita et al., 2001).

Asimismo, para intentar esclarecer el efecto directo de AKT en la supervivencia celular, se han realizado estudios farmacológicos con wortmannina un inhibidor de la vía PI3K/AKT. Un estudio mostró que este inhibidor, no bloquea la neuroprotección mediada por el BDNF después de una lesión hipóxico-isquémica, lo que indica que AKT no juega un papel crítico en las vías de protección (Han y Holtzman, 2000).

Nuestras observaciones sugieren que en el contexto de isquemia cerebral el RSV podría disminuir el daño a la BHE al regular la expresión de SUR1 atenuando la activación de AKT en EnVC durante las primeras horas de la isquemia y la reperfusión.

7.5 El efecto protector de una dosis única de RSV depende de la capacidad de disminuir el estrés oxidante durante los primeros minutos de la reperfusión

En nuestro estudio utilizamos una dosis única de RSV, que en el modelo *in vivo* fue de 1.9 mg/kg de peso corporal, administrada por vía intravenosa. Esta dosis es varias veces menor a la utilizada en estudios similares la cual oscila entre los 20 y 200 mg/kg de peso corporal; sin embargo, la mayoría de estos estudios lo administran por vía intraperitoneal (Pineda-Ramírez et al., 2018). No obstante, utilizando la tinción con TTC encontramos un fuerte efecto protector, equivalente al de otros estudios (Fang et al., 2015; Pineda-Ramírez et al., 2018; Dou et al., 2019). Esto probablemente se debe a la vía de administración (*i.v.* vs *i.p.* u oral) y a las propiedades farmacocinéticas del RSV (Kapetanovic et al., 2011; Saleh et al., 2014). Es decir, la ruta de administración utilizada por nosotros permite que una mayor cantidad de este compuesto llegue al tejido en su forma activa (trans-resveratrol), antes de ser metabolizado en trans-resveratrol glucoronato y trans-resveratrol sulfato durante el inicio de la reperfusión, el cual es un punto crítico para la generación de ERO (Peters et al., 1998).

Una situación similar se observó con la CUR, un compuesto polifenólico natural con potentes propiedades antioxidantes, y el NAC, un subproducto del glutati6n. Ambos se han utilizado en concentraciones comparables, entre 150 – 300 mg/kg, para

evaluar su efecto protector contra el daño inducido por isquemia (Liu et al., 2014; Huang et al., 2018; Uemura et al., 2018). Con ambos compuestos observamos una disminución en la expresión de SUR1 en concentraciones equimolares al RSV tanto en el modelo *in vivo* como en el modelo *in vitro*, así como la disminución del daño en las células del EnVC. Lo anterior sugiere fuertemente que el mecanismo protector de estos compuestos antioxidantes es compartido por RSV y que la regulación del estado redox celular durante los primeros minutos de la reperfusión es el mecanismo general involucrado en la regulación de la expresión de SUR1.

7.6 El RSV regula la expresión de SUR1 modulando la actividad de factores transcripcionales sensibles a estrés oxidante

Mediante el análisis del promotor del gen *Abcc8*, que codifica para SUR1 encontramos que contiene múltiples sitios de unión para los factores transcripcionales NFκB, HIF-1 y SP1, que son importantes inductores de la expresión de SUR1 y su mecanismo de activación es sensible al estrés oxidante (Hernández-Sánchez et al., 1999; Simard et al., 2006; Woo et al., 2012).

Durante un estímulo isquémico HIF-1 se transloca hacia el núcleo y se incrementa la expresión de SUR en EnVC (Simard et al., 2006, 2009; Woo et al., 2012). Este efecto está asociado a la activación del factor HIF-1 durante periodos de hipoxia (Woo et al., 2012; Zhang et al., 2018). Aunque estos datos apoyan que HIF-1 tiene un papel importante en la activación transcripcional del gen *Abcc8*, la mutación de los sitios de unión a HIF-1 (HRE, inglés *Hypoxia Response Element*) en su promotor no inhibe su expresión (Woo et al., 2012). Sin embargo, la mutación de los sitios de unión al factor transcripcional SP1 inhibe completamente la expresión del *Abcc8*, confirmando que es SP1 y no HIF-1 el responsable directo de la expresión de SUR1 en condiciones de isquemia cerebral. La inducción de la transcripción del gen *Abcc8* requiere la activación secuencial de HIF-1 y de SP1, es decir, la respuesta inicial de HIF-1 durante la hipoxia involucra el aumento en la expresión de SP1. Siendo la actividad de este último el cual funciona como efector secundario, pero que actúa directamente en el promotor de SUR1 (Woo et al., 2012). Además, esto es apoyado por estudios que han demostrado que SP1 estimula la expresión de SUR1 de

manera dependiente de la concentración (Ashfield y Ashcroft, 1998; Hernández-Sánchez et al., 1999). Nuestras observaciones en EnVC sometido a OGD coinciden con este proceso. Por un lado, encontramos que la translocación nuclear y actividad de unión de HIF-1 aumentan durante el estímulo hipóxico y se mantiene elevado brevemente durante la recuperación (15 a 30 min). Mientras que observamos un aumento en la translocación nuclear y en la actividad de unión al ADN del factor SP1 ocurre durante la recuperación (1 a 4 h).

Por otro lado, se sabe que SP1 aumenta su actividad de unión al ADN de manera notable en condiciones de estrés oxidante (Simard et al., 2006; Hota et al., 2010), lo que sugiere que compuestos antioxidantes podrían regular su actividad. En este sentido, Simard y colaboradores (2006) demostraron que la translocación nuclear de SP1 es evidente después de 1 h de MCAO en células que registran un aumento en la expresión de SUR1. Este hecho coincide con nuestros resultados en el modelo de MCAO, en donde observamos que la actividad de unión al ADN de SP1 se encuentra incrementada desde la isquemia y se mantiene durante los primeros minutos de la reperfusión; por lo tanto, es posible que la cantidad de SP1 basal sea regulado por el estado redox celular.

También demostramos que el RSV reduce la actividad de unión al ADN de SP1 en EnVC. Este efecto inhibitorio puede deberse a la actividad antioxidante del RSV, ya que nuestro tratamiento disminuye los niveles de ERO. Sin embargo, igualmente podría estar asociado a la capacidad del RSV de interactuar directamente con SP1 inhibiendo su actividad (Lee et al., 2012).

Además, observamos que la mitramicina "A", un inhibidor específico de SP1 disminuye la expresión de SUR1 y previene la muerte celular por necrosis en las células de EnVC expuestas a OGD. Por lo tanto, la disminución de la expresión de SUR1 a través de la inhibición de SP1 por el RSV podría ser un mecanismo protector involucrado.

7.7 El factor de transcripción NF κ B y la expresión de SUR1 durante el proceso inflamatorio en la isquemia cerebral

La isquemia cerebral desencadena eventos secundarios de daño como el proceso inflamatorio el cual ocurren dentro de las primeras 24 h del inicio del accidente cerebrovascular. Una vez activados, citocinas pro-inflamatorias conducen a la activación de la microglia, la célula inmune residente del cerebro o los astrocitos. A su vez, la microglia produce citocinas pro-inflamatorias, complicando el cuadro isquémico (Kawabori y Yenari, 2015).

El factor NF κ B se asocia en gran medida con el inicio de respuestas inflamatorias y es un contribuyente clave del daño secundario de la isquemia cerebral (Baeuerle, 1994). En muestras de cerebro humano post mortem de pacientes con isquemia cerebral, NF κ B se ha encontrado activo alrededor del núcleo isquémico hasta 24 h después de iniciado el daño (Nurmi et al., 2004). En condiciones basales, NF κ B se encuentra en el citosol anclado a I κ B. La hiperfosforilación de I κ B por las quinasas IKK α e IKK β favorece su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal, liberando a NF κ B y permitiendo su translocación hacia el núcleo (McInnis et al., 2002). El estrés oxidante activa/inactiva a las cinanas IKK α y IKK β (Kamata y Hirata, 1999); en consecuencia, la actividad de NF κ B responde a los cambios en el estado REDOX del citoplasma y se transloca al núcleo en respuesta el estrés oxidante celular (Li et al., 2011). Se ha demostrado que la isquemia cerebral provoca una rápida disminución de los niveles citoplasmáticos de I κ B y un aumento de los niveles nucleares de NF κ B. Este efecto es apreciable desde las 3 h manteniéndose así hasta 24 h después de iniciado el insulto isquémico (Xu et al., 2012).

El promotor del gen *Abcc8* contiene múltiples sitios de unión a NF κ B lo que nos sugirió que SUR1 podría estar aumentado en un contexto inflamatorio. De manera interesante, el inicio de procesos inflamatorios en EnVC después de un estímulo isquémico, promueve aumento del volumen celular y el desprendimiento de la membrana basal subyacente, lo que lleva a comprometer su función. Esto conduce

a un aumento de la permeabilidad de la BHE que causa extravasación de proteínas, edema intersticial y la extravasación de células inmunes (Kawabori y Yenari, 2015).

La utilización de inhibidores de NF κ B (e.g. cefalexina y micofenolato) reducen el daño a la BHE, el edema cerebral y mejora la función neuroconductual en modelos animales de isquemia cerebral (Song et al., 2019; Ali et al., 2020). Así mismo, la mutación en el gen de la cinasa IKK después de 2 h de isquemia y 24 h de reperusión, disminuye el daño tisular y mejora el estado neurológico de ratones (Xu et al., 2002). Además, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) una citosina pro-inflamatoria que se libera durante la isquemia, aumenta significativamente el nivel de ERO en el EnVC (Christov et al., 2004). El TNF α es un activador canónico de NF κ B, que también aumenta la expresión de SUR1 en EnVC (Simard et al., 2009).

Por otro lado, el tratamiento con RSV tiene un efecto terapéutico contra el daño tisular en diferentes modelos de isquemia cerebral, probablemente mediado no solo por su capacidad antioxidante sino también por efecto en la respuesta inflamatoria (Xie et al., 2019). Nuestros hallazgos indican que el RSV disminuye la actividad de unión de NF κ B al ADN en las células del EnVC sometidas a OGD, y la administración de un inhibidor específico de NF κ B reduce la expresión de SUR1, aumenta la viabilidad celular y disminuye la muerte celular por necrosis. Todos estos datos apoyan que NF κ B participa en la formación del edema cerebral probablemente a través de la regulación de SUR1 entre otros mecanismos y que el RSV previene su activación.

7.8 Participación otras proteínas involucradas en el daño a la BHE y la formación del edema y su regulación por RSV

El aumento en la expresión de AQP4 en cerebro promueve su ensamblaje con SUR1-TRPM4, siendo el heterocomplejo macromolecular resultante, responsable del edema celular en los astrocitos, el cual contribuye de manera importante al edema cerebral (Stokum et al., 2018). Por lo tanto, la disminución en el edema cerebral observada con el tratamiento con RSV puede deberse no solo a la reducción de la expresión de SUR1, sino también a la disminución en la expresión

de AQP4 en los astrocitos observada en nuestros experimentos.

Por otro lado, las metaloproteinasas de la matriz (MMP) de manera fisiológica participan en la producción de nuevos vasos sanguíneos, así como en la cicatrización a través de la degradación de proteínas de la matriz extracelular; de esta manera el proceso contribuye a la migración, proliferación y la diferenciación celular (Nagase et al., 2006). Sin embargo, durante la isquemia cerebral las MMP9 se sobre-expresan participando en la degradación de las proteínas de unión estrecha entre las células del EnVC, contribuyendo al daño a la BHE (Roach et al., 2002; Wei et al., 2015; Zeng et al., 2018). Durante este proceso, también el desequilibrio en la expresión de MMP-9 y su inhibidor (TIMP-1) es responsable de del daño a la BHE (Roach et al., 2002). Se ha demostrado que ratones Knock-out para la MMP9 muestran una reducción en el daño al tejido y en la formación del edema cerebral (Wang et al., 2003). Así mismo, tanto RSV como CUR inhiben la expresión de MMP9 y mitigan el daño a la BHE después del accidente cerebrovascular isquémico. Y se ha sugerido que el RSV podría mejorar el equilibrio de MMP-9/TIMP-1 en términos de su expresión y actividad (Wei et al., 2015; Li et al., 2017). Acorde con estos estudios, encontramos que el RSV reduce la extravasación de azul de Evans, lo que confirma que el tratamiento previene el daño a la BHE. Por lo tanto, la participación del RSV en la formación del edema podría estar asociada con diferentes mecanismos, incluida la regulación de proteínas que afectan directamente la integridad de la BHE como las MMPs.

Finalmente, la expresión y función de TRPM4 también son regulados en células de la UNV en modelos experimentales de accidente cerebrovascular en ratas (Gerzanich et al., 2009; Loh et al., 2014; Mehta et al., 2015; Chen et al., 2019). La inyección de un anticuerpo que reconoce y bloquea TRPM4 después de la isquemia y la reperusión en ratas reduce la mortalidad, el infarto y la extravasación del azul de Evans (Chen et al., 2019). Dado que la expresión SUR1 también influye en la función TRPM4, el tratamiento con RSV podría reducir el daño a través de la inhibición de la actividad del canal SUR1-TRPM4.

VIII. CONCLUSIÓN

SUR1 es una proteína que modula la actividad del canal iónico TRPM4, el cual juega un papel importante en el daño a la BHE y cuya función está asociada a la formación del edema en las etapas iniciales de la isquemia cerebral. El RSV previene el incremento en la expresión de SUR1 inducido durante la isquemia y a su vez disminuye las consecuencias del edema cerebral, aumenta la supervivencia y mejora la función motora después de un insulto isquémico. Es por ello, que el RSV se muestra como un fármaco capaz de prevenir el daño por isquemia. Nuestros hallazgos sugieren que la expresión de SUR1 por efecto del RSV está asociado con su capacidad antioxidante al regular la vía AKT/SP1-NFκB. Es necesario identificar con precisión el mecanismo de acción del RSV, ya que la investigación adicional en este campo puede contribuir a explorar enfoques terapéuticos para el tratamiento del edema en la isquemia cerebral, particularmente dirigido a contrarrestar la formación del al edema iónico en etapas tempranas.

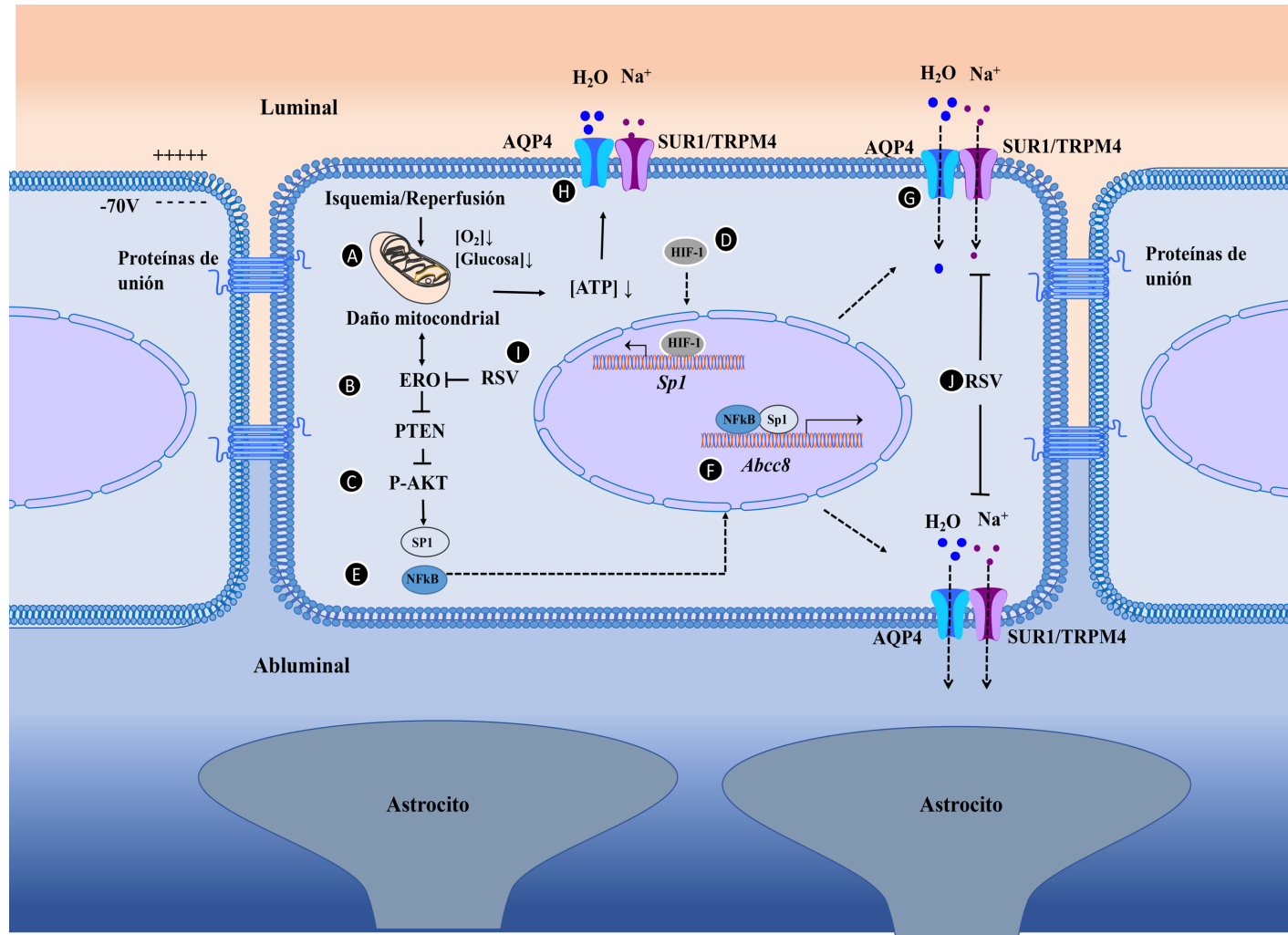


Figura 35. Mecanismo molecular de acción del resveratrol (RSV) en la prevención de formación del edema cerebral. Representación esquemática del efecto del RSV en la inhibición de la formación del edema y la conversión a hemorragia. **(A) Colapso energético durante la isquemia.** La disminución en las concentraciones de oxígeno (O₂) y glucosa durante la isquemia cerebral provoca el colapso del metabolismo energético y la disminución de sustratos energéticos, afectando la cadena de transporte de electrones mitocondrial. **(B) Reperfusión y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).** El retorno del flujo sanguíneo provoca que los electrones acumulados en la membrana interna mitocondrial interactúen con el O₂ generando ERO, y dañando a la mitocondria. **(C) Activación de la proteína cinasa B (AKT) por efecto de las ERO.** Las ERO generadas durante la reperfusión, inactiva a la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) la cual inhibe a AKT. La inhibición de PTEN induce un aumento en AKT activa (P-AKT). **(D) Estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF-1).** La hipoxia estabiliza a HIF-1, e induce la transcripción de la proteína específica 1 (SP1). **(E) Activación SP1 y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB).** AKT activa por fosforilación a SP1 y NFκB. **(F) Transcripción del gen *Abcc8*.** La unión de SP1 y NFκB al promotor de *Abcc8* favorece su transcripción. **(G) Transducción del transcriptoma.** El ARNm del gen *Abcc8* se traduce a la proteína SUR1 la cual se ensambla con el receptor de potencial transitorio de potencial a melastatina (TRPM4) y acuaporina 4 (AQP4) permitiendo su tráfico a la membrana celular. **(H) El daño mitocondrial.** La disminución en las concentraciones de ATP favorece la apertura del canal SUR1-TRPM4-AQP4 permitiendo la entrada de sodio (Na⁺) y agua al espacio intracelular (edema iónico). **(I) El RSV disminuye las ERO generadas durante la reperfusión.** Las propiedades antioxidantes del RSV inhiben la vía ERO/P-AKT/SP1-NFκB disminuyendo la expresión de SUR1. **(J) El RSV inhibe la actividad del canal SUR1-TRPM4-AQP4.** Las propiedades estructurales del RSV permiten la unión de este compuesto a la proteína SUR1 inhibiendo su actividad.

VIII. REFERENCIAS

- Ackermann S, Hiller S, Osswald H, Lo M, Grenz A, Hambrock A (2009) β -Estradiol Modulates Apoptosis in Pancreatic β -Cells by Specific Involvement of the Sulfonylurea Receptor (SUR) isoform SUR1*. *Diabetes* 58:4905–4913.
- Aguilar-Bryan L, Clement IV JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of K(ATP) channels. *Physiol Rev* 78:227–245.
- Aguilar-Bryan L, Nichols C, Wechsler S, Clement J, Boyd A, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson D (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* (80-) 268:423–426
- Aguilera P, Chanez-Cardenas ME, Ortiz-Plata A, Leon-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, Villeda-Hernandez J, Sanchez-Garcia A, Maldonado PD (2010) Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine* 17:241–247.
- Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, De Wet H, Proks P, Ashcroft FM (2009) SUR1: A unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:257–267.
- Ali A, Shah FA, Zeb A, Malik I, Alvi AM, Alkury LT, Rashid S, Hussain I, Ullah N, Khan AU, Koh PO, Li S (2020) NF- κ B Inhibitors Attenuate MCAO Induced Neurodegeneration and Oxidative Stress—A Reprofiling Approach. *Front Mol Neurosci* 13:1–14.
- Alluri H, Stagg HW, Wilson RL, Clayton RP, Sawant DA, Koneru M, Beeram MR, Davis ML, Tharakan B (2014) Reactive oxygen species-caspase-3 relationship in mediating blood-brain barrier endothelial cell hyperpermeability following oxygen-glucose deprivation and reoxygenation. *Microcirculation* 21:187–195.
- Ämmälä C, Moorhouse A, Ashcroft FM (1996) The sulphonylurea receptor confers diazoxide sensitivity on the inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.1 expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 494:709–714.
- Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C (2012) Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 158:182–193
- Andrade S, Ramalho MJ, Pereira MDC, Loureiro JA (2018) Resveratrol brain delivery for neurological disorders prevention and treatment. *Front Pharmacol* 9:1–19.
- Arango Davila C, Escobar MI, Buriticá E, Pimienta H (2008) Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental: una visión experimental y su correlato clínico. *Colomb med* 39:85–94.
- Ashfield R, Ashcroft SJH (1998) Cloning of the promoters for the β -cell ATP-sensitive K-channel subunits Kir6.2 and SUR1. *Diabetes* 47:1274–1280.
- Baeuerle PA (1994) Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System. *Annu Rev Immunol* 12:141–179.
- Bai G, Norton DD, Prenger MS, Kusiak JW (1998) Single-stranded DNA-binding proteins and neuron-restrictive silencer factor participate in cell-specific transcriptional control of the NMDAR1 gene. *J Biol Chem* 273:1086–1091.

- Bano D, Nicotera P (2007) Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 38:674–676.
- Batthey TWK, Karki M, Singhal AB, Wu O, Sadaghiani S, Campbell BCV, Davis SM, Donnan GA, Sheth KN, Kimberly WT (2014) Brain edema predicts outcome after nonlacunar ischemic stroke. *Stroke* 45:3643–3648.
- Bell BA, Symon L, Branston NM (1985) CBF and time thresholds for the formation of ischemic cerebral edema, and effect of reperfusion in baboons. *J Neurosurg* 62:31–41.
- Berrouschot J, Sterker M, Bettin S, Köster J, Schneider D (1998) Mortality of space-occupying ('malignant') middle cerebral artery infarction under conservative intensive care. *Intensive Care Med* 24:620–623.
- Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo EH (2008) Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci* 29:268–275.
- Bhaskar S, Stanwell P, Cordato D, Attia J, Levi C (2018) Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: Dawn of a new era? *BMC Neurol* 18:1–26.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5:9–19.
- Boocock DJ, Faust GES, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE (2007) Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:1246–1252.
- Bouwman P, Philipsen S (2002) Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195:27–38.
- Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, Vasilinin G, Sen A, Schinas AM, Piccirilli G, Brown K, Steward WP, Gescher AJ, Brenner DE (2010) Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: Safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res* 70:9003–9011.
- Caffes N, Kurland DB, Gerzanich V, Marc Simard J (2015) Glibenclamide for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Int J Mol Sci* 16:4973–4984.
- Carnevale I, Pellegrini L, D'Aquila P, Saladini S, Lococo E, Polletta L, Vernucci E, Foglio E, Coppola S, Sansone L, Passarino G, Bellizzi D, Russo MA, Fini M, Tafani M (2017) SIRT1-SIRT3 Axis Regulates Cellular Response to Oxidative Stress and Etoposide.
- Cash TP, Pan Y, Simon MC (2007) Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med* 43:1219–1225
- Chen B, Gao Y, Wei S, Low SW, Ng G, Yu D, Tu TM, Soong TW, Nilius B, Liao P (2019) TRPM4-specific blocking antibody attenuates reperfusion injury in a rat model of stroke. *Pflugers Arch Eur J Physiol*:1455–1466.
- Chen C, Hu Q, Yan J, Yang X, Shi X, Lei J, Chen L, Huang H, Han J, Zhang JH, Zhou C (2009) Early inhibition of HIF-1 α with small interfering RNA reduces ischemic-reperfused brain injury in rats. *Neurobiol Dis* 33:509–517
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027–36031.

- Chetram MA, Bethea DA, Odero-Marrah VA, Don-Salu-Hewage AS, Jones KJ, Hinton C V. (2013) ROS-mediated activation of AKT induces apoptosis via pVHL in prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem* 376:63–71
- Cho IS, Jung M, Kwon KS, Moon E, Cho JH, Yoon KH, Kim JW, Lee YD, Kim SS, Suh-Kim H (2012) Dereglulation of CREB signaling pathway induced by chronic hyperglycemia downregulates NeuroD transcription. *PLoS One* 7.
- Christov A, Ottman JT, Grammas P (2004) Vascular inflammatory, oxidative and protease-based processes: Implications for neuronal cell death in Alzheimer's disease. *Neurol Res* 26:540–546.
- Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF (1996) Cloning, Tissue Expression, and Chromosomal Localization of SUR2, the Putative Drug-Binding Subunit of Cardiac, Skeletal Muscle, and Vascular KATP Channels. *Diabetes* 45:1439–1445
- Cohen DE, Cui L, Supinski A, Savas JN, Mazzulli JR, Yates JR, Bordone L, Guarente L, Krainc D (2012) Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat Med* 18:159–165
- Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudoux JL (2014) Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res* 58:7–21.
- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS (2004) Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 82:614–619.
- Deng YY, C SF, Xie D, Han Q., Fang M, Chen C., Zeng H. (2016) Progress in Drug Treatment of Cerebral Edema. *Mini Rev Med Chem* 16:917–925.
- Desilles J-P, Rouchaud A, Labreuche J, Meseguer E, Laissy J-P, Serfaty J-M, Lapergue B, Klein IF, Guidoux C, Cabrejo L, Sirimarco G, Lavallee PC, Claeys ES, Amarenco P, Mazighi, M. (2013) Blood-brain barrier disruption is associated with increased mortality after endovascular therapy. *Neurology* 80:844–851
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26:248–254.
- Dou Z, Rong X, Zhao E, Zhang L, Lv Y (2019) Neuroprotection of Resveratrol Against Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice Through a Mechanism Targeting Gut-Brain Axis. *Cell Mol Neurobiol* 39:883–898
- Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179–197.
- Fan W, Cooper NGF (2009) Glutamate-Induced NFκB Activation in the Retina. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 50:917
- Fang L, Gao H, Zhang W, Zhang W, Wang Y (2015) Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int J Clin Exp Med* 8:3219–3226.
- Fong GH, Takeda K (2008) Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* 15:635–641.
- Friguls B, Justicia C, Pallàs M, Planas AM (2001) Focal cerebral ischemia causes two temporal waves of Akt activation. *Neuroreport* 12:3381–3384.
- Frombaum M, Le Clanche S, Thérond P, Nubret E, Bonnefont-Rousselot D,

- Borderie D (2012) Penetration of resveratrol into bovine aortic endothelial cells (BAEC): A possible passive diffusion. *Comptes Rendus - Biol* 335:247–252.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: Statistical validation. *Stroke* 26:627–634.
- Gerzanich V, Woo SK, Vennekens R, Tsymbalyuk O, Ivanova S, Ivanov A, Geng Z, Chen Z, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M, Simard JM (2009) De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. *Nat Med* 15:185–191.
- Gorogawa SI, Fujitani Y, Kaneto H, Hazama Y, Watada H, Miyamoto Y, Takeda K, Akira S, Magnuson MA, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Hori M (2004) Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic β -cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1159–1170.
- Goyal M et al. (2016) Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 387:1723–1731.
- Granger DN, Kvietys PR (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6:524–551 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>.
- Grivennikova VG, Vinogradov AD (2013) Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochem* 78:1490–1511.
- Guinamard R, Paulais M, Lourdel S, Teulon J (2012) A calcium-permeable non-selective cation channel in the thick ascending limb apical membrane of the mouse kidney. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1818:1135–1141
- Gülçin I (2010) Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov Food Sci Emerg Technol* 11:210–218.
- Gullo D, Rabuazzo AM, Vetri M, Gatta C, Vinci C, Buscema M, Vigneri R, Purrello F (1991) Chronic exposure to glibenclamide impairs insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 14:287–291.
- Gupta A, Anjomani-Virmouni S, Koundouros N, Dimitriadi M, Choo-Wing R, Valle A, Zheng Y, Chiu YH, Agnihotri S, Zadeh G, Asara JM, Anastasiou D, Arends MJ, Cantley LC, Poulogiannis G (2017) PARK2 Depletion Connects Energy and Oxidative Stress to PI3K/Akt Activation via PTEN S-Nitrosylation. *Mol Cell* 65:999-1013.e7
- Guzik A, Bushnell C (2017) Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. *Contin Lifelong Learn Neurol* 23:15–39.
- Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, Von Kummer R (1996) “Malignant” middle cerebral artery territory infarction: Clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol* 53:309–315.
- Hambrock A, Franz CBDO, Hiller S, Grenz A, Ackermann S, Schulze DU, Drews G, Osswald H (2007) Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J Biol Chem* 282:3347–3356.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches, 85–100. *tigers Archiv Improved Patch-Clamp Tech.* 391:85–100.

- Han BH, Holtzman DM (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 20:5775–5781.
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnbäck L (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: Aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int* 37:317–329.
- Hardingham GE (2009) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 37:1147–1160
- Hardingham GE (2010) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. 37:1147–1160.
- Hernández-Abrego A, Vázquez-Gómez E, García-Colunga J (2018) Effects of the antidepressant mirtazapine and zinc on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurosci Lett* 665:246–251
- Hernández-Sánchez C, Ito Y, Ferrar J, Reitman M, LeRoith D (1999) Characterization of the mouse sulfonylurea receptor 1 promoter and its regulation. *J Biol Chem* 274:18261–18270.
- Hernandez-Sanchez C, Ito Y, Ferrer J, Reitman M, LeRoith D (1999) Characterization of the mouse sulfonylurea receptor 1 promoter and its regulation. *J Biol Chem* 274:18261–18270
- Hernández-Sánchez C, Wood TL, LeRoith D (1997) Developmental and Tissue-Specific Sulfonylurea Receptor Gene Expression. *Endocrinology* 138:705–711
- Hota SK, Hota KB, Prasad D, Ilavazhagan G, Singh SB (2010) Oxidative-stress-induced alterations in Sp factors mediate transcriptional regulation of the NR1 subunit in hippocampus during hypoxia. *Free Radic Biol Med* 49:178–191.
- Huang L, Chen C, Zhang X, Li X, Chen Z, Yang C, Liang X, Zhu G, Xu Z (2018) Neuroprotective Effect of Curcumin Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Via Mediating Autophagy and Inflammation. *J Mol Neurosci* 64:129–139.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) A Novel Sulfonylurea Receptor Forms with BIR (Kir6.2) a Smooth Muscle Type ATP-sensitive K⁺ Channel. *J Biol Chem* 271:24321–24324
- Janelidze S, Hu BR, Siesjö P, Siesjö BK (2001) Alterations of Akt1 (PKB α) and p70S6K in transient focal ischemia. *Neurobiol Dis* 8:147–154.
- Johnson WD, Morrissey RL, Osborne AL, Kapetanovic I, Crowell JA, Muzzio M, McCormick DL (2011) Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. *Food Chem Toxicol* 49:3319–3327
- Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11:1–14.
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999) Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9:601–604.
- Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL (2011) Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 68:593–601.
- Karschin C, Ecke C, Ashcroft FM, Karschin A (1997) Overlapping distribution of K(ATP) channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in

- rodent brain. *FEBS Lett* 401:59–64 Available at:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01438-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01438-X).
- Kaulmann D, Hermsdörfer J, Johannsen L (2017) Disruption of right posterior parietal cortex by continuous Theta Burst Stimulation alters the control of body balance in quiet stance. *Eur J Neurosci* 45:671–678.
- Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A (2013) Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* 25:1939–1948 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.007>.
- Kawabori M, Yenari M (2015) Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Curr Med Chem* 22:1258–1277
- Kawaki J, Nagashima K, Tanaka J, Miki T, Miyazaki M, Gono T, Mitsuhashi N, Nakajima N, Iwanaga T, Yano H, Seino S (1999) Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Diabetes* 48:2001–2006.
- Kim J-W, Seghers V, Cho J-H, Kang Y, Kim S, Ryu Y, Baek K, Aguilar-Bryan L, Lee Y-D, Bryan J, Suh-Kim H (2002) Transactivation of the mouse sulfonylurea receptor I gene by BETA2/NeuroD. *Mol Endocrinol* 16:1097–1107 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981044>.
- Kim JE, Kang TC (2017) TRPC3- and ETB receptor-mediated PI3K/AKT activation induces vasogenic edema formation following status epilepticus. *Brain Res* 1672:58–64
- King ZA, Sheth KN, Kimberly WT, Simard JM (2018) Profile of intravenous glyburide for the prevention of cerebral edema following large hemispheric infarction: Evidence to date. *Drug Des Devel Ther* 12:2539–2552.
- Kitayama J, Kitazono T, Yao H, Ooboshi H, Takaba H, Ago T, Fujishima M, Ibayashi S (2001) Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger reduces infarct volume of focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 922:223–228.
- Kovács T, Kun L, Schmelczer M, Wagner L, Davin JC, Nagy J (1996) Do Intestinal Hyperpermeability and the Related Food Antigens Play a Role in the Progression of IgA Nephropathy? I. Study of Intestinal Permeability. *Am J Nephrol* 16:500–505.
- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018) Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018:465–468.
- Kurland DB, Gerzanich V, Karimy JK, Woo SK, Vennekens R, Freichel M, Nilius B, Bryan J, Simard JM (2016) The Sur1-Trpm4 channel regulates NOS2 transcription in TLR4-activated microglia. *J Neuroinflammation*:1–23
- Kurland DB, Khaladj-Ghom A, Stokum JA, Carusillo B, Karimy JK, Gerzanich V, Sahuquillo J, Simard JM (2015) Complications Associated with Decompressive Craniectomy: A Systematic Review. *Neurocrit Care* 23:292–304.
- Laming PR (2000) Potassium signalling in the brain: Its role in behaviour. *Neurochem Int* 36:271–290.
- Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH (2004) Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 114:512–520.
- Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP (2002)

- TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109:397–407.
- Le K, Chibaatar Daliv E, Wu S, Qian F, Ali AI, Yu D, Guo Y (2019) SIRT1-regulated HMGB1 release is partially involved in TLR4 signal transduction: A possible anti-neuroinflammatory mechanism of resveratrol in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Int Immunopharmacol* 75:105779
- Lecrux C, Hamel E (2011) The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol* 203:47–59.
- Lee CS, Sund NJ, Behr R, Herrera PL, Kaestner KH (2005) Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic α -cells. *Dev Biol* 278:484–495.
- Lee KA, Lee YJ, Ban JO, Lee YJ, Lee SH, Cho MK, Nam HS, Hong JT, Shim JH (2012) The flavonoid resveratrol suppresses growth of human malignant pleural mesothelioma cells through direct inhibition of specificity protein 1. *Int J Mol Med* 30:21–27.
- Lei J, Chen Q (2018) Resveratrol attenuates brain damage in permanent focal cerebral ischemia via activation of PI3K/Akt signaling pathway in rats. *Neurol Res* 40:1014–1020 Available at: <https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1509826>.
- Levchenkova OS, Novikov VE, Parfenov EA, Kulagin KN (2016) Neuroprotective Effect of Antioxidants and Moderate Hypoxia as Combined Preconditioning in Cerebral Ischemia. *Bull Exp Biol Med* 162:211–214
- Li L, He S, Sun JM, Davie JR (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82:460–471.
- Li L, Shen L, She H, Yue S, Feng D, Luo Z (2011) Nitric oxide-induced activation of NF- κ B-mediated NMDA-induced CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha expression inhibition in A549 cells. *Cell Biol Toxicol* 27:41–47.
- Li W, Li P, Hua Q, Hou J, Wang J, Du H, Tang H, Xu Y (2009) The impact of paracrine signaling in brain microvascular endothelial cells on the survival of neurons. *Brain Res* 1287:28–38
- Li W, Suwanwela NC, Patumraj S (2017) Curcumin prevents Reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression. *Mol Med Rep* 16:4710–4720.
- Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM (2007) Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* 22:1–9 Available at: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.08-2555>.
- Liss B, Roeper J (2001) Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (Review). *Mol Membr Biol* 18:117–127.
- Liu L, Zhang W, Wang L, Li Y, Tan B, Lu X, Deng Y, Zhang Y, Guo X, Mu J, Yu G (2014) Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis. *Neurochem Res* 39:1322–1331.
- Liu M, Pleasure SJ, Collins AE, Noebels JL, Naya FJ, Tsai MJ, Lowenstein DH (2000) Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:865–870.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Loh KP, Ng G, Yu CY, Fhu CK, Yu D, Vennekens R, Nilius B, Soong TW, Liao P

- (2014) TRPM4 inhibition promotes angiogenesis after ischemic stroke. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 466:563–576.
- Loh KY, Wang Z, Liao P (2018) Oncotic Cell Death in Stroke. In: Review in physiological Biochemistry Pharmacology, pp 37–64 Available at: http://link.springer.com/10.1007/112_2018_13.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84–91.
- Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J (2011) Comparison Evans Blue injection routes: intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood–brain barrier in a mice hemorrhage model. *Animals* 195:206–210.
- Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC (2009) Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11:2685–2700
- Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T, Ueda K (2000) Different Binding Properties and Affinities for ATP and ADP among Sulfonylurea Receptor Subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *J Biol Chem* 275:28757–28763 Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M004818200>.
- McInnis J, Wang C, Anastasio N, Hultman M, Ye Y, Salvemini D, Johnson KM (2002) The role of superoxide and nuclear factor- κ B signaling in N-Methyl-D-aspartate-induced necrosis and apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 301:478–487.
- McManus ML, Soriano SG (1998) Rebound swelling of astroglial cells exposed to hypertonic mannitol. *Anesthesiology* 88:1586–1591.
- Mehta RI, Tosun C, Ivanova S, Tsymbalyuk N, Famakin BM, Kwon MS, Castellani RJ, Gerzanich V, Simard JM (2015) Sur1-Trpm4 Cation Channel Expression in Human Cerebral Infarcts. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:835–849
- Meng Z, Li J, Zhao H, Liu H, Zhang G, Wang L, Hu H, Li D, Liu M, Bi F, Wang X, Tian G, Liu Q, Buren B (2015) Resveratrol relieves ischemia-induced oxidative stress in the hippocampus by activating SIRT1. *Exp Ther Med* 10:525–530.
- Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki JI, Seino S (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10402–10406.
- Miller AF (2012) Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* 586:585–595.
- Morgan MJ, Liu ZG (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21:103–115
- Mori K, Miyazaki M, Iwase H, Maeda M (2002) Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion (Na⁺, K⁺) concentrations after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. *J Neurotrauma* 19:1261–1270.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181–198
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1–13.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562–573.

- Nakamichi N, Yoneda Y (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca²⁺ for drug development: Desensitization of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *J Pharmacol Sci* 97:348–350.
- Neeley WL, Essigmann JM (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* 19:491–505.
- Nguyen TL, Durán R V. (2016) Prolyl hydroxylase domain enzymes and their role in cell signaling and cancer metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 80:71–80 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.026>.
- Nguyen TS, Winn HR, Janigro D (2000) ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 278:878–885.
- Nicholls DG, Ward (2000a) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. 23:166–174
- Nicholls DG, Ward MW (2000b) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23:166–174.
- Nichols CG (2016) Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Currents in Heart Disease and Cardioprotection. *Card Electrophysiol Clin* 8:323–335
- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278:30813–30820.
- Norenberg MD (1994) Astrocyte Responses to CNS Injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:213–220
- Noshita N, Lewén A, Sugawara T, Chan PH (2001) Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1442–1450.
- Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, Zhang W, Juettler E, Karjalainen-Lindsberg ML, Weih F, Frank N, Schwaninger M, Koistinaho J (2004) Nuclear Factor-κB Contributes to Infarction after Permanent Focal Ischemia. *Stroke* 35:987–991.
- O'Donnell ME (2014) Blood-brain barrier Na transporters in ischemic stroke. *Adv Pharmacol* 71:113–146.
- Ohno-Shosaku T, Yamamoto C (1992) Identification of an ATP-sensitive K⁺ channel in rat cultured cortical neurons. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 422:260–266.
- Omori N, Jin G, Li F, Zhang WR, Wang SJ, Hamakawa Y, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K (2002) Enhanced phosphorylation of PTEN in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 954:317–322.
- Partridge CJ, Beech DJ, Sivaprasadarao A (2001) Identification and Pharmacological Correction of a Membrane Trafficking Defect Associated with a Mutation in the Sulfonylurea Receptor Causing Familial Hyperinsulinism. *J Biol Chem* 276:35947–35952.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2007th ed. Pergakis M, Badjatia N, Chaturvedi S, Cronin CA, Kimberly WT, Sheth KN, Simard JM (2019) BIIB093 (IV glibenclamide): an investigational compound for the prevention and treatment of severe cerebral edema. *Expert Opin Investig Drugs* 0:1
- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased Formation of Reactive Oxygen Species After Permanent and

- Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196–205
- Pineda-Ramírez N, Alquisiras-Burgos I, Ortiz-Plata A, Ruiz-Tachiquín ME, Espinoza-Rojo M, Aguilera P (2019) Resveratrol Activates Neuronal Autophagy Through AMPK in the Ischemic Brain. *Mol Neurobiol*.
- Pineda-Ramírez N, Gutiérrez Aguilar GF, Espinoza-Rojo M, Aguilera P (2017) Current evidence for AMPK activation involvement on resveratrol-induced neuroprotection in cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* 0:1–19
- Pineda-Ramírez N, Gutiérrez Aguilar GF, Espinoza-Rojo M, Aguilera P (2018) Current evidence for AMPK activation involvement on resveratrol-induced neuroprotection in cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* 21:229–247
- Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME (2012) The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochem Biophys* 527:67–73.
- Pore N, Liu S, Shu H-K, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiat J, Pages G, O'Rourke DM, Bernhard E, Maity A (2004) Sp1 Is Involved in Akt-mediated Induction of VEGF Expression through an HIF-1-independent Mechanism. *Mol Biol Cell* 15:4841–4853
- Priya A, Johar K, Wong-Riley MTT (2013) Specificity protein 4 functionally regulates the transcription of NMDA receptor subunits GluN1, GluN2A, and GluN2B. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833:2745–2756
- Pusch M, Neher E (1988) Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Trans Int Astron Union* 411:204–211.
- R. Neves A, Lucio M, L.C. Lima J, Reis S (2012) Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Curr Med Chem* 19:1663–1681.
- Rasband WS (1997) ImageJ. U S Natl Institutes Heal Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS (2018) Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:1428–1447.
- Reeve EB (2006) The contribution of I 131-labeled proteins to measurements of blood volume. *Ann N Y Acad Sci* 70:137–147
- Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, Chin DJ, Gil G, Brown MS, Goldstein JL, Luskey KL (1984) HMG CoA reductase: A negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell* 38:275–285.
- Riccio A, Alvania RS, Lonze BE, Ramanan N, Kim T, Huang Y, Dawson TM, Snyder SH, Ginty DD (2006) A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* 21:283–294.
- Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 109:95–104.
- Risher WC, Andrew RD, Kirov SA (2009) Real-time passive volume responses of astrocytes to acute osmotic and ischemic stress in cortical slices and in vivo revealed by two-photon microscopy. *Glia* 57:207–221.
- Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA (2002) Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen

- during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23:260–269.
- Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED (2001) A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 32:2648–2657.
- Saleh MC, Connell BJ, Rajagopal D, Khan B V., Abd-El-Aziz AS, Kucukkaya I, Saleh TM (2014) Co-administration of resveratrol and lipoic acid, or their synthetic combination, enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. *PLoS One* 9.
- Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78:3–13
- Schmitt CA, Heiss EH, Dirsch VM (2010) Effect of resveratrol on endothelial cell function: Molecular mechanisms. *BioFactors* 36:342–349.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Walter Schaffner (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with ‘mini extracts’, prepared from a small number of cells,. *Nucleic Acids Res* 17:6419.
- Seino S (2003) Physiology and pathophysiology of KATP channels in the pancreas and cardiovascular system: A review. *J Diabetes Complications* 17:2–5.
- Sergides C, Chirilă M, Silvestro L, Pitta D, Pittas A (2016) Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Exp Ther Med* 11:164–170.
- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27:916–921.
- Simard JM, Chen M, Tarasov K V, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, Tsymbalyuk N, West GA (2006) Newly expressed SUR1-regulated NCCa-ATP channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med* 12:433–440.
- Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov V. K, Gerzanich V (2007a) Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 6:258–268.
- Simard JM, Kimberly WT, Stern B, del Zoppo G, Jacobson S, Gerzanich V (2014) Glibenclamide in Cerebral Ischemia and Stroke. *Neurocrit Care* 20:319–333.
- Simard JM, Tarasov K V, Gerzanich V (2007b) Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim Biophys Acta* 1772:947–957
- Simard JM, Tsymbalyuk N, Tsymbalyuk O, Ivanova S, Yurovsky V, Gerzanich V (2010a) Glibenclamide Is Superior to Decompressive Craniectomy in a Rat Model of Malignant Stroke * Online-Only Data Supplement (Methods). *Stroke* 41:531–537
- Simard JM, Woo KS, Arabi B, Gerzanich V (2013) The Sur1-Trpm4 Channel in Spinal Cord Injury. *J Spine*
- Simard JM, Woo SK, Gerzanich V (2012a) Transient receptor potential melastatin 4 and cell death. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 464:573–582.
- Simard JM, Woo SK, Norenberg MD, Tosun C, Chen Z, Ivanova S, Tsymbalyuk O, Bryan J, Landsman D, Gerzanich V (2010b) Brief Suppression of Abcc8 Prevents Autodestruction of Spinal Cord After Trauma. *Sci Transl Med* 2:28ra29-28ra29
- Simard JM, Woo SK, Schwartzbauer GT, Gerzanich V (2012b) Sulfonylurea

- Receptor 1 in Central Nervous System Injury: A Focused Review. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1699–1717
- Simard JM, Woo SK, Schwartzbauer GT, Gerzanich V (2012c) Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: A focused review. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1699–1717.
- Simard MJ, Geng Z, Kyoon Woo S, Ivanova S, Tosun C, Melnichenko L, Gerzanich V (2009) Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:317–330.
- Simone RE, Russo M, Catalano A, Monego G, Froehlich K, Boehm V, Palozza P (2011) Lycopene inhibits NF- κ B-Mediated IL-8 expression and changes redox and PPAR γ signalling in cigarette smoke-stimulated macrophages. *PLoS One* 6.
- Smale ST (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1351:73–88.
- Soler EP, Ruiz VC (2010) Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. *Curr Cardiol Rev* 6:138–149
- Song Y, Yang Y, Cui Y, Gao J, Wang K, Cui J (2019) Lipoxin A4 methyl ester reduces early brain injury by inhibition of the nuclear factor kappa B (NF- κ B)-dependent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) pathway in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Med Sci Monit* 25:1838–1847.
- Song YS, Narasimhan P, Kim GS, Jung JE, Park E-H, Chan PH (2008) The Role of Akt Signaling in Oxidative Stress Mediates NF- κ B Activation in Mild Transient Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1917–1926
- Stadtman ER, Berlett BS (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225–243.
- Stoker AW (2005) Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* 185:19–33.
- Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM (2016) Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:513–538.
- Stokum JA, Kwon MS, Woo SK, Tsybalyuk O, Vennekens R, Gerzanich V, Simard JM (2018) SUR1-TRPM4 and AQP4 form a heteromultimeric complex that amplifies ion/water osmotic coupling and drives astrocyte swelling. *Glia* 66:108–125.
- Su G, Kintner DB, Sun D (2002) Contribution of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter to high-[K⁺]_o-induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol* 282:1136–1146.
- Sullivan HC, Harik SI (1993) ATP-sensitive potassium channels are not expressed in brain microvessels. *Brain Res* 612:336–338.
- Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2008) Botanical phenolics and brain health. *NeuroMolecular Med* 10:259–274.
- Sun MS, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang FL, Guo ZN, Yang Y (2018) Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2018.
- Sund NJ, Vatamaniuk MZ, Casey M, Ang SW, Magnuson MA, Stoffers DA,

- Matschinsky FM, Kaestner KH (2001) Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic β cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Dev* 15:1706–1715.
- Swanson RA, Sharp FR (1994) Infarct Measurement Methodology. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:697–697
- Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Mol Brain Res* 78:131–137.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387:179–183.
- Uemura T, Watanabe K, Ko K, Higashi K, Kogure N, Kitajima M, Takayama H, Takao K, Sugita Y, Sakamoto A, Terui Y, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K (2018) Protective Effects of Brain Infarction by N-Acetylcysteine Derivatives. *Stroke* 49:1727–1733.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.
- Vang O et al. (2011) What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6.
- Vauzour D (2012) Dietary polyphenols as modulators of brain functions: Biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev* 2012.
- Vennekens R, Nilius B (2007) Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb Exp Pharmacol* 179:269–285.
- Victoria ECG, Toscano EC de B, Oliveira FMS, de Carvalho BA, Caliari MV, Teixeira AL, de Miranda AS, Rachid MA (2020) Up-regulation of brain cytokines and metalloproteinases 1 and 2 contributes to neurological deficit and brain damage in transient ischemic stroke. *Microvasc Res* 129:103973
- W. Thompson J, V. Narayanan S, A. Perez-Pinzon M (2012) Redox Signaling Pathways Involved in Neuronal Ischemic Preconditioning. *Curr Neuropharmacol* 10:354–369.
- Walle T (2011) Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215:9–15.
- Wang J, Li J, Cao N, Li Z, Han J, Li L (2018) Resveratrol, an activator of SIRT1, induces protective autophagy in non-small-cell lung cancer via inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. *Onco Targets Ther* 11:7777–7786.
- Wang J, Wang A, He H, She X, He Y, Li S, Liu L, Luo T, Huang N, Luo H, Zou K (2019) Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Biomed Pharmacother* 112:108692
- Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH (2003) Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 9:1313–1317.
- Wei H, Wang S, Zhen L, Yang Q, Wu Z, Lei X, Lv J, Xiong L, Xue R (2015) Resveratrol Attenuates the Blood-Brain Barrier Dysfunction by Regulation of the MMP-9/TIMP-1 Balance after Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats. *J*

Mol Neurosci 55:872–879

- Wierstra I (2008) Sp1: Emerging roles-Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 372:1–13.
- Woo SK, Kwon MS, Geng Z, Chen Z, Ivanov A, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM (2012) Sequential activation of hypoxia-inducible factor 1 and specificity protein 1 is required for hypoxia-induced transcriptional stimulation of Abcc8. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:525–536
- Woo SK, Kwon MS, Ivanov A, Gerzanich V, Simard JM (2013) The Sulfonylurea Receptor 1 (Sur1)-Transient Receptor Potential Melastatin 4 (Trpm4) Channel. *J Biol Chem* 288:3655–3667
- Xia N, Förstermann U, Li H (2014) Resveratrol and endothelial Nitric oxide. *Molecules* 19:16102–16121.
- Xie C-J, Gu A-P, Cai J, Wu Y, Chen R-C (2018) Curcumin protects neural cells against ischemic injury in N2a cells and mouse brain with ischemic stroke. *Brain Behav* 8:e00921 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/brb3.921>.
- Xie YK, Zhou X, Yuan HT, Qiu J, Xin DQ, Chu XL, Wang DC, Wang Z (2019) Resveratrol reduces brain injury after subarachnoid hemorrhage by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Neural Regen Res* 14:1734–1742.
- Xu L, Zhan Y, Wang Y, Feuerstein GZ, Wang X (2002) Recombinant adenoviral expression of dominant negative I κ B α protects brain from cerebral ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 299:14–17.
- Xu M, Yang L, Hong LZ, Zhao XY, Zhang HL (2012) Direct protection of neurons and astrocytes by matrine via inhibition of the NF- κ B signaling pathway contributes to neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1454:48–64
- Xu XZS, Moebius F, Gill DL, Montell C (2001) Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10692–10697.
- Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, Zhang X, Tong W, Sellers R, Ghaffari S (2010) ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3^{-/-} mice. *EMBO J* 29:4118–4131
- YAMADA M, KURACHI Y (2005) A functional role of the C-terminal 42 amino acids of SUR2A and SUR2B in the physiology and pharmacology of cardiovascular ATP-sensitive K channels. *J Mol Cell Cardiol* 39:1–6
- Yang J, Yan H, Li S, Zhang M (2018) Berberine Ameliorates MCAO Induced Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury via Activation of the BDNF–TrkB–PI3K/Akt Signaling Pathway. *Neurochem Res* 43:702–710
- Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, Islam F (2009) Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res* 1250:242–253 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.068>.
- Yu B, Datta PK, Bagchi S (2003) Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* 31:5368–5376.
- Zeng G, Ding W, Li Y, Sun M, Deng L (2018) Morroniside protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuron apoptosis and MMP2/9

- expression. *Exp Ther Med* 16:2229–2234.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W (2016) ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016.
- Zhang SJ, Buchthal B, Lau D, Hayer S, Dick O, Schwaninger M, Veltkamp R, Zou M, Weiss U, Bading H (2011) A signaling cascade of nuclear calcium-CREB-ATF3 activated by synaptic NMDA receptors defines a gene repression module that protects against extrasynaptic NMDA receptor-induced neuronal cell death and ischemic brain damage. *J Neurosci* 31:4978–4990.
- Zhang Z, Yao L, Yang J, Wang Z, Du G (2018) PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Mol Med Rep* 18:3547–3554.
- Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Program N, Lansing E (2015) Revisiting the function of extrasynaptic NMDA receptor in excitotoxicity. *Neuroscientist* 21:337–344

IX. ANEXOS

ANEXO I

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en los ensayos EMSAS

Factor transcripcional	Oligonucleótido (5`-3`)
SP1	ATTCGATCGGGGCGGGAG
	CTCCCGCCCCGATCGAAT
NFKB	AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC
	GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
HIF-1	TCTGTACGTGACCACACTCACCTC
	GAGGTGAGTGTGGTCACGTACAGA

Tabla 3. Mezcla de reacción para el marcaje de oligonucleótidos		
Reactivo	Volumen (μL)	[final]
H ₂ O	29 μL	
Amortiguador de reacción 5X TdT	10 μL	1X
Oligonucleótido (5 pmol)	1 μL	100 nM
Biotina-11-UTP (5 μM)	5 μL	0.5 μM
TdT Diluidas (2 U/μL).	5 μL	0.2 U/μL

Tabla 4. Mezcla de reacción para los ensayos EMSA

Reactivo	Volumen (μL)	[Final]
Amortiguador de unión 10X	2 μL	1 X
200 mM de EDTA	1 μL	1 mM
100 mM de MgCl_2	1 μL	5 mM
Glicerol al 50%	1 μL	2.5%
Poly (di:dc) (1 ug/ul)	0.5 μL	25 ng/ μL
Extractos nucleares (2 ug de proteína)	5 μL	10 μg
Oligo marcado con biotina (5 fmol)	2 μL	10 fmol
H_2O	7 μL	-----
Total	20 μL	-----

Tabla 5. Síntesis de cDNA.

Mix # 1			
Reactivo	Stock	Final	1 reacción
RNA	-----	5 µg	-----
Hexameros	2.5 µM/50 ng	-----	1 µL
H ₂ O-DEPC	-----	-----	-----
*Llevar la mezcla de reacción a 17.5 µL de acuerdo a la concentración de ARN , Incubar la mezcla durante 6 minutos a 65 °C . Pasar inmediatamente a hielo (sin dejar enfriar).			
Mix # 2			
Buffer RT	5X	1X	5 µL
dNTP's	100 mM	200 µM	1 µL
RNAsin	40 U/µL	20 U	0.5 µL
M-MLV-RT	200 U/µL	200 U	1 µL
*Adicionar 7.5 µL del Mix # 2 + 17.5 µL del Mix # 1 = 25 µL, incubar por 1 h a 37 °C y 5 min a 95 °C.			

Tabla 6. Sondas TaqMan® usadas en qRT-PCR

GEN	CATALAGO
Abcc8 TaqMan® FAM	Hs01093751_m1
Abcc8 TaqMan® FAM	Hs01093752_m1
Abcc8 TaqMan® FAM	Rn01476317_m1
ARNr-18S TaqMan®VIC	4308329
tbp TaqMan®VIC	Rn01455648_m1

Tabla 7. Mezcla de reacción para el gen blanco

REACTIVO	1 REACCIÓN
	Volumen en μ l
Máster Mix (2X) Applied	6.5
Sonda TaqMan	0.325
cADN dilución (1:50; 1:30)	1
H ₂ O-DEPC	5.2
Volumen final	13.025

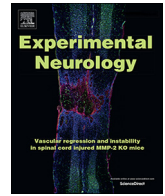
*Las reacciones se realizaron por triplicado, por lo que 36 μ L de la mezcla se transfirieron a tubos eppendorf de 600 μ L. A continuación, se agregaron 3 μ L del cDNA de la dilucion cDNA (1:30).

*Se incluyó un control negativo sin cDNA.

Tabla 8. Mezcla de reacción para el gen endoóeno ARNr-18S

REACTIVO	1 REACCIÓN
	Volumen en μl
Máster Mix (2X) Applied	6.5
cADN dilución (1:30)	1
Sonda Taqman	0.065
Oligos sense	0.065
Oligos antisense	0.065
H ₂ O-DEPC	5.31
Volumen final	13.005
<p>*Las reacciones se realizaron por triplicado, por lo que 36 μL de la mezcla se transfirieron a tubos eppendorf de 600 μL. A continuación, se agregaron 3 μL del cDNA de la dilución cDNA (1:30).</p> <p>*Se incluyó un control negativo sin cDNA.</p>	

ANEXO II



Research paper

Resveratrol reduces cerebral edema through inhibition of *de novo* SUR1 expression induced after focal ischemiaIván Alquisiras-Burgos^a, Alma Ortiz-Plata^b, Javier Franco-Pérez^c, Alejandro Millán^d,
Penélope Aguilera^{a,*}^a Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, CDMX 14269, México^b Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, CDMX 14269, México^c Laboratorio de Formación Reticular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, CDMX 14269, México^d Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Lázaro Cárdenas s/n Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, 39070, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Resveratrol
Ischemia
Cerebral edema
Sulfonylurea receptor 1
SP1
Blood-brain barrier

ABSTRACT

Cerebral edema is a clinical problem that frequently follows ischemic infarcts. Sulfonylurea receptor 1 (SUR1) is an inducible protein that can form a heteromultimeric complex with aquaporin 4 (AQP4) that mediate the ion/water transport involved in brain tissue swelling. Transcription of the *Abcc8* gene coding for SUR1 depends on the activity of transcriptional factor SP1, which is modulated by the cellular redox environment. Since oxidative stress is implicated in the induced neuronal damage in ischemia and edema formation, the present study aimed to evaluate if the antioxidant resveratrol (RSV) prevents the damage by reducing the *de novo* expression of SUR1 in the ischemic brain. Male Wistar rats were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion followed by different times of reperfusion. RSV (1.9 mg/kg; *i.v.*) was administered at the onset of reperfusion. Brain damage and edema formation were recognized by neurological evaluation, time of survival, TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) staining, Evans blue extravasation, and water content. RSV mechanism of action was studied by SP1 binding activity measured through the Electrophoretic Mobility Shift Assay, and *Abcc8* and *Aqp4* gene expression evaluated by qPCR, immunofluorescence, and Western blot. We found that RSV reduced the infarct area and cerebral edema, prevented blood-brain barrier damage, improved neurological performance, and increased survival. Additionally, our findings suggest that the antioxidant activity of RSV targeted SP transcription factors and inhibited SUR1 and AQP4 expression. Thus, RSV by decreasing SUR1 expression could contribute to reducing edema formation, constituting a therapeutic alternative for edema reduction in stroke.

1. Introduction

Ischemic stroke results from the reduction of cerebral blood flow due to an obstruction in an important cerebral artery. The blockade compromises the quantity of oxygen and glucose delivered to the brain, resulting in a disparity between the brain's energy supply and its high intrinsic metabolic activity (Moskowitz et al., 2010). Under these conditions, ATP depletion induces the loss of the transmembrane electrochemical gradients and favors the influx of osmolites (mainly Na⁺ and Cl⁻) through co-transporters whose activity depends on these transmembrane electrochemical gradients. Furthermore, the influx of osmolites drives interstitial water entry through aquaporin 4 (AQP4), and other channels and transporters (Stokum et al., 2016). This process

results in the pathological increase in the water mass contained in the brain, which causes the dysfunction of the neurovascular unit including neurons, astrocytes, and cerebral vascular endothelium (CVE) (Stokum et al., 2016). Importantly, brain edema in ischemic stroke is decisive in the prognosis of the patient's functional outcome, thus representing the main target for therapeutic intervention.

Besides the constitutively expressed transporters that allow Na⁺ movement, SUR1-NC_{Ca-ATP}, a non-selective channel permeable to monovalent cations, greatly contributes to the process of cell swelling (Chen et al., 2019; Hu and Song, 2017; Simard et al., 2006, 2007). SUR1-NC_{Ca-ATP} channel is formed by the co-assembly of two structurally different subunits: the transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4), which is a Ca²⁺-activated non-selective ion channel; and a

* Corresponding author at: Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur #3877, La Fama, Tlalpan, Ciudad de México 14269, Mexico.

E-mail addresses: aortiz@innn.edu.mx (A. Ortiz-Plata), jfranco@innn.edu.mx (J. Franco-Pérez), penelope.aguilera@gmail.com (P. Aguilera).

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113353>

Received 15 January 2020; Received in revised form 26 April 2020; Accepted 1 May 2020

Available online 04 May 2020

0014-4886/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

regulatory subunit, the sulfonylurea receptor 1 (SUR1) (Mehta et al., 2016; Woo et al., 2013). SUR1 is a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, which activity is regulated by the intracellular ATP/ADP ratio (Ashcroft and Gribble, 2000). SUR1-NC_{Ca-ATP} channel is practically absent from the healthy brain but *de novo* expression of SUR1 and TRPM4 is up-regulated in the cells from the neurovascular unit after brain injury. During ischemia, ATP depletion and the increase of the intracellular Ca²⁺ stimulates channel activity (Simard et al., 2006, 2007). Additionally, SUR1 performs a physical interaction with AQP4 to form the heteromultimeric complex SUR1-NC_{Ca-ATP}-AQP4, which favors ion/water osmotic coupling and cell swelling (Stokum et al., 2016, 2018). SUR1 appears as a decisively component in the conformation of a functional channel which activity is involved in the development of cerebral edema. Therefore, targeting the SUR1 protein offers an interesting therapeutic approach for stroke treatment.

The promoter of the *Abcc8* gene encoding for SUR1 contains multiple binding sites for transcription factors such as the Activating Protein 1 (AP1), the hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), and the Specificity Protein 1 (SP1) (Gorogawa et al., 2004; Hernández-Sánchez et al., 1999; Kim et al., 2002; Woo et al., 2012). Noteworthy, SP1, which is activated by oxidative stress is the main factor required for the *Abcc8* gene transcription (Hernández-Sánchez et al., 1999; Hota et al., 2010; Woo et al., 2012). Accordingly, SP1 immunostaining is noticeable at the core and peri-infarct areas of infarcted brains; additionally, cells positive to nuclear SP1 also express SUR1 (Simard et al., 2006).

Since oxidative stress is a condition generated during cerebral ischemia and reperfusion (Peters et al., 1998), SP1 appears as an ideal target for antioxidants. Interestingly, antioxidant strategies have been linked to down-regulation of proteins that are up-regulated during ischemia and whose inhibition tends to preserve blood-brain barrier (BBB) integrity (Davis and Pennypacker, 2017; Li et al., 2017; Pineda-Ramírez et al., 2018; Wang et al., 2015; Wei et al., 2015). For instance, resveratrol (RSV, trans-3, 4', 5-trihydroxy-stilbene) a natural phytoalexin found in a variety of plants has protective effects on ischemia (Ataie et al., 2016; Baur and Sinclair, 2006; Lopez et al., 2015; Pineda-Ramírez et al., 2018). RSV effects have been primordially associated with its strong antioxidant activity and its great ability to capture superoxide anions produced in large quantities at the onset of reperfusion (Ataie et al., 2016; Gülçin, 2010; Peters et al., 1998). Furthermore, RSV modulates gene expression through the activation of cell signaling and epigenetic mechanisms (Fernandes et al., 2017).

Considering RSV's capability to regulate the redox environment of the cell, the present study aimed to assess if treatment with RSV at the onset of reperfusion reduced brain edema formation after cerebral ischemia. We hypothesized that RSV by affecting SP1 activity could down-regulate the *de novo* expression of SUR1. Our data suggest that RSV contributes to the edema reduction by inhibiting *de novo* expression of SUR1 during brain ischemia.

2. Experimental procedures

2.1. Experimental design

Male Wistar rats (weight 280–320 g) were randomly included in the following groups: 1) Control (CT), sham group ($n = 21$) subjected to simulated left middle cerebral artery occlusion (MCAO); 2) Vehicle (+VH), ischemic group ($n = 21$) subjected to 2 h of MCAO and subsequently injected with vehicle; and 3) Resveratrol (+RSV), ischemic group with treatment ($n = 21$) subjected to 2 h of MCAO and subsequently injected with RSV. In some experiments, *N*-acetyl cysteine (+NAC) or curcumin (+CUR) were used as a reference for antioxidant activity. Animals subjected to MCAO were sacrificed after 24 h of reperfusion, except for the DNA binding and the RT-qPCR assays where a temporal course (0, 15, 30, 60, and 120 min; and 0.5, 8, and 24 h, respectively) was performed after reperfusion. Sham animals were

sacrificed after 24 h.

2.2. Treatment

At the onset of reperfusion animals were injected in the tail vein with a total volume of 100 μ L of either vehicle (ethanol 50% in water) or RSV (R5010, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1.9 mg/kg body wt. Because of the RSV's low biodisponibility but low toxicity, the highest soluble concentration in 100 μ L of the vehicle was used. The compounds CUR and NAC were administered at equimolar concentrations taking as reference the RSV concentration and diluted in 25% dimethyl sulfoxide and saline solution, respectively.

2.3. Experimental model for induction of focal cerebral ischemia

Techniques concerning the handling of animals were performed in accordance with The Declaration of Helsinki and the Local Guidelines on the Ethic Use of Animals for Experimentation and to the institutional Ethics Committee (approved project No. 32/17). We used the MCAO method to induce transient focal cerebral ischemia as described previously by Longa et al. (1989). Briefly, male Wistar rats (weight 280–320 g) were anesthetized with 2% isoflurane. The left common carotid artery was exposed through a neck incision, and a nylon monofilament (3–0) was introduced (~17 mm) through the external proximal carotid artery into the carotid artery. At this point, the filament occluded the blood flow of the left middle cerebral artery. After 2 h of occlusion, animals were anesthetized again and the filament was removed to allow restoration of blood flow (reperfusion). The physiological parameters of the rats (heart and respiratory rate) were monitored throughout this procedure.

2.4. Survival

The percentage of animals that survived 24 h relative to the total number of individuals in each group was determined. Animals used in different experiments but under the same treatment were included in the final count ($n = 21$).

2.5. Neurological outcome

To evaluate the neurological performance of the animals, the “limb-use asymmetry test” was performed 24 h after MCAO. Rats were placed in a transparent acrylic cylinder (25 cm diameter, 40 cm height) and a video was recorded for 5 min. Locomotor asymmetry was evaluated by counting the number of contacts that the animal made with their extremities on the cylinder wall. This method has been previously described in detail by Roof et al., 2001. Briefly, the number of contacts using the extremity ipsilateral to injury (not altered), contralateral to injury (altered), and simultaneously with both extremities were obtained. Then, the percentage of contacts with each extremity (ipsi- and contralateral) was calculated concerning the total number of contacts.

%of lateral contacts (ipsi or contra)

$$= \frac{\text{Number of lateral contacts (ipsi or contra)} \times 100}{\text{Total number of contacts}}$$

Finally, the global use score of extremities (BIAS) was calculated by subtracting the percentage use of the contralateral limb to percentage use of the ipsilateral limb.

$$\%BIAS = \%ipsilateral\ contacts - \%contralateral\ contacts$$

2.6. Evaluation of brain-blood barrier (BBB) permeability

Evans blue (2%) diluted in saline was administrated during reperfusion (4 mL/kg; *i.p.*) according to the method of Manaenko et al.

(2011). Evans blue circulation was allowed for 24 h. Then, rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg; *i. p.*) and decapitated. Brains were removed and frozen at -70°C for 6 min. Serial coronal slices of 2.5 mm in thickness were obtained. Evans blue extravasation was observed by the colour change in the tissue and quantified using the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997). The total area of each slice was considered as 100%, and the percentage of the tissue stained in blue on each slice was calculated. Finally, the average of the stained tissue in each brain was obtained, followed by calculation of the average stained area per group.

2.7. Water content

After 24 h of reperfusion, animals were anesthetized and decapitated. Brains were extracted, hemispheres separated (both ipsi- and contralateral to the lesion), and weighed independently. Subsequently, tissue was dried at 105°C for 24 h, and the dry weight documented. The % of water content on each hemisphere was calculated using the following equation (Yousuf et al., 2009):

$$\% \text{Water on the hemisphere} = \frac{[(\text{wet weight}) - (\text{dry weight}) * 100]}{\text{wet weight}}$$

Then, the individual percentage of change among hemispheres was calculated using the following equation:

Individual water change content (%)

$$= \text{ipsilateral}\% \text{water content} - \text{contralateral}\% \text{water content}$$

Finally, the average on the water change content per group was calculated.

2.8. Quantification of the infarct area

Infarct area was measured using 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining. The brain was cut into serial coronal slices (2.5 mm thick), incubated in 2% TTC for 30 min at 37°C in the dark, and then placed in 4% paraformaldehyde. For each animal, the percentage of the infarct area was calculated considering the total area of the slice as 100%. The section that showed the highest effect was the somatosensory cortex, located approximately at Bregma -2.16 to -4.20 mm. This region was considered for the analysis (Paxinos and Watson, 2007). Image analysis was performed using ImageJ software 1.8.1 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997).

2.9. RNA extraction

Total RNA purification was performed using TRIZOL® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) following manufacturer instructions. Trizol (1 mL) was added to cortex tissue, mixed with 200 μL chloroform, incubated 15 min and followed by centrifugation 12,000 $\times g$ for 15 min at 4°C . Then the aqueous phase was transferred to a new tube and 500 μL of isopropanol was added. After 10 min of incubation at room temperature, the mixture was centrifuged at 12,000 $\times g$ for 10 min at 4°C and the supernatant was discarded. The pellet was washed with 75% ethanol and centrifuged at 7500 $\times g$ for 5 min. Finally, the supernatant was carefully removed, the pellet was allowed to dry at room temperature and was re-suspended in 50 μL of ribonuclease-free water [0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) in treated sterile bidistilled water].

2.10. cDNA synthesis

To synthesize cDNA, 5 μg of total RNA was mixed with 1 μL of hexamers (2.5 μM), 5 μL RT enzyme buffer (M531A, Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1 μL dNTP's (500 μM), 0.5 μL RNasin (20 U; N211A, Promega Corporation), and 1 μL M-MLV-RT (200 U;

M1708, Promega Corporation). A final 25 μL volume was completed with DEPC-water. The mixture was incubated 1 h at 37°C and 5 min at 94°C . Subsequently, the sample was stored at -20°C until use.

2.11. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

TaqMan®FAM probe (TaqMan Rn01476317_m1, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) that expands exons 38 and 39 was used to measure the relative level of *Abcc8* mRNA and TaqMan®VIC probes designed to detect the TATA-binding protein (*Tbp*) (Rn01455646_m1, Applied Biosystem) and the 18S rRNA (Rn01455646_m1, Applied Biosystem) were used to normalized *Abcc8* gene expression. qPCR was performed on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using Universal PCR Master Mix (4,304,437, Applied Biosystem). Reactions were executed in triplicate under the followed conditions: holding step, 95°C for 10 min; cycling step, 40 cycles of 92°C for 15 s and 60°C for 1 min. Values of threshold cycle (Ct) was determined by automated threshold analysis using the SDS Software 1.3.1. (Livak and Schmittgen, 2001).

2.12. Promotor analysis to identify SP1 binding sites

Prediction of SP1 binding sites in *Abcc8* and *Aqp4* genes promoters was done using the CONSITE database (<http://consite.genereg.net/>). For the prediction analysis, we considered 3000 bp relative to ATG start codon (-2000 to $+1000$) using the ExpASY Bioinformatics Resource Portal (<http://www.expasy.org/genomics>).

2.13. Nuclear extracts

Extraction of nuclear proteins was carried out according to the method of Schreiber et al. (1989). Five grams of tissue from the cerebral cortex were lysed using 500 μL of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT) containing a mixture of protease inhibitors (Sigma, P8340) and incubated on ice for 15 min. Then, 25 μL of Nonidet P-40 (10%) was added and the mixture was centrifuged at 14,000 rpm for 30 s. The supernatant (containing cytoplasmic proteins) was removed and 50 μL of Buffer B (20 mM Hepes pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors) was added to the nuclear pellet. The concentrate of proteins inside nuclei was shaken gently for 30 min at 4°C . Finally, it was centrifuged at 14,000 rpm for 5 min and the supernatant (nuclear proteins) was recovered, quantified, aliquoted (5 μg), and maintained at -70°C until use.

2.14. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

The oligonucleotides employed in the assay contained the DNA binding sequence of SP1: 5'-ATTTCGATCGGGGCGGGAG-3' and 5'-CTCCGCCCGATCGAAT-3' (Ramos et al., 2007). Oligonucleotides were labeled individually with biotin at the OH-3' ends using the DNA Kit 3' End Biotinylation (89,818, ThermoFisher Scientific). Next, a mix of equal concentration of each biotin-labeled oligonucleotides was incubated in a water bath at 90°C for 1 min. Then, oligonucleotides were aligned by allowing slow cooling until water reach room temperature. Binding activity detection was performed using the LightShift Chemiluminescence EMSA kit (20,148, ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Briefly, 5 μg of nuclear extract and 0.2 ng of biotin-labeled oligonucleotides (10 fmol) were mixed with the binding reagents and incubated at room temperature for 20 min. Then, 5 μL of loading buffer was added to the reaction mix and loaded on non-denaturing 5% polyacrylamide gels. Electrophoresis was run (80 mV for 1.5 h) and after, binding reactions were electrophoretically transferred to a nylon membrane. Finally, the detection was performed by chemiluminescence in a photo-detector (Fusion SOLO S, Vilber Lourmat, Collégien, France).

2.15. EMSA competition assays

To determine the specificity of the SP1 signal, the binding under three conditions was compared: i) nuclear extract plus biotin-labeled oligonucleotides containing the SP1 binding site (SP1-biotin) (10 fmol); ii) nuclear extracts plus SP1-biotin (10 fmol) and an excess of unlabeled oligonucleotide containing the SP1 binding site (10 pmol); and iii) nuclear extracts, plus SP1-biotin (10 fmol) and an excess of unlabeled oligonucleotide containing a heterologous binding sequence (10 pmol) (data not shown).

2.16. Immunofluorescence

Rats were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital (100 mg/kg) (PiSA, Guadalajara, JC, Mexico) and perfused transcardially with PBS and 4% paraformaldehyde. Brains were extracted, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, and sequentially placed in increasing concentrations of sucrose (10, 20, and 30%) for three days at 4 °C. Then, coronal sections (10 µm) were obtained using a freezing microtome (Sartorius-Werke, model 27, Gottingen, Germany). Tissue sections were stored at -20 °C in a cryoprotective solution (30% ethylene glycol, 20% glycerol in PBS, pH 7.4) until use. For protein detection, sections were permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 30 min and blocked in 10% goat serum in PBS for 60 min. Then, sections were incubated with antibodies against occludin (1:200, GTX114949, GENETEX), a specific endothelial marker, and SUR1 (1:200, ab-134,292, ABCAM) in PBS containing 1% bovine serum albumin overnight at 4 °C. After, sections were washed with PBS and incubated with anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 594-conjugated (711-585-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA) or anti-mouse IgG DyLight™ 488-conjugated (715-485-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) as required. Sections were incubated for 15 min with 1 mg/mL 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) to detect nuclei and mounted with Mowiol medium (4.8% Mowiol 4.88, 0.1% *p*-phenylenediamine, 12% glycerol, 0.02% Na₃, and 0.2 M Tris-HCl). Images were acquired in an inverted microscope Olympus model 1 × 71 (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) using 40 × dry objective lenses. Imaging analysis was performed with Image J software 1.8.0 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997). Total fluorescence was reported in arbitrary units (a. u).

2.17. Western Blot assays

Tissue was collected, and total protein was extracted in lysis buffer RIPA (150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 1% Sodium Deoxycholate, 5 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH 7.5) containing protease inhibitors (P8340, Sigma-Aldrich). The concentration of protein samples was measured by the bicinchoninic acid method (BCA-1 C2284, Sigma-Aldrich). Then, samples were mixed with Laemmli loading buffer and denatured at 100 °C for 5 min. Sixty µg of protein were separated by molecular weight on SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gels. Then, proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes and then, membranes blocked with 5% skim milk diluted in TBS-T 1 × (10 mM Tris-Base, 200 mM NaCl, and 0.1% Tween-20, pH 7.5). Membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-SUR1 polyclonal goat antibody (1:500 dilution, SC-5789, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) or anti-AQP4 monoclonal mouse antibody (1:1000 dilution, SC-32739, Santa Cruz) in TBS-T containing 5% skim milk; subsequently, membrane was washed four times with buffer TBS-T. Detection was performed by chemiluminescence (WBLUF0100, Millipore, Burlington, MA, USA) after incubation overnight at 4 °C with anti-IgG-goat antibody conjugated with peroxidase in 5% skim milk diluted in TBS-T (1:3000 dilution, JIR-705-035-003, Jackson Immuno Research,) in a photodetector (Fusion SOLO S, Vilber Lourmat). Then, membranes were washed twice with stripping buffer (200 mM Glycine, 3.5 mM SDS, 1% Tween-20, pH 2.2) during

5 min, followed by freshly blocked in 5% skim milk diluted in TBS-T 1 ×. Finally, to normalized the amount of protein loaded in the gel, membranes were incubated with anti- α -tubulin monoclonal mouse antibody (1:1000 dilution, T9026, Sigma-Aldrich) in 5% skim milk diluted in TBS-T 1 ×, and followed by the process described above.

2.18. Statistical analysis

All data were obtained from at least three independent experiments. All data were presented as the mean \pm SD statistical differences. Calculations were performed using the GraphPad Prism 5 software (San Diego, California, USA). Differences between groups were calculated using Student's *t*-test and 1-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post-test.

3. Results

3.1. Brain blood barrier integrity after MCAO is preserved by RSV treatment

To evaluate the protective effect of RSV against the BBB damage induced by cerebral ischemia, we examined the BBB permeability properties by measuring the water content and the Evans blue extravasation 24 h post-MCAO. We found that MCAO increases both parameters exclusively on the ipsilateral side to the lesion. The percentage of the Evans blue extravasation (+VH, 14.6 \pm 2.6; ANOVA, *p* < .001; *n* = 7) and the water content (+VH, 4.1 \pm 1.02%; ANOVA, *p* < .001; *n* = 11) was increased with MCAO and reperfusion. These findings clearly showed that the BBB result compromised after ischemia. In contrast, when RSV was administrated at the onset of reperfusion, both parameters were significantly reduced when compared to the +VH group, extravasation changed to 6.5 \pm 3.9% (ANOVA, *p* < .01; *n* = 7) and the water brain content to 2.9 \pm 1.2% (ANOVA, *p* < .01; *n* = 13) (Fig. 1).

3.2. RSV increases survival and mitigates the neurological impairments induced by MCAO

Cerebral edema accounts for up to 50% of patient's mortality, and a high index of disability is associated with survivors of stroke (Desilles et al., 2013). We obtained the survival score in each group after MCAO and used the "limb-use asymmetry test" to evaluate the neurological performance of animals. We found that 2 h of MCAO induced a brain lesion that was linked to a high mortality rate observed after 24 h of reperfusion (CT, 100% survival vs. +VH, 61.9 \pm 10.8% survival; ANOVA, *p* < .01, *n* = 21). Interestingly, RSV treatment significantly augmented the rate of survival (+RSV, 90.4 \pm 6.5% vs. +VH; ANOVA, *p* < .05, *n* = 21). Moreover, RSV treatment significantly prevented the neurological deterioration of survivors (+VH, 52.2 \pm 10.0% vs. +RSV, 3.4 \pm 7.7%; ANOVA, *p* < .01; *n* = 8) (Fig. 2 A and B).

3.3. Treatment with RSV attenuates the MCAO-induced infarct volume

To investigate if RSV treatment decreases the ischemia-induced tissue damage, a TTC staining assay was conducted to measure the infarct volume 24 h post-MCAO. Data showed that 2 h of MCAO induced a prominent lesion. Brain damage was evident at the cortical and subcortical level, the left middle cerebral artery (MCA) territory. RSV treatment significantly reduced the infarct volume, preventing the damage observed. Importantly, staining was weaker in the posterior coronal slices, which showed the most marked reduction in damage. Therefore, the infarct volume was measured on the brain slice that showed the greatest contrast on damage before and after the treatment (+VH, 40.8 \pm 5.2% vs. +RSV, 29.37 \pm 11.3%, ANOVA, *p* < .05; *n* = 6) (Figura 2C and D). Subsequent analysis was performed on tissue extracted from cortex located in this region of the brain (see methods).

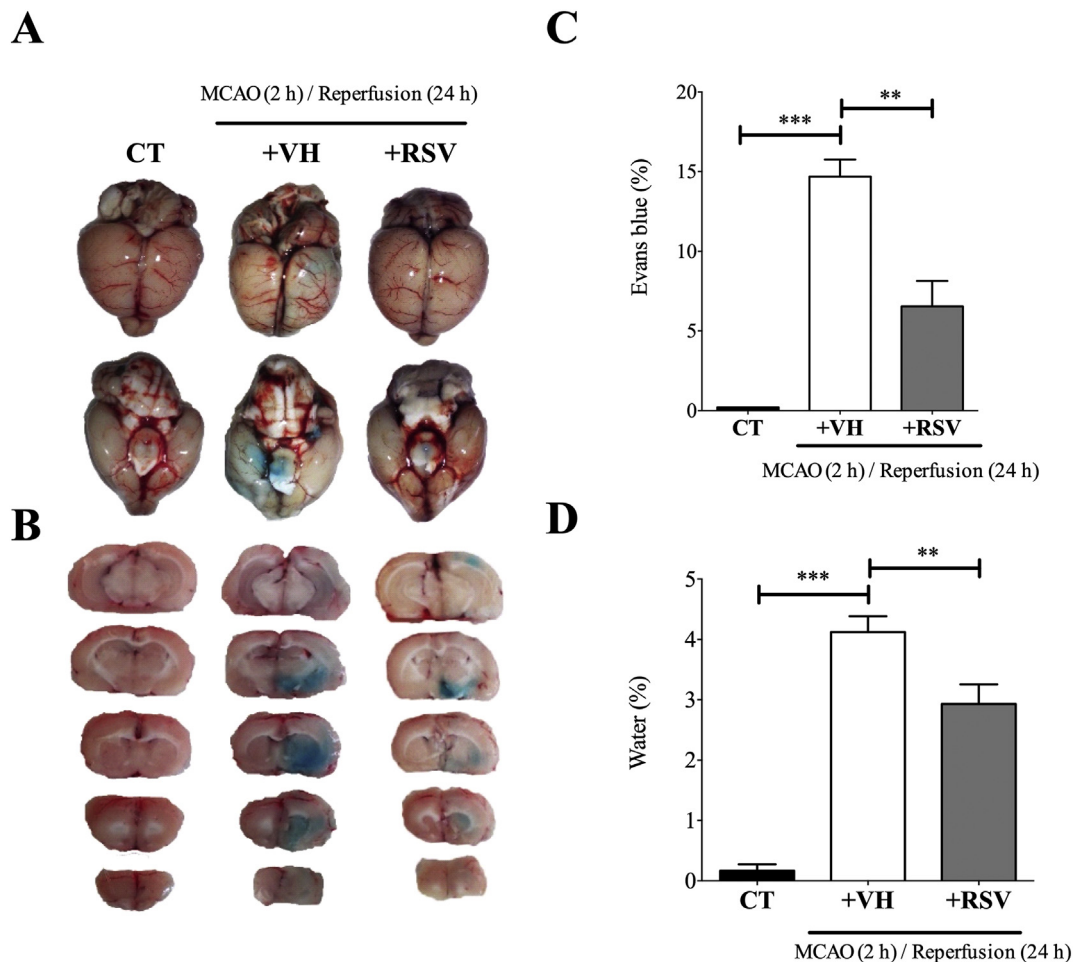


Fig. 1. Resveratrol decreases edema in rats exposed to cerebral ischemia. Animals were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 h of reperfusion. Control animals (CT) underwent simulated MCAO. At the onset of reperfusion animals received either vehicle (+VH, ethanol 50%; i.v.) or resveratrol (+RSV, 1.9 mg/kg, body weight; i.v.). Changes in Blood-brain Barrier permeability were visualized by extravasation of Evans blue in the total brain (A) and coronal slices (B). Extravasation (%) was calculated by measuring the blue area in the ipsilateral hemisphere (C). Edema was assessed after MCAO and 24 h of reperfusion. Brain water content was calculated as a percentage ratio between wet and dry brain tissue (D). Values were expressed as mean \pm SD. ANOVA, Tukey, ** $p < .01$; *** $p < .001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. RSV decreases the binding activity of SP1 transcription factors

The SP1 transcription factor has a prominent role on stimulating transcription of the *Abcc8* gene encoding for SUR1 and AQP4, both involved in edema formation (Ashfield and Ashcroft, 1998; Hernandez-Sanchez et al., 1999; Stokum et al., 2018; Woo et al., 2012) (Fig. 3 A). Thus, we evaluated if the binding activity of the SP1 transcription factor, which is modulated by oxidative conditions was affected by RSV treatment. First, we performed a time-course assessment during reperfusion to establish the time at which the SP1 transcription factor has a maximal binding activity. EMSA assays showed that MCAO specifically increased the binding activity of SP1 compared to the control group. The peak binding activity of SP1 was observed after 15 min of reperfusion with an increase of 2.2 ± 0.27 -fold (ANOVA, $p > .01$; $n = 4$). SP1 binding activity then gradually decreased, reaching baseline levels after 120 min of reperfusion (Fig. 3 B). Thus, we investigated the effect of RSV on SP1 binding activity at 15 min of reperfusion after MCAO. We observed that RSV treatment completely prevented the increase induced in SP1 binding activity, which remained at baseline levels (+RSV, 1.0 ± 0.13 -fold vs. +VH; ANOVA, $p > .05$; $n = 4$) (Fig. 3 C). Together, these data indicated that RSV modulated the reperfusion-induced increase of SP1 binding activity and consequently might alter the expression of SP1 targeted genes.

3.5. RSV prevents the up-regulation of *Abcc8* mRNA expression induced by MCAO and reperfusion

Previous studies have shown that experimental models that simulate stroke induce an increase in the *Abcc8* mRNA level in the brain (Simard et al., 2006). Accordingly, using the MCAO model, we found that 2 h of ischemia up-regulated the *Abcc8* mRNA expression in the ischemic cerebral cortex. The peak of expression was found after 0.5 h of reperfusion (10.8 ± 4.2 -fold vs. CT; ANOVA, $p < .001$, $n = 6$). Subsequently, mRNA levels returned to baseline where they remained after 8 and 24 h of reperfusion (Fig. 3 D). Since RSV altered transcription, we evaluated its effects on the increase of *Abcc8* mRNA levels following reperfusion. We observed that RSV significantly prevented the increase induced by the MCAO after 0.5 h of reperfusion (+RSV, 1.64 ± 0.30 -fold vs. +VH; ANOVA, $p < .001$, $n = 5$) (Fig. 3 E).

3.6. RSV prevents SUR1 protein expression induced by MCAO and reperfusion

Since RSV reduced the binding activity of the SP1 transcription factor and SP1 is essential for *Abcc8* gene induction during ischemia, we assessed the level of SUR1 protein expression by Western blot 24 h post-MCAO. Tissue was collected from the posterior cortical area in the MCA territory, where the protective effect of RSV was marked (Fig. 2 C,

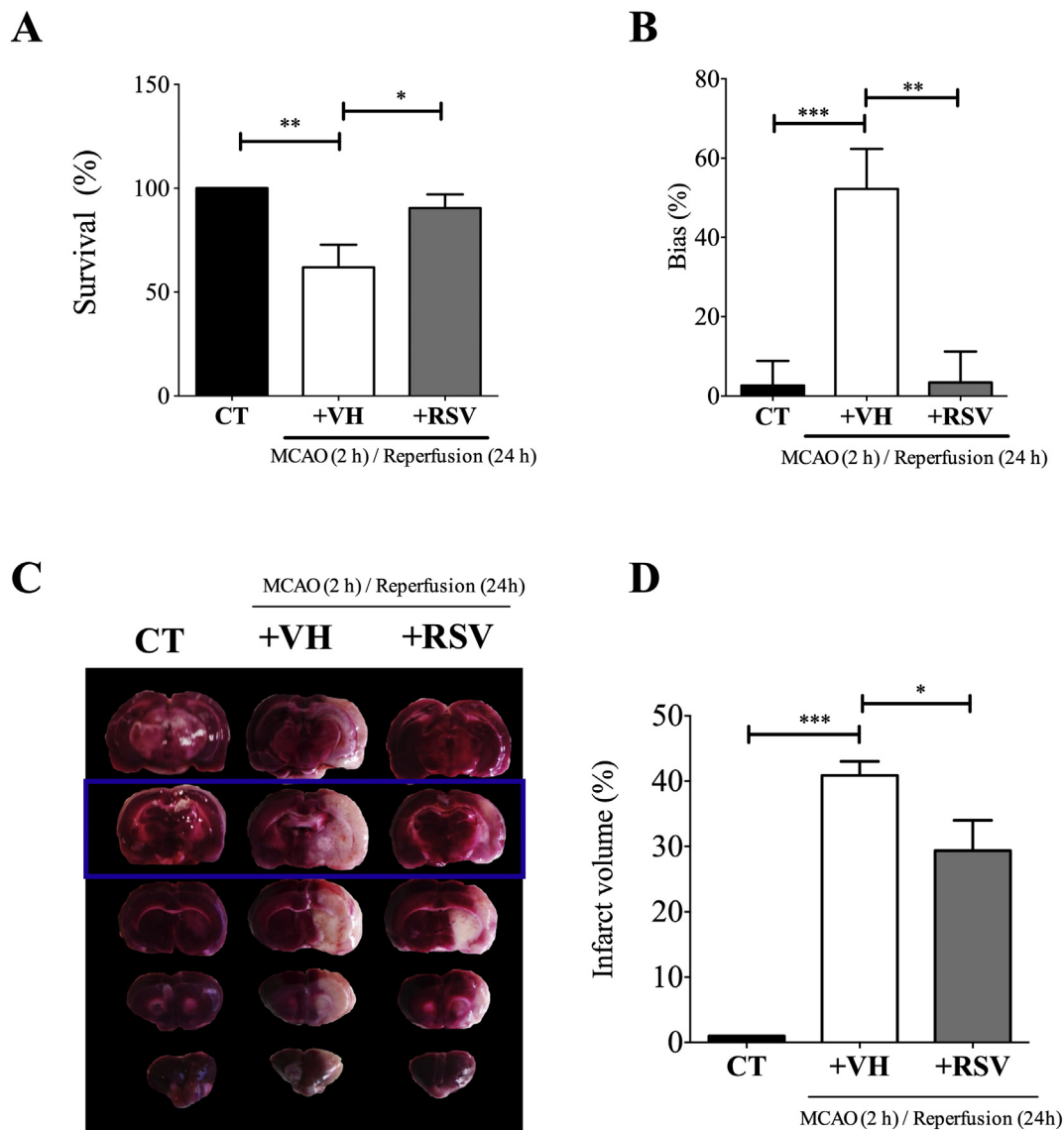


Fig. 2. Resveratrol increases survival and improves the neurological performance of animals exposed to cerebral ischemia. Animals were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 h of reperfusion. Control animals (CT) underwent simulated MCAO. At the onset of reperfusion animals received either vehicle (+VH, ethanol 50%; i.v.) or resveratrol (+RSV, 1.9 mg/kg, body weight; i.v.). Mortality was assessed during the 24 h followed MCAO, and the percentage of surviving animals was represented (A). The neurological status of the animals was calculated by the Bias “limb- use asymmetry test” (B). The infarcted area was assessed using the 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride staining method in coronal slices of brains (C). The infarct area was quantified on the slice located approximately at Bregma -2.16 to -4.20 mm (D). Values were expressed as mean \pm SD. ANOVA, Tukey, * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

framed photographs). In the control group, SUR1 expression was very low. In contrast, SUR1 expression level in rats subjected to MCAO and reperfusion was quite high (+VH, 20.2 ± 2.7 -fold vs. +CT, 1.09 ± 0.22 -fold; ANOVA, $p < .01$; $n = 6$). Importantly, we found that the large increase in SUR1 protein expression induced by MCAO and 24 h of reperfusion was almost completely prevented by RSV treatment (+RSV, 2.3 ± 1.2 -fold vs. +VH, 20.2 ± 2.7 -fold; ANOVA, $p < .01$; $n = 6$) (Fig. 4 A).

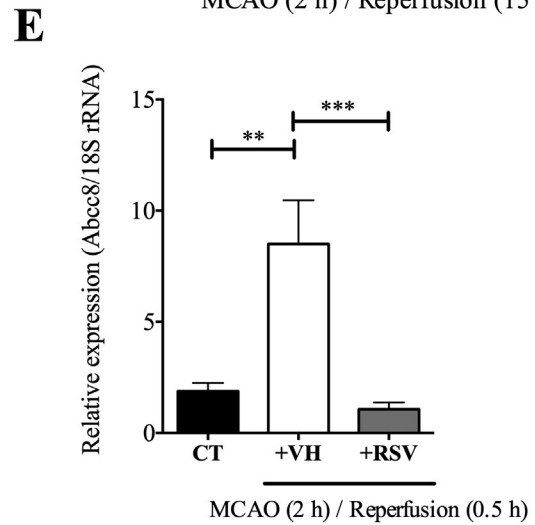
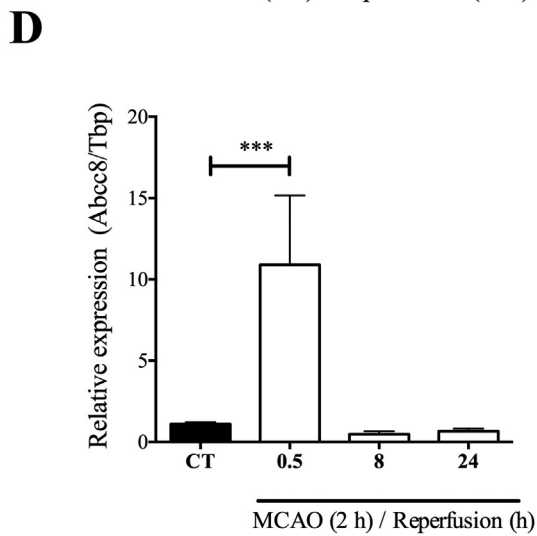
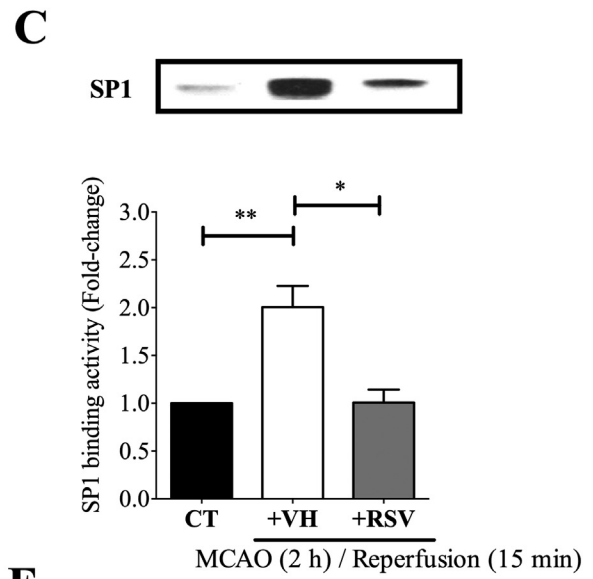
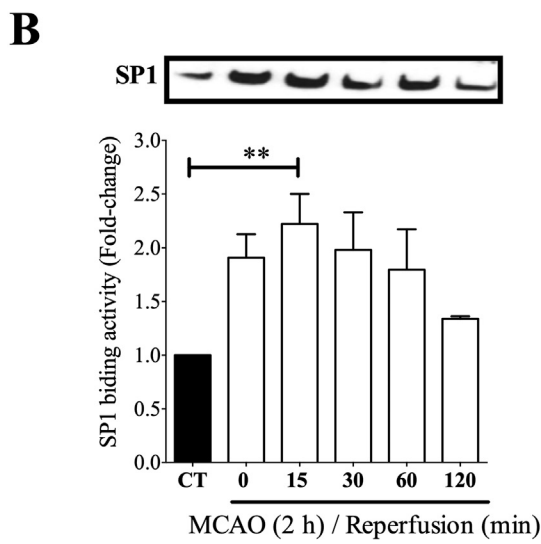
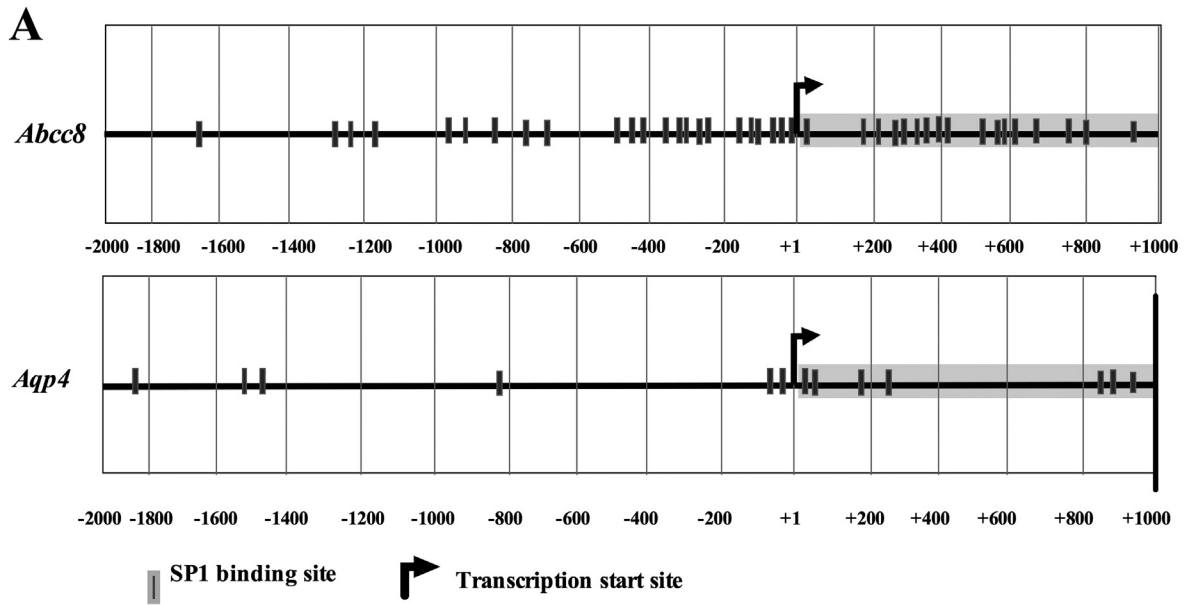
3.7. Antioxidant agents CUR and NAC also prevent SUR1 induced-expression by MCAO and reperfusion

It is assumed that RSV's protective effects are mainly associated with its antioxidant properties (Gülçin, 2010; Yousuf et al., 2009). Therefore, we hypothesized that perhaps other compounds with antioxidant activity such as CUR or NAC, with the ability to increase the levels of glutathione, should also regulate SUR1 protein levels after MCAO and

reperfusion. The immunoblot for SUR1 shown in Fig. 4 B demonstrated that CUR and NAC, administrated at equimolar concentrations as RSV, prevented the increase of SUR1 expression after MCAO maintaining baseline levels (+CUR, 1.4 ± 0.1 -fold vs. CT; +NAC, 1.2 ± 0.13 -fold vs. CT; ANOVA, $p < .001$; $n = 6$).

3.8. RSV prevents the up-regulation of SUR1 expression induced by MCAO and reperfusion in endothelial cells

MCAO induces SUR1 expression in cells that integrate the neuro-vascular unit (Simard et al., 2006). To examine if RSV regulates SUR1 expression in the BBB, we performed double immunostaining using occludin and SUR1 antibodies, the former as a specific marker of vascular endothelial cells. We found that under control conditions the expression of SUR1 was almost undetectable ($1.0 \pm 0.45\%$). In rats subjected to MCAO and 24 h of reperfusion, SUR1 expressing increased, particularly in vascular endothelial cells (+VH, $9.29 \pm 2.17\%$ vs. CT;



(caption on next page)

Fig. 3. Resveratrol reduces SP1 binding activity and *Abcc8* gene expression in cerebral ischemia. Animals were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by different times of reperfusion. Control animals (CT) underwent simulated MCAO. At the onset of reperfusion, animals received either vehicle (+VH, ethanol 50%) or resveratrol (+RSV, 1.9 mg/kg, body weight). SP1 binding sites prediction analysis. Promoter analysis of *Abcc8* and *Aqp4* promoter was performed from -2000 to +1000 bp relative to ATG (A). Nuclear proteins were obtained, and the SP1 binding activity during reperfusion was evaluated using Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) (B). Evaluation of the binding activity of SP1 after MCAO and reperfusion in animals treated with RSV (C). Relative expression of the *Abcc8* mRNA after MCAO and different times of reperfusion measured by RT-qPCR (D). Effect of RSV on mRNA levels of the *Abcc8* gene after MCAO and reperfusion (E). Values were expressed as mean \pm SD. ANOVA, Tukey, * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

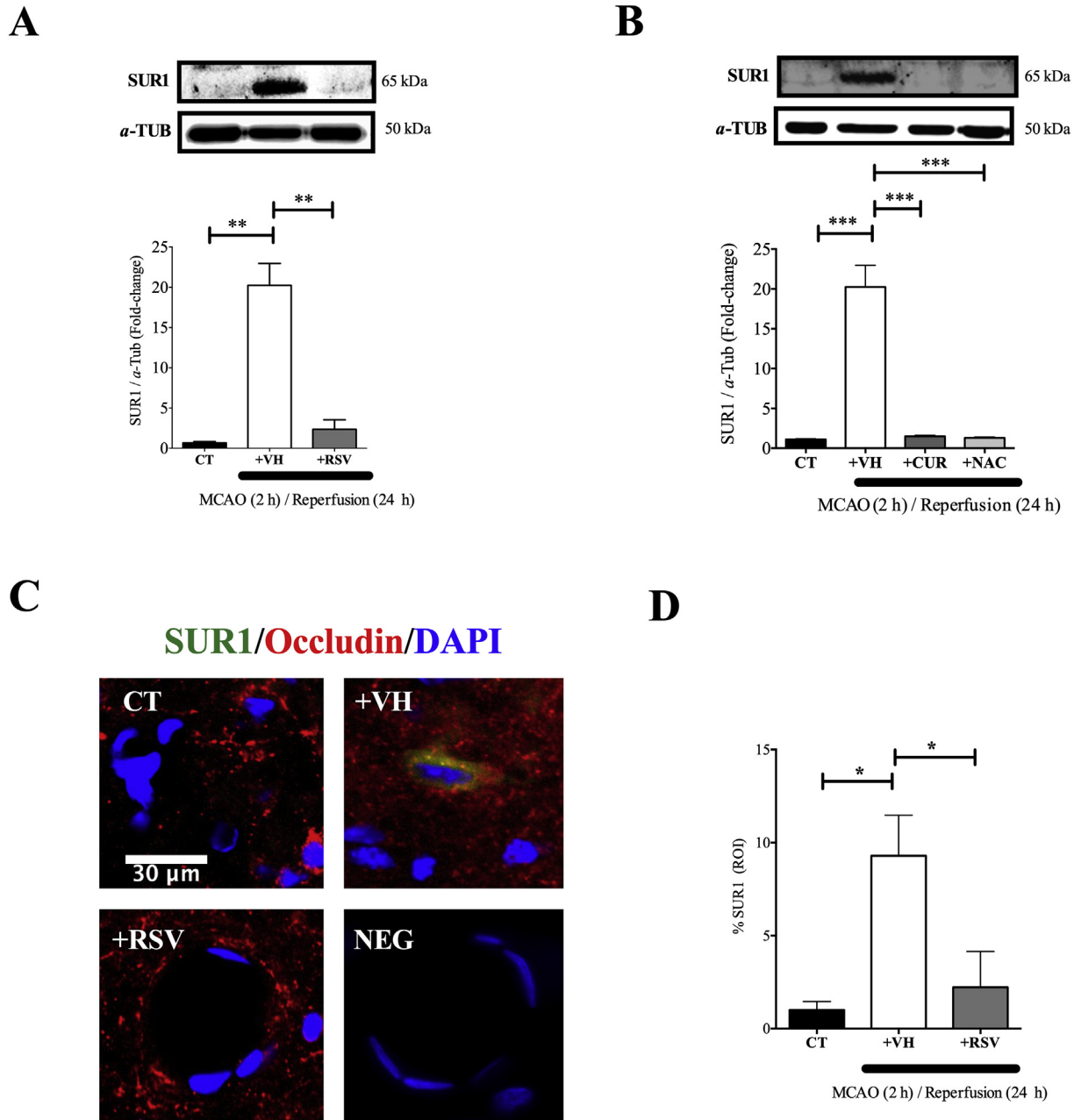
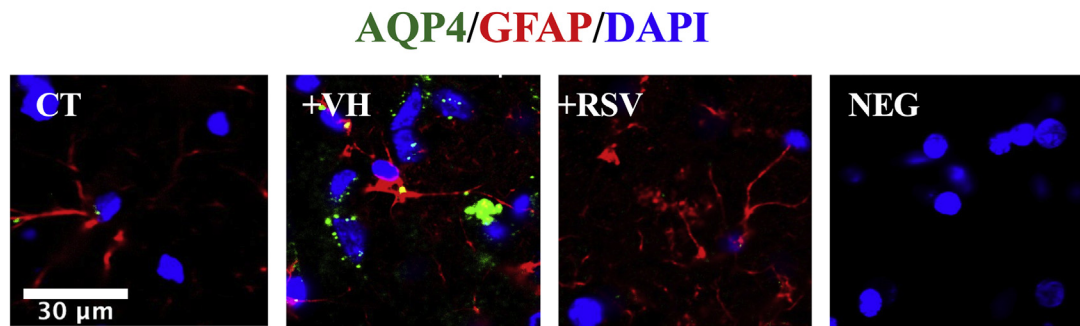
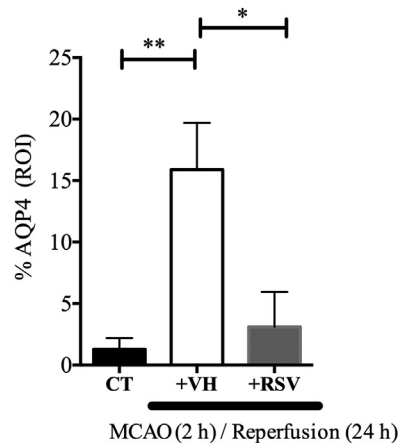


Fig. 4. Resveratrol prevents SUR1 expression induced by cerebral ischemia. Animals were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 h of reperfusion. Control animals (CT) underwent simulated MCAO. At the onset of reperfusion animals received either vehicle (+VH, ethanol 50%; i.v.) or resveratrol (+RSV, 1.9 mg/kg, body weight; i.v.) and Curcumin (+CUR) or N-Acetyl-Cysteine (+NAC) at RSV equimolar concentrations (i.v.). SUR1 expression was detected by Western blot and immunofluorescence in brain tissue. MCAO and reperfusion-induced an increase in SUR1 expression that was prevented by RSV (A). +CUR and +NAC prevented the SUR1 expression induced by MCAO and reperfusion (B). MCAO and reperfusion-induced SUR1 expression in endothelial cells. SUR1 (green), occluding (red) and nuclei (blue), NEG, control without primary antibodies (C). Fluorescence was quantified and reported in % of the co-localization of occludin and SUR1 proteins in the region of interest (ROI) (D). Values were expressed as mean \pm SD. ANOVA, Tukey, * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

A



B



C

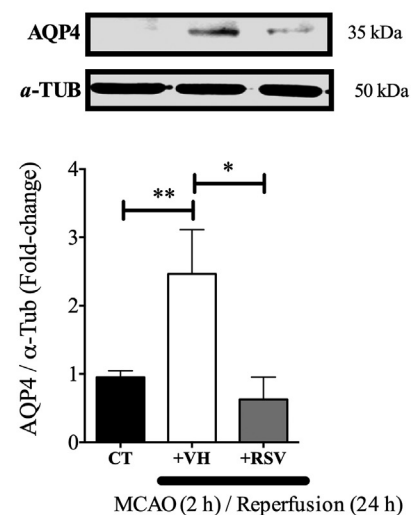


Fig. 5. Resveratrol prevents AQP4 expression induced by MCAO and reperfusion. Animals were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 h of reperfusion. Control animals (CT) underwent simulated MCAO. At the onset of reperfusion animals received either vehicle (+VH, ethanol 50%; i.v.) or resveratrol (+RSV, 1.9 mg/kg, body weight; i.v.). AQP4 expression was detected by Western blot and immunofluorescence in brain tissue. MCAO and reperfusion-induced AQP4 expression after MCAO and reperfusion (+VH), and prevented by RSV (+RSV). AQP4 (green), glial fibrillary acidic protein (GFAP, red) specific marker of astrocytes, and nuclei (blue). NEG, control without primary antibodies (A). Fluorescence was quantified and reported in % of GFAP and AQP4 co-location in the region of interest (ROI) (B). RSV prevented AQP4 expression induced after MCAO and Reperfusion (C). Values were expressed as mean \pm SD. ANOVA, Tukey, * $p < .05$, ** $p < .01$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ANOVA, $p < .05$; $n = 6$) and RSV treatment significantly prevented the MCAO-induced increased expression of SUR1 in endothelial cells (+RSV, $2.2 \pm 1.9\%$ vs. +VH; ANOVA, $p < .05$; $n = 6$) (Fig. 4 C, D).

3.9. RSV also prevents the up-regulation of AQP4 expression induced by MCAO and reperfusion

Recently, it was demonstrated that SUR1 forms heteromultimeric complexes with AQP4, which amplifies ion/water osmotic coupling in astrocytes (Stokum et al., 2018). Because both *Aqp4* and *Abcc8* promoters depend on SP1 activation (Fig. 3 A), we hypothesized that RSV might also regulate *Aqp4*. First, we performed a double immunofluorescence assay: expression of AQP4 was evaluated in glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive cells (astrocytes). After 2 h of ischemia and 24 h of reperfusion, the AQP4 level was increased; interestingly, most of the immunostaining was found in the perinuclear area. RSV treatment prevented this effect (Fig. 5 A, B). Next, we evaluated AQP4 expression by Western Blot. Similarly, we found that the MCAO and reperfusion-induced a significant increase in the AQP4 protein levels (+VH, 2.4 ± 0.64 -fold vs. CT, 0.94 ± 0.04 -fold; ANOVA, $p < .01$;

$n = 4$) (Fig. 5 C), and treatment with RSV prevented the increase in AQP4 protein level induced by MCAO and reperfusion (+VH vs. +RSV, 0.62 ± 0.18 -fold; ANOVA, $p < .05$; $n = 4$) (Fig. 5 B, C).

4. Discussion

Many studies have previously demonstrated the protective effect of RSV in pre-clinical models of ischemia (Pineda-Ramírez et al., 2018); however, its precise mechanism of action remains unknown. In the present study, we evaluated the effect of RSV on the prevention of cerebral edema formation using the MCAO model of transient focal cerebral ischemia. Our results contribute to the understanding of the mechanism involved in brain protection by antioxidants.

During ischemic stroke, the expansion of brain volume due to edema provokes an increase in intracranial pressure, that could affect the respiratory centers in the brainstem, and frequently induces tentorial herniation causing death in the majority of patients suffering from this condition (Desilles et al., 2013; Hacke et al., 1996). Coincident with these data, our findings indicated that RSV reduced edema and increased survival in rats undergoing ischemia. RSV administration

also improved the neurological performance of animals, judged by the partial functional recovery of the affected limb. This improvement could be associated with a compensatory activity that originated from the somatosensory cortex, an area involved in motor functions, such as postural control (Kaulmann et al., 2017). This region corresponds to the penumbra area, which is predominantly protected by RSV as demonstrated with the TTC staining assay.

Our central findings indicate that RSV reduced the cerebral edema through inhibition of SUR1 expression. SUR1 is the regulatory member of the SUR1-NC_{Ca-ATP} channel, which function is strongly associated with the onset of edema establishment (Simard et al., 2006). Here we showed that RSV inhibits *de novo* synthesis of SUR1 in the early hours of reperfusion, suggesting a novel mechanism of RSV action in ischemia.

Although the dose of RSV used in our research (1.9 mg/kg body weight, i.v.) was several times lower than that used in similar studies (20–200 mg/kg body weight; i.p.) (Pineda-Ramírez et al., 2018), the protective effect found was probably due to the route of administration (i.v. vs i.p. or orally) and the pharmacokinetic properties of RSV (Kapetanovic et al., 2011; Saleh et al., 2014). This route of administration might increase RSV bioavailability, allowing a greater amount of RSV to reach the tissue in its active form at the onset of reperfusion which is a critical point for generation of ROS (Peters et al., 1998). Accordingly, even with a low dose, we observed a strong protection similar to other studies that have used RSV in ischemia models (Dou et al., 2019; Fang et al., 2015; Pineda-Ramírez et al., 2018).

From the therapeutic point of view, the time and route of administration would be strategic for antioxidant compounds (Aguilera et al., 2010; Levchenkova et al., 2016; Xie et al., 2018) because reperfusion-induced in the clinic coincides with a massive production of ROS (Peters et al., 1998). Numerous cellular mechanisms are strongly influenced by the redox cell balance (Valko et al., 2007) and RSV likely acts by trapping ROS and preventing oxidation of biomolecules and also by regulating signaling pathways sensitive to oxidative stress.

We observed that CUR, a natural polyphenolic compound with potent antioxidant properties, and NAC, a by-product of glutathione, also decreased SUR1 expression. Despite the difference in bioavailability (Boyanapalli et al., 2018; Chiew et al., 2016; Kapetanovic et al., 2011), RSV, CUR, and NAC have been used in comparable concentrations *in vivo* to evaluate its protective effect against ischemia-induced damage (Huang et al., 2018; Liu et al., 2014, 2017; Uemura et al., 2018). The protective mechanism of these antioxidant compounds are shared by RSV. For instance, all regulate gene expression through inhibition of transcriptional factors sensitive to oxidative stress. Specifically, CUR and NAC decrease the activity of the transcriptional factors SP1 and NF- κ B/p65 (Chatterjee et al., 2019; García-Roman et al., 2008), which are essential in the expression of SUR1 and AQP4 (Simard et al., 2012; Umenishi and Verkman, 1998; Wang et al., 2015; Woo et al., 2012). Importantly, NAC and CUR prevent the formation of cerebral edema (Chen et al., 2008; Wang et al., 2015). Although, the concentration used in our work have not been tested previously, data support that NAC, CUR, and RSV regulate SUR1 expression in cerebral ischemia probably through similar mechanisms.

Previously, it was reported that blocking the Na⁺ influx through the SUR1-NC_{Ca-ATP} channel by constant infusion of glibenclamide (a potent SUR1 receptor inhibitor) results in significant protection against ischemia in rodents (Simard et al., 2012, 2006). Glibenclamide reduces edema, mortality, and the functional deficit induced by cerebral ischemia (Sheth et al., 2016). In humans, glibenclamide has been explored as a treatment to reduce edema after brain injuries including ischemic stroke (Caffes et al., 2015; Simard et al., 2009, 2014).

Recently, glibenclamide reformulated for intravenous injection, known as BIIB093, has been tested in patients with large hemispheric infarction showing the potential to reduce brain swelling (Pergakis et al., 2019). Outstandingly, radioligand binding assays have demonstrated that RSV can specifically bind to SUR (1 and 2B) and displace binding of glibenclamide, suggesting structural analogies between them

(Hambrock et al., 2007). Nevertheless, the functionality of these two molecules is different; consequently, RSV binding site could share some parts of the glibenclamide-binding site but possible not to be completely identical. Additionally, RSV might have the ability to interact with other proteins and activate alternative mechanisms to induce protection in ischemia such as those dependent on its antioxidant capability.

The *Abcc8* gene, which encodes for SUR1 contains in its promoter multiple binding sites for the transcription factor SP1 (Hernández-Sánchez et al., 1999). This is the principal inducer of SUR1 expression under ischemia and hypoxia (Simard et al., 2006; Woo et al., 2012). SP1 favors gene expression under oxidative stress conditions suggesting that antioxidants could regulate its activity (Hota et al., 2010). Here, we demonstrate that RSV reduced SP1 binding activity after MCAO, advising that is involved in SUR1 mRNA down-regulation during reperfusion. Because RSV action on SP1 had not been described, it could be associated with its antioxidant activity but also with its direct interaction with SP1 (Lee et al., 2012). Therefore, the precise mechanism requests a further investigation.

Interestingly, comparable to the *Abcc8* promoter, *Aqp4* and promoters of genes coding for proteins involved in BBB damage [e. g. matrix metalloproteinases (MMP)] also contain several binding sites for SP1 (Murthy et al., 2012; Umenishi and Verkman, 1998). For instance, AQP4 is the most abundant water-permeable channel found in the mammalian cells whose transcription depends on oxidative stress (Bi et al., 2017; Nielsen et al., 1997). AQP4 contributes to edema formation and it is likely that the effect of RSV on AQP4 expression contributes to edema reduction after stroke (Amiry-Moghaddam et al., 2004; Bi et al., 2017). Accordingly, the interaction between SUR1 and AQP4 accelerates the transmembrane Na⁺ and water transport promoting cellular swelling (Stokum et al., 2018).

In the case of MMP9, the protein is overexpressed during ischemia and is responsible for BBB opening during stroke due to the degradation of the complex junctional proteins between endothelial cells (Roach et al., 2002; Wei et al., 2015; Zeng et al., 2018). During cerebral ischemia, the imbalance in the expression of MMP-9 and its inhibitor (TIMP-1) is responsible for the rupture of the BBB (Roach et al., 2002). RSV and CUR inhibit the MMP9 expression and mitigate the BBB dysfunction after ischemic stroke; therefore, RSV might improve the balance of MMP-9/TIMP-1 in terms of their expressions and activities (Li et al., 2017; Wei et al., 2015). In agreement with these studies, we found that RSV reduces Evans blue extravasation, confirming that treatment prevents disruption of the BBB. Therefore, the participation of RSV on edema formation might be associated with different mechanisms, including regulation of water influx but also on the regulation of molecules that affect the integrity of the BBB directly.

Finally, TRPM4 is also up-regulated in cells of the neurovascular unit in experimental rat models of stroke (Simard and Gerzanich, 2007; Chen et al., 2019; Gerzanich et al., 2009; Loh et al., 2014; Mehta et al., 2016). Injection of an antibody that recognizes and blocks TRPM4 after ischemia and reperfusion in rats reduces the mortality, the infarct, and the Evans blue leakage (Chen et al., 2019). Since SUR1 expression also influences the TRPM4 function, treatment with RSV could reduce the damage after stroke through the inhibition of SUR1-NC_{Ca-ATP} channel activity or regulation of TRPM4 expression. In this way, we are planning further studies with specific electrophysiological approaches to elucidate the functionality of the channel and the expression of the protein.

Although RSV's mechanism of action has not been described in detail, activation of multiple processes have been reported in several models of cerebral ischemia (Pineda-Ramírez et al., 2018). By instance, RSV activates the silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) and the AMP-activated protein kinase (AMPK) inducing protection against the injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through SIRT1-dependent autophagy activity (He et al., 2017; Pineda-Ramírez et al., 2020; Wan et al., 2016). Likewise, RSV decreases

mitochondrial damage (Yousuf et al., 2009), an important fact which stimulates the restoration of the physiological levels of ATP and improves the cellular capacity to regulate the function of several proteins including SUR1 (Simard et al., 2006). Additionally, RSV alters DNA methylation, regulates histone modification (acetylation, methylation and phosphorylation), and modulates miRNA expression, showing to be a potent epigenetic modifier that play an important role during disease development (Khoury et al., 2019). Interestingly, RSV also regulates inflammation through modulation of NF- κ B/p65 to induce protection. This transcription factor is increased in MCAO (Carroll et al., 1998) and is involved in regulation of AQP4 expression (Wang et al., 2015). Together, these data show the complexity of RSV effects and the possible crosslinking of its mechanism of action.

5. Conclusion

Current treatments to control cerebral edema formation are limited to osmotic therapies and craniotomy; therefore, regulation of ion channel activity involved in the initial phase of edema formation represents a valuable therapeutic alternative. Several studies indicate that RSV provides an environment suitable to reduce the transcription of genes involved in BBB integrity during ischemia. Notably, in our model, we demonstrated that RSV effectively reduces the cerebral edema when is administrated at the onset of reperfusion due to regulation of SUR1 and AQP4 expression, possibly due to its antioxidant properties. Therefore, although additional data are needed to endorse its use in clinical trials, the low toxicity of RSV support it's suitably for therapeutic use in stroke.

Acknowledgments

This work was supported by Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" and CONACYT (grant CB-2012-01-182266 to P. A.). We also acknowledge financial support by CANIFARMA Award 2019. Iván Mijail Alquisiras Burgos is a Ph. D. student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and beneficiary of scholarship No. 275610 from CONACYT. We are grateful to Dr. Arturo Hernández-Cruz for valuable comments to the manuscript.

References

Aguilera, P., Chanez-Cardenas, M.E., Ortiz-Plata, A., Leon-Aparicio, D., Barrera, D., Espinoza-Rojo, M., Villeda-Hernández, J., Sanchez-Garcia, A., Maldonado, P.D., 2010. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine* 17, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.06.004>.

Amiry-Moghaddam, M., Frydenlund, D.S., Ottersen, O.P., 2004. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129, 997–1008. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.049>.

Ashcroft, F.M., Gribble, F.M., 2000. New windows on the mechanism of action of K ATP channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 439–445. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01563-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01563-7).

Ashfield, R., Ashcroft, S.J.H., 1998. Cloning of the promoters for the β -cell ATP-sensitive K-channel subunits Kir6.2 and SUR1. *Diabetes* 47, 1274–1280. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.8.1274>.

Ataie, A., Shadifar, M., Ataee, R., 2016. Review paper: polyphenolic antioxidants and neuronal regeneration. *Basic Clin. Neurosci.* 7, 81–90. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070201>.

Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493–506. <https://doi.org/10.1038/nrd2060>.

Bi, C., Tham, D.K.L., Perronnet, C., Joshi, B., Nabi, I.R., Moukles, H., 2017. The oxidative stress-induced increase in the membrane expression of the water-permeable channel Aquaporin-4 in astrocytes is regulated by Caveolin-1 phosphorylation. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00412>.

Boyanapalli, S.S.S., Huang, Y., Su, Z., Cheng, D., Zhang, C., Guo, Y., Rao, R., Androulakis, I.P., Kong, A.N., 2018. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin in regulating anti-inflammatory and epigenetic gene expression. *Biopharm. Drug Dispos.* 39, 289–297. <https://doi.org/10.1002/bdd.2136>.

Caffes, N., Kurland, D.B., Gerzanich, V., Marc Simard, J., 2015. Glibenclamide for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 4973–4984. <https://doi.org/10.3390/ijms16034973>.

Carroll, J.E., Howard, E.F., Hess, D.C., Wakade, C.G., Chen, Q., Cheng, C., 1998. Nuclear factor- κ B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment. *Mol. Brain Res.* 56, 186–191. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00045-X).

Chatterjee, B., Ghosh, K., Suresh, L., Kanade, S.R., 2019. Curcumin ameliorates PRMT5-MEP50 arginine methyltransferase expression by decreasing the Sp1 and NF-YA transcription factors in the A549 and MCF-7 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 455, 73–90. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3471-0>.

Chen, G., Shi, J., Hu, Z., Hang, C., 2008. Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine. *Mediat. Inflamm.* 2008, 14–21. <https://doi.org/10.1155/2008/716458>.

Chen, B., Gao, Y., Wei, S., Low, S.W., Ng, G., Yu, D., Tu, T.M., Soong, T.W., Niluis, B., Liao, P., 2019. TRPM4-specific blocking antibody attenuates reperfusion injury in a rat model of stroke. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 1455–1466. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02326-8>.

Chiew, A.L., Isbister, G.K., Duffull, S.B., Buckley, N.A., 2016. Evidence for the changing regimens of acetylcysteine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 471–481. <https://doi.org/10.1111/bcp.12789>.

Davis, S.M., Pennypacker, K.R., 2017. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochem. Int.* 107, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.007>.

Desilles, J.-P., Rouchaud, A., Labreuche, J., Meseguer, E., Laissy, J.-P., Serfaty, J.-M., Lapergue, B., Klein, I.F., Guidoux, C., Cabrejo, L., Sirimarco, G., Lavallee, P.C., Claeys, E.S., Amarenco, P., Mazighi, M., 2013. Blood-brain barrier disruption is associated with increased mortality after endovascular therapy. *Neurology* 80, 844–851. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828406de>.

Dou, Z., Rong, X., Zhao, E., Zhang, L., Lv, Y., 2019. Neuroprotection of resveratrol against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice through a mechanism targeting gut-brain Axis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 883–898. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00687-3>.

Fang, L., Gao, H., Zhang, Weina, Zhang, Wenjie, Wang, Y., 2015. Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 3219–3226.

Fernandes, G.F.S., Silva, G.D.B., Pavan, A.R., Chiba, D.E., Chin, C.M., Dos Santos, J.L., 2017. Epigenetic regulatory mechanisms induced by resveratrol. *Nutrients* 9, 1–27. <https://doi.org/10.3390/nu911201>.

García-Roman, R., Salazar-González, D., Rosas, S., Arellanes-Robledo, J., Beltrán-Ramírez, O., Fattel-Fazenda, S., Villa-Treviño, S., 2008. The differential NF- κ B modulation by S-adenosyl-L-methionine, N-acetylcysteine and quercetin on the promotion stage of chemical hepatocarcinogenesis. *Free Radic. Res.* 42, 331–343. <https://doi.org/10.1080/10715760802005169>.

Gerzanich, V., Woo, S.K., Vennekens, R., Tsybalyuk, O., Ivanova, S., Ivanov, A., Geng, Z., Chen, Z., Niluis, B., Flockerzi, V., Freichel, M., Simard, J.M., 2009. De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. *Nat. Med.* 15, 185–191. <https://doi.org/10.1038/nm.1899>.

Gorogawa, S.I., Fujitani, Y., Kaneto, H., Hazama, Y., Watada, H., Miyamoto, Y., Takeda, K., Akira, S., Magnuson, M.A., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., Hori, M., 2004. Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic β -cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1159–1170. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.095>.

Gülçin, I., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: a structure-activity insight. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>.

Hacke, W., Schwab, S., Horn, M., Spranger, M., De Georgia, M., Von Kummer, R., 1996. "Malignant" middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch. Neurol.* 53, 309–315. <https://doi.org/10.1001/archneur.1996.00550040037012>.

Hambrock, A., Franz, C.B.D.O., Hiller, S., Grenz, A., Ackermann, S., Schulze, D.U., Drews, G., Osswald, H., 2007. Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J. Biol. Chem.* 282, 3347–3356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608216200>.

He, Q., Li, Z., Wang, Y., Hou, Y., Li, L., Zhao, J., 2017. Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction. *Int. Immunopharmacol.* 50, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.029>.

Hernández-Sánchez, C., Ito, Y., Ferrar, J., Reitman, M., LeRoith, D., 1999. Characterization of the mouse sulfonylurea receptor 1 promoter and its regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 18261–18270. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18261>.

Hota, S.K., Hota, K.B., Prasad, D., Ilavazhagan, G., Singh, S.B., 2010. Oxidative-stress-induced alterations in Sp factors mediate transcriptional regulation of the NR1 subunit in hippocampus during hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.027>.

Hu, H.J., Song, M., 2017. Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 26, 2706–2719. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.011>.

Huang, L., Chen, C., Zhang, X., Li, X., Chen, Z., Yang, C., Liang, X., Zhu, G., Xu, Z., 2018. Neuroprotective effect of curcumin against cerebral ischemia-reperfusion via mediating autophagy and inflammation. *J. Mol. Neurosci.* 64, 129–139. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1006-x>.

Kapetanovic, I.M., Muzzio, M., Huang, Z., Thompson, T.N., McCormick, D.L., 2011. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 593–601. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1525-4>.

Kaulmann, D., Hermsdörfer, J., Johansen, L., 2017. Disruption of right posterior parietal cortex by continuous Theta burst stimulation alters the control of body balance in

- quiet stance. *Eur. J. Neurosci.* 45, 671–678. <https://doi.org/10.1111/ejn.13522>.
- Khoury, N., Xu, J., Stiegelmann, S.D., Jackson, C.W., Koronowski, K.B., Dave, K.R., Young, J.I., Perez-Pinzon, M.A., 2019. Resveratrol preconditioning induces genomic and metabolic adaptations within the long-term window of cerebral ischemic tolerance leading to bioenergetic efficiency. *Mol. Neurobiol.* 56, 4549–4565. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1380-6>.
- Kim, J.-W., Seghers, V., Cho, J.-H., Kang, Y., Kim, S., Ryu, Y., Baek, K., Aguilar-Bryan, L., Lee, Y.-D., Bryan, J., Suh-Kim, H., 2002. Transactivation of the mouse sulfonylurea receptor I gene by BETA2/NeuroD. *Mol. Endocrinol.* 16, 1097–1107. <https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0934>.
- Lee, K.A., Lee, Yong Jin, Ban, J.O., Lee, Yoon Jin, Lee, S.H., Cho, M.K., Nam, H.S., Hong, J.T., Shim, J.H., 2012. The flavonoid resveratrol suppresses growth of human malignant pleural mesothelioma cells through direct inhibition of specificity protein 1. *Int. J. Mol. Med.* 30, 21–27. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.978>.
- Levchenkova, O.S., Novikov, V.E., Parfenov, E.A., Kulagin, K.N., 2016. Neuroprotective effect of antioxidants and moderate hypoxia as combined preconditioning in cerebral ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 162, 211–214. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3578-9>.
- Li, W., Suwanwela, N.C., Patumraj, S., 2017. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression. *Mol. Med. Rep.* 16, 4710–4720. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7205>.
- Liu, L., Zhang, W., Wang, L., Li, Y., Tan, B., Lu, X., Deng, Y., Zhang, Y., Guo, X., Mu, J., Yu, G., 2014. Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis. *Neurochem. Res.* 39, 1322–1331. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1315-1>.
- Liu, Y., Liu, W.C., Sun, Y., Shen, X., Wang, X., Shu, H., Pan, R., Liu, C.F., Liu, W., Liu, K.J., Jin, X., 2017. Normobaric Hyperoxia extends neuro- and Vaso-protection of N-acetylcysteine in transient focal ischemia. *Mol. Neurobiol.* 54, 3418–3427. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9932-0>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Loh, K.P., Ng, G., Yu, C.Y., Fhu, C.K., Yu, D., Vennekens, R., Nilius, B., Soong, T.W., Liao, P., 2014. TRPM4 inhibition promotes angiogenesis after ischemic stroke. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 466, 563–576. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1347-4>.
- Longa, E.Z., Weinstein, P., Carlson, S., Cummins, R., 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 (1), 84–91.
- Lopez, M.S., Dempsey, R.J., Vemuganti, R., 2015. Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury. *Neurochem. Int.* 89, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.009>.
- Manaenko, A., Chen, H., Kammer, J., Zhang, J.H., Tang, J., 2011. Comparison Evans blue injection routes: intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood–brain barrier in a mice hemorrhage model. *Animals* 195, 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.013.Comparison>.
- Mehta, R.L., Tosun, C., Ivanova, S., Famakin, B.M., Kwon, M.S., Rudy, J., Gerzanich, V., Simard, J.M., 2016. Sur1-Trpm4 cation channel expression in human cerebral infarcts. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 835–849. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000223.Sur1-Trpm4>.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H., Iadecola, C., 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181–198. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.002>.
- Murthy, S., Ryan, A.J., Carter, A. Brent, 2012. SP-1 regulation of MMP-9 expression requires serine-586 in the PEST domain. *Biochem. J.* 445, 229–236. <https://doi.org/10.1042/BJ20120053>.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 171–180.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2007th Ed. Pergakis, M., Badjatia, N., Chaturvedi, S., Cronin, C.A., Kimberly, W.T., Sheth, K.N., Simard, J.M., 2019. BIB093 (IV glibenclamide): an investigational compound for the prevention and treatment of severe cerebral edema. *Expert Opin. Investig. Drugs* 1. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1681967>.
- Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., Dirnagl, U., 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 196–205. <https://doi.org/10.1097/00004647-199802000-00011>.
- Pineda-Ramírez, N., Gutiérrez Aguilar, G.F., Espinoza-Rojo, M., Aguilera, P., 2018. Current evidence for AMPK activation involvement on resveratrol-induced neuroprotection in cerebral ischemia. *Nutr. Neurosci.* 21, 229–247. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1284361>.
- Pineda-Ramírez, N., Alquisiras-Burgos, I., Ortiz-Plata, A., Ruiz-Tachiquín, M.E., Espinoza-Rojo, M., Aguilera, P., 2020. Resveratrol activates neuronal autophagy through AMPK in the ischemic brain. *Mol. Neurobiol.* 57, 1055–1069. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01803-6>.
- Ramos, A., Chi Ho, W., Forte, S., Dickson, K., Boutilier, J., Favell, K., Barker, P.A., 2007. Hypo-Osmolar stress induces p75NTR expression by activating Sp1-dependent transcription. *J. Neurosci.* 27, 1498–1506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4806-06.2007>.
- Rasband, W.S., 1997. *ImageJ*. U. S. Natl. Institutes Heal, Bethesda, Maryland, USA.
- Roach, D.M., Fitridge, R.A., Laws, P.E., Millard, S.H., Varelias, A., Cowled, P.A., 2002. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 23, 260–269. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1598>.
- Roof, R.L., Schielke, G.P., Ren, X., Hall, E.D., 2001. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 32, 2648–2657. <https://doi.org/10.1161/hs1101.097397>.
- Saleh, M.C., Connell, B.J., Rajagopal, D., Khan, B.V., Abd-El-Aziz, A.S., Kucukkaya, I., Saleh, T.M., 2014. Co-administration of resveratrol and lipoic acid, or their synthetic combination, enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087865>.
- Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M., Schaffner, W., 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with “mini-extracts”, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6419. <https://doi.org/10.1093/nar/17.15.6419>.
- Sheth, K.N., Elm, J.J., Beslow, L.A., Sze, G.K., Kimberly, W.T., 2016. Glyburide advantage in malignant edema and stroke (GAMES-RP) trial: rationale and design. *Neurocrit. Care* 24, 132–139. <https://doi.org/10.1007/s12028-015-0189-7>.
- Simard, J. Marc, Tarasov, K. V., Gerzanich, V., 2007. Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 947–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.004>.
- Simard, J.M., Chen, M., Tarasov, K.V., Bhatta, S., Ivanova, S., Melnitchenko, L., Tsybalyuk, N., West, G.A., 2006. Newly expressed SUR1-regulated NCCa-ATP channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat. Med.* 12, 433–440. <https://doi.org/10.1038/nm1390.Newly>.
- Simard, J. Marc, Kent, T.A., Chen, M., Tarasov, V.K., Gerzanich, V., 2007. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol.* 6, 258–268.
- Simard, J.M., Yurovsky, V., Tsybalyuk, N., Melnitchenko, L., Ivanova, S., Gerzanich, V., 2009. Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke. *Stroke* 40, 604–609. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.522409>.
- Simard, J.M., Woo, S.K., Schwartzbauer, G.T., Gerzanich, V., 2012. Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1699–1717. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.91>.
- Simard, J.M., Kimberly, W.T., Stern, B., del Zoppo, G., Jacobson, S., Gerzanich, V., 2014. Glibenclamide in cerebral ischemia and stroke. *Neurocrit. Care* 20, 319–333. <https://doi.org/10.1007/s12028-013-9923-1.Glibenclamide>.
- Stokum, J.A., Gerzanich, V., Simard, J.M., 2016. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 513–538. <https://doi.org/10.1177/0271678X15617172>.
- Stokum, J.A., Kwon, M.S., Woo, S.K., Tsybalyuk, O., Vennekens, R., Gerzanich, V., Simard, J.M., 2018. SUR1-TRPM4 and AQP4 form a heteromultimeric complex that amplifies ion/water osmotic coupling and drives astrocyte swelling. *Glia* 66, 108–125. <https://doi.org/10.1002/glia.23231>.
- Uemura, T., Watanabe, K., Ko, K., Higashi, K., Kogure, N., Kitajima, M., Takayama, H., Takao, K., Sugita, Y., Sakamoto, A., Terui, Y., Toida, T., Kashiwagi, K., Igarashi, K., 2018. Protective effects of brain infarction by N-acetylcysteine derivatives. *Stroke* 49, 1727–1733. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021755>.
- Umenishi, F., Verkman, A.S., 1998. Isolation and functional analysis of alternative promoters in the human aquaporin-4 water channel gene. *Genomics* 50, 373–377. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5337>.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Wan, D., Zhou, Y., Wang, K., Hou, Y., Hou, R., Ye, X., 2016. Resveratrol provides neuroprotection by inhibiting phosphodiesterases and regulating the cAMP/AMPK/SIRT1 pathway after stroke in rats. *Brain Res. Bull.* 121, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.011>.
- Wang, B.F., Cui, Z.W., Zhong, Z.H., Sun, Y.H., Sun, Q.F., Yang, G.Y., Bian, L.G., 2015. Curcumin attenuates brain edema in mice with intracerebral hemorrhage through inhibition of AQP4 and AQP9 expression. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 939–948. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.47>.
- Wei, H., Wang, S., Zhen, L., Yang, Q., Wu, Z., Lei, X., Lv, J., Xiong, L., Xue, R., 2015. Resveratrol attenuates the blood-brain barrier dysfunction by regulation of the MMP-9/TIMP-1 balance after cerebral ischemia reperfusion in rats. *J. Mol. Neurosci.* 55, 872–879. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0441-1>.
- Woo, S.K., Kwon, M.S., Geng, Z., Chen, Z., Ivanov, A., Bhatta, S., Gerzanich, V., Simard, J.M., 2012. Sequential activation of hypoxia-inducible factor 1 and specificity protein 1 is required for hypoxia-induced transcriptional stimulation of Abcc8. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 525–536. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.159>.
- Woo, S.K., Kwon, M.S., Ivanov, A., Gerzanich, V., Simard, J.M., 2013. The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (Trpm4) channel. *J. Biol. Chem.* 288, 3655–3667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428219>.
- Xie, C.-J., Gu, A.-P., Cai, J., Wu, Y., Chen, R.-C., 2018. Curcumin protects neural cells against ischemic injury in N2a cells and mouse brain with ischemic stroke. *Brain Behav.* 8, e00921. <https://doi.org/10.1002/brb3.921>.
- Yousuf, S., Atif, F., Ahmad, M., Hoda, N., Ishrat, T., Khan, B., Islam, F., 2009. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res.* 1250, 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.068>.
- Zeng, G., Ding, W., Li, Y., Sun, M., Deng, L., 2018. Morroniside protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuron apoptosis and MMP2/9 expression. *Exp. Ther. Med.* 16, 2229–2234. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6457>.

ANEXO III



UNAM
La Universidad
de la Nación



Universidad Nacional Autónoma de México
Postgraduate in Biomedical Sciences

Student

cDr. Iván Mijaíl Alquisiras Burgos

Research stay report

*Effect of resveratrol on blood brain barrier
repair in a model of global cerebral ischemia*

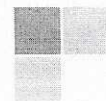


Dra. Penélope Aguilera

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"



Dra. Rubia Maria Weffort de Oliveira
Maringa State University



Introduction

Cerebral vascular disease is a neurological alteration produced by a pathological process of blood vessels and characterized by an abrupt decrease in cerebral blood flow (Díez Tejedor, 2004). In ischemic infarctions, occlusion of a cerebral artery results in reduced oxygen and glucose supply to the tissue. Under these conditions, glycolysis and oxidative phosphorylation are inhibited, leaving brain cells unable to maintain their ATP levels (Lipton, 1999). The repercussions associated with the energy failure are multiple; among these, we can highlight the alteration of the processes that depend on ionic homeostasis. Such is the case of the blood brain barrier (BBB) function, which is affected as a natural part of the evolution of the ischemic lesion and which has associated endothelial dysfunction and the formation of cerebral edema (Moskowitz, Lo, & Iadecola, 2010)

Cerebral edema is the main cause of neurological deterioration and death in patients with cerebral infarction. Currently, treatments to prevent edema are restricted to osmotic therapies and craniectomy, which have adverse side effects. The edema formation begins with the dysfunction of the cells of the cerebral vascular endothelium, which make up the BBB. In the initial phase a molecular heterocomplex is involved, this consists of 3 components: a water channel, aquaporin 4 (AQP4), a Na⁺ channel (TRPM4) and the regulatory subunit of TRPM4, the sulfonylurea 1 receptor (SUR1) (Simard, Kent, Chen, Tarasov V., & Gerzanich, 2007). The uncontrolled opening of the SUR1-TRPM4-AQP4 complex is associated with excessive Na⁺ influx, which is accompanied by an influx of Cl⁻ and H₂O, resulting in cell swelling (cytotoxic edema) and necrosis. The death of the cells of the cerebral vascular endothelium implies the evolution of edema towards the vasogenic type, in which there is the passage of proteins to the cerebral parenchyma and even the progression towards hemorrhagic edema, where leukocyte infiltration favors the inflammatory process and it causes the death of other cell types such as neurons and astrocytes. This process usually occurs in minutes, hours and even days after vessel occlusion, depending in part on the vulnerability of the brain region and the degree of residual perfusion (Stokum, Gerzanich, & Simard, 2016).

Recently, we observed in a model of transient cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) that intravenous administration of resveratrol drastically inhibits the expression of the sulfonylurea 1 (SUR1) receptor in the brain. This protein is expressed *de novo* during cerebral ischemia due to oxygen deprivation and the increase in the production of reactive oxygen species (ROS). This data suggest that resveratrol prevents the formation of cerebral edema by interfering with the function of the complex. Therefore, it was relevant to describe the effect of resveratrol on the expression and association of other proteins that make up the complex during ischemia. In this context, our objective was to evaluate the effect of resveratrol on the expression of AQP4 and damage to the blood brain barrier in a model of transient global cerebral ischemia.

Methods

Animals. A total of 18 young adult, male Wistar rats (inbred strain, 3 - 4 months of age, 320 - 400 g body weight) were acquired from the local vivarium of the State University of Maringá (Paraná, Brazil). Six of these rats underwent sham surgery (controls), and 12 were subjected to TGCI. The rats were housed at a controlled temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 12-hour alternating light-dark cycle (lights on at 07:00 hours). The animals had free access to tap water and a standard commercial chow diet containing carbohydrate (660 g/kg), protein (230 g/kg), fat (40 g/kg), fiber (60 g/kg), and vitamins plus minerals (10 g/kg) (NutrilabCR1; Nuvital Nutrients, Curitiba, Paraná, Brazil). The experimental procedures used were adhered to the ethical principles of the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the State University of Maringá, Paraná, Brazil.

Ischemia. Transient, global cerebral ischemia was induced by using the 4-vessel occlusion (4-VO) technique (Pulsinelli & Brierley, 1979) with modifications. The rats were anesthetized with a halothane/oxygen mixture delivered through a universal vaporizer to a face mask affixed to the rat's nose that allowed the rat to breathe freely. The flow of oxygen was maintained at a constant rate of 1.5 L/min. The halothane/oxygen mixture delivered to the animal was previously calibrated to the minimal level required for effective anesthesia

(evaluated by pinching the animal's tail). The animal was fixed in a stereotaxic framework with the head tilted down at approximately 30° to the horizontal, and the vertebral arteries were bilaterally electrocoagulated at the level of the first cervical vertebrae. To avoid the risk of defective occlusion, the vertebral arteries were firstly severed using the tip of a unipolar electrode that was gently rotated within the alar foramen until bleeding was produced and then immediately stanching by electrocoagulation. Afterward, a midline incision at the ventral neck exposed the common carotid arteries, which were loosely snared with a silk thread. The rat was returned to its cage to recover from anesthesia for 5 to 6 hours, after which the carotid artery thread was carefully tightened for 15 minutes. Throughout occlusion (15 min) and during the first hour of reperfusion, the rats were maintained in the warming box (Seif el Nasr, Nuglisch, & Krieglstein, 1992). Loss of righting reflex within 2 minutes of carotid occlusion and unresponsiveness to gentle touch, mydriasis, and tonic extension of the paws were considered indicative of effective ischemia. Rectal temperature was monitored with a digital thermometer (Minipa, APPA MT-520, São Paulo, São Paulo, Brazil) reperfusion was allowed for 24 and 72 h. Sham-operated animals were subjected to the same surgical intervention, except that both the vertebral and carotid arteries were left intact. Occlusion of the vertebral arteries alone does not affect brain perfusion.

Treatment. Resveratrol (SIGMA, R5010; 1.8 mg/kg; ethanol 50%, i.p) was administered at the beginning of reperfusion in animals. Resveratrol was dissolved in ethanol (0.01%) at a final concentration of 100 µM.

Evaluation of BBB permeability. Evans blue (2%) diluted in saline was given at the start of reperfusion (4 mL/kg; i.v.) according to the method of (Manaenko, Chen, Kammer, Zhang, & Tang, 2011). Evans blue circulation was allowed for 24 h. After, animals were anesthetized with thiopental (50 mg/Kg; i. p) and perfused transcardially with 0.9 % saline followed by a fixative solution of paraformaldehyde 4 % (20 mL/min for 7 - 10 minutes). After decapitation, brain was dissected and maintained in a 4 % paraformaldehyde solution for 2 h; then, transferred to a 30 % sucrose solution diluted in 0.2 M PBS until the tissue remains at the bottom. Immediately, the tissue was immersed in a solution of hexane to protect the brain tissue during freezing and cooled with liquid nitrogen for 3 min. Brains were kept at -

20° C until use. Fifty µm slices were made using a freezing cryostat, the sections were stored in a PBS solution with 0.01% Na azide at 4° C until use.

Immunofluorescence. Tissue sections were washed in PBS with 0.1 % Triton X-100 with mild agitation. The blocking procedure was performed with 5 % BSA + 0.1 % Triton X-100 dissolved in PBS for 1 hour. Then, were incubated overnight in a humid chamber at 4° C with primary antibody (AQP4 1:200 and GFAP 1:500) diluted in PBS with 1 % BSA + 0.1 % Triton X-100. The tissue sections were washed 5 times with PBS + 0.5 % BSA. Then, sections were incubated with antibody anti-mouse IgG conjugated with Alexa 488 (1: 250) and anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 594 diluted in PBS with 0.05 % Tween 20 for 2 hours and washed with PBS + 0.5 % BSA. Then, sections were incubated with DAPI for 15 minutes and washed with PBS with 0.02 % Tween 20. Finally, Mowiol was used as a mounting medium.

Image acquisition and analysis. To assess the permeability of the BBB blood vessels of the cortex were photographed. For extravasation of Evans blue was detected with the far red filter 670 nm. GFAP and AQP4 were detected with filters 594 nm and 488 nm, respectively. Fluorescence was detected with an inverted microscope using a 20X dry objective (Olympus model 1X71, Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) at the microscopy unit of the biomedical research institute of the UNAM. Imaging analysis was performed with Image J software 1.8.0 as follows: 1) Channels were separated with the Split Channels function, and 2) The area of interest was selected with the *ROI manager* function and the mean of fluorescence of each picture was measured.

Results

4VO/reperfusion induces an increase in AQP4 expression and damage to the BBB. To evaluate the effect of 4VO and reperfusion on the integrity of the BBB, Evans blue extravasation was measured using a fluorescence technique. We found that under control conditions, Evans blue extravasation was minimal with a value of 0.14 ± 0.027 . On the other hand, 15 min of 4VO followed by 24 and 72 h of reperfusion triggered a gradual increase in

extravasation of Evan's blue with values of 1.36 ± 0.32 and 2.58 ± 0.69 , respectively. Interestingly, these result coincides with the gradual increase in AQP4 expression. We found that after 24 h of reperfusion AQP4 increased its expression to 0.38 ± 0.07 , reaching its maximum level after 72 h of reperfusion (0.64 ± 0.25), a value statistically significant with respect to the control group (0.07 ± 0.03) (ANOVA, $p < 0.05$ vs CT). In addition, gliosis increased after 24 h of reperfusion to 6.1 ± 0.6 and reaches its maximum value after 72 h of reperfusion (12.84 ± 2.3), this value was statistically significant with respect to the control group (3.7 ± 0.4) (ANOVA, $p < 0.05$ vs CT).

Resveratrol reduces AQP4 expression and damage to the BBB induced by 4VO/reperfusion. To evaluate the protective effect of resveratrol against the BBB damage induced by cerebral ischemia, BBB permeability properties were examined by Evans blue extravasation 24 h post- 4VO. Interestingly, we found that the administration of resveratrol in the group (+ RSV) reduced Evans blue extravasation to 0.27 ± 0.09 respect to the +VH group (1.36 ± 0.32) (Figure 2 C). Likewise, a single dose of resveratrol reduced AQP4 expression to 0.11 ± 0.04 respect to the +VH group (0.38 ± 0.07) (ANOVA, $p < 0.05$) (Figure 2D). Finally, to evaluate the protective effect of RSV, we measured the expression of the GFAP protein as a sign of gliosis. We found that the administration of RSV did not change GFAP expression, with values of 6.3 ± 0.97 vs 6.1 ± 0.6 for the +VH group (Figure 2 B).

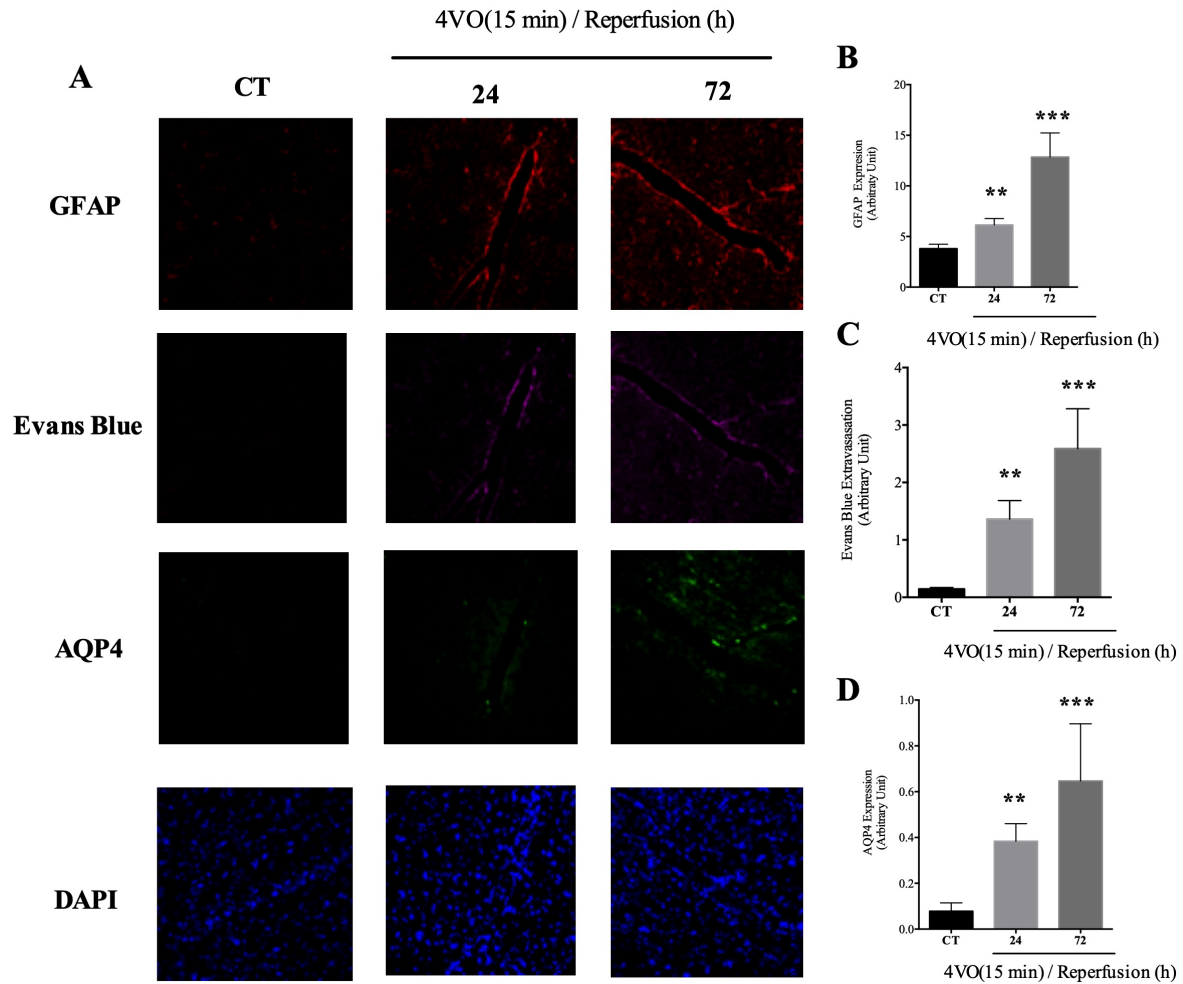


Figure 1. 4VO/reperfusion induces an increase in AQP4 expression and damage to the blood brain barrier. Male Wistar rats were subjected to 4VO (2 h) and different reperfusion times. Fluorescence and immunofluorescence analysis were performed in brain coronal sections. A) GFAP expression (Red), AQP4 expression (Green), and Evans Blue extravasation (purple). B) Quantification of GFAP protein expression. C) Quantification of Evans blue extravasation. D) Quantification of AQP4 protein expression. Statistical analysis, ANOVA, $p < 0.05$ vs CT $n = 3$.

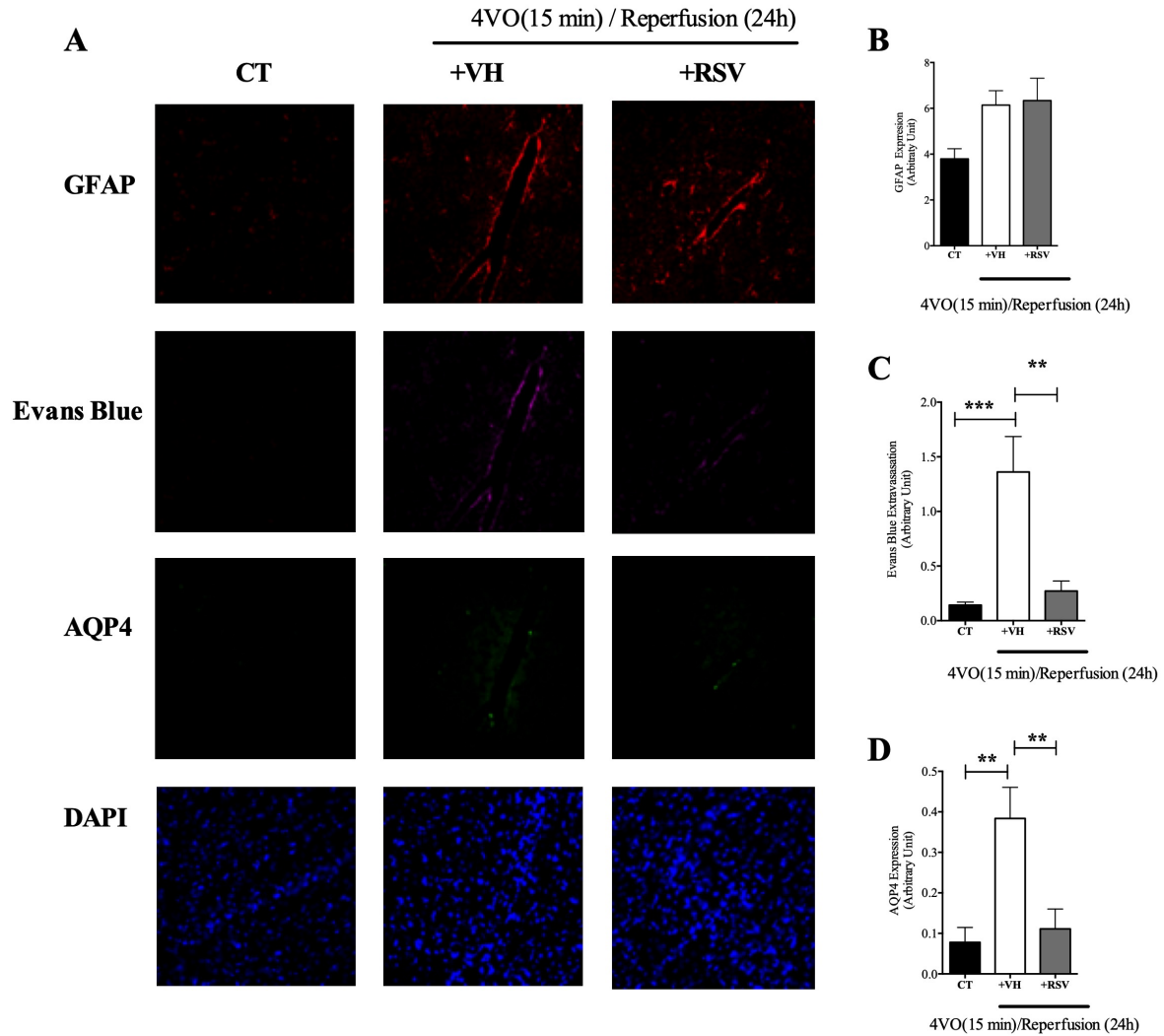


Figure 2. Resveratrol reduces AQP4 expression and damage to the BBB induced by 4VO/reperfusion. Male Wistar rats were subjected to 4VO (2 h) and reperfusion (24 h). Resveratrol (+ RSV) was administered at the beginning of reperfusion in the caudal vein at a dose of 1.8 mg/kg using 50 % EtHO as a vehicle (+VH). Fluorescence and immunofluorescence analysis were performed in brain coronal sections. A) GFAP expression (Red), AQP4 expression (Green), and Evans Blue extravasation (purple). B) Quantification of GFAP protein expression. C) Quantification of Evans blue extravasation. D) Quantification of AQP4 protein expression. Statistical analysis, ANOVA, $p < 0.05$ $n = 3$.

References

- Díez Tejedor, E. (2004). *Guía oficial para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología*. (Vol. 3).
- Lipton, P. (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*, 79(4), 1431–1568. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1431>
- Manaenko, A., Chen, H., Kammer, J., Zhang, J. H., & Tang, J. (2011). Comparison Evans Blue injection routes: intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood–brain barrier in a mice hemorrhage model. *Animals*, 195(2), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.013>. Comparison
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H., & Iadecola, C. (2010). The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 67(2), 181–198. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.002>
- Pulsinelli, W. A., & Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10(3), 267–272. <https://doi.org/10.1161/01.STR.10.3.267>
- Seif el Nasr, M., Nuglisch, J., & Krieglstein, J. (1992). Prevention of ischemia-induced cerebral hypothermia by controlling the environmental temperature. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 27(1), 23–26. [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(92\)90016-T](https://doi.org/10.1016/1056-8719(92)90016-T)
- Simard, J. M., Kent, T. A., Chen, M., Tarasov V., K., & Gerzanich, V. (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*, 6(3), 258–268. Retrieved from doi:10.1016/S1474-4422(07)70055-8
- Stokum, J. A., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2016). Molecular pathophysiology of cerebral edema. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(3), 513–538. <https://doi.org/10.1177/0271678X15617172>