



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“EXPRESIÓN DE Nrf2 DURANTE LA ISQUEMIA CON Y SIN REPERFUSIÓN EN
CEREBRO DE RATA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB. CÉSAR GUILLERMO GONZÁLEZ GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

Ciudad de México. Febrero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (No. de becario CVU 777245) otorgada al alumno durante los estudios de posgrado.

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado al alumno para la asistencia a la Reunión Bienal Internacional de la Sociedad Internacional de Neuroquímica (International Society for Neurochemistry)

Este trabajo fue apoyado parcialmente por CONACyT (proyecto 241655).

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

“Vacilo, lo confieso, en dar este salto, tengo miedo de caer en lo desconocido sin límites”. Así comienza un capítulo de “El amor loco” y considero que encaja perfectamente con lo que quiero compartir con usted amable lector. Y en efecto caí en lo desconocido al entrar en esta maravillosa universidad, momentos buenos y malos he vivido a lo largo de mi formación profesional, y aún continúo vacilando y teniendo miedos a cada paso antes de tomar una decisión, pero, esta casa de estudios, UNAM, no solo me ha formado en el ámbito de mi carrera profesional si no también me ha dado las herramientas necesarias para que cada salto que dé, la caída sea firme y que mis miedos sean menores, porque la vida se trata de eso precisamente, de dar saltos, afrontar nuevos retos y embarcarnos a la aventura. No nos agobemos tanto con el futuro, vivamos el momento sin caer en el hedonismo, cuestionemos e informémonos. Y al respecto de los cuestionamientos, al momento de iniciar mis estudios de maestría me invadían preguntas como ¿Qué es la vida?, ¿Qué sentido tiene?, ¿A qué venimos?, aborrecía la idea de que ésta tuviera que terminar en algún momento, pero hoy, aunque no he respondido todas las preguntas y quizá nunca encuentre respuesta, solo sé que el motivo de la vida son ustedes, mis seres queridos, por lo que considero que la mención especial en esta tesis es para mis padres Sofía Gutiérrez José y César González Cardona, a mi hermana Ana Karen González Gutiérrez, a los profesores que me formaron, especialmente a la Dra. Perla D. Maldonado Jiménez y Blanca R Bonilla Heredia, agradezco a la Dra. María Cristina Castañeda Patlán por su apoyo y asesoría en técnicas de bioquímica (western blot), a mis compañeros del laboratorio el Dr. Carlos Alfredo Silva Islas, Dr. Ricardo Santana Martínez y la M. en C. Sandra Monserrat Bautista Pérez por su apoyo y asesoría en técnicas de bioquímica (extracción de proteínas e inmunohistoquímica), a Roxana Avalos, José Manuel Bello, Narayana Pineda y a Fernando Gutiérrez por apoyarme infinitamente y por hacer amena la estancia en el laboratorio; a mi compañero de vida Ulises Loredó, a familiares y a Pablo Guevara, Misael Argüello, Daniel Martínez Razo, Oscar León Mena, Andrea Cortés, Isabel Barón, Jenifer Muñoz por su amistad incondicional, ya que soy la suma de lo que he vivido a su lado. Estoy completamente seguro de que sin su apoyo y amor no

hubiese logrado mucho o bien el camino hubiese sido más complicado, ya que es indispensable la compañía e impulso de seres amados para facilitar el camino.

Quiero finalizar mis dedicatorias y agradecimientos con unas líneas que leí y encajan *ad hoc* con la situación que estamos atravesando en el país: en el diario La Voz en 1935, Federico García Lorca declaró lo siguiente: “A veces, cuando veo lo que pasa en el mundo, me pregunto: ¿para qué escribo? Pero hay que trabajar. Trabajar y ayudar al que lo merece. Trabajar, aunque a veces piense uno que realiza un esfuerzo inútil. Trabajar como una forma de protesta. Porque el impulso de uno sería gritar todos los días al despertar en un mundo lleno de injusticias y miserias de todo orden: ¡Protesto!, ¡Protesto!, ¡Protesto!” y con estas palabras se demuestra que tal vez todo está destinado a repetirse y que la situación no ha cambiado mucho de 1935 a la fecha, pero tengo la certeza que con nuestras acciones podremos contribuir en algo para cambiar el mundo. Aprendamos de nuestros errores, rompamos esquemas, mejoremos esta sociedad, la familia y sobre todo uno mismo, ¡amemos!.

ÍNDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS	1
II. LISTA DE TABLAS	1
III. LISTA DE FIGURAS	2
IV. RESUMEN.....	4
V. INTRODUCCIÓN.....	6
1. Enfermedad vascular cerebral (EVC)	6
2. Signos y síntomas	9
3. Factores de riesgo.....	10
4. Irrigación sanguínea cerebral	11
5. Isquemia cerebral	13
6. Excitotoxicidad.....	15
7. Estrés oxidante.....	17
8. Nrf2.....	19
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
VII. HIPÓTESIS	22
VIII. OBJETIVO GENERAL.....	23
IX. OBJETIVOS PARTICULARES	23
X. METODOLOGÍA	24
1. Reactivos.....	24
2. Animales.....	25
3. Diseño experimental.....	25
3.1 Primera etapa	25
3.2 Segunda etapa	26

4.	Oclusión de arteria cerebral media como modelo de isquemia cerebral	27
5.	Fracciones enriquecidas con proteínas nucleares.....	28
6.	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	28
7.	Western blot	29
8.	Obtención de muestras para el análisis histológico e inmunohistoquímica .	29
8.1	Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)	31
8.2	Inmunohistoquímica.....	31
9.	Análisis estadístico	33
XI.	RESULTADOS.....	34
1.	Niveles proteicos de Nrf2 en fracciones enriquecidas con proteínas nucleares de corteza, estriado e hipocampo.....	34
2.	Alteraciones morfológicas en el hipocampo	38
3.	Niveles de Nrf2 en el hipocampo.....	42
4.	Niveles de malondialdehído (MDA) en el hipocampo	47
XII.	DISCUSIÓN.....	53
XIII.	CONCLUSIÓN	61
XIV.	BIBLIOGRAFÍA	62

I. LISTA DE ABREVIATURAS

ARE	Elemento de respuesta antioxidante
CA1	Región del hipocampo <i>cornu ammonis</i> 1
CA2	Región del hipocampo <i>cornu ammonis</i> 2
CA3	Región del hipocampo <i>cornu ammonis</i> 3
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EVC	Enfermedad vascular cerebral
GD	Región del hipocampo del giro dentado
I30	30 min de isquemia
IR	Isquemia-Reperfusión
Keap1	Proteína asociada-ECH kelch-like
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media (por sus siglas en inglés; Middle Cerebral Artery Occlusion)
MDA	Malondialdehído
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2
O ₂	Oxígeno

II. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales causas de muerte en México.....	8
Tabla 2. Factores de riesgo de la enfermedad vascular cerebral (EVC).....	10
Tabla 3. Lista de reactivos utilizados.	24
Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados.	24
Tabla 5. Comparación del daño morfológico, expresión de Nrf2 y presencia de MDA en las diferentes regiones del hipocampo durante la isquemia.	52

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo.....	6
Figura 2. Muertes mundiales estimadas por causas seleccionadas de 2004-2030..	7
Figura 3. Clasificación de la enfermedad vascular cerebral (EVC).....	9
Figura 4. Irrigación sanguínea cerebral. Polígono de Willis visto desde la base del cerebro	12
Figura 5. Primera etapa de la metodología.....	26
Figura 6. Segunda etapa de la metodología.....	27
Figura 7. Representación de un corte transversal de cerebro de rata a una profundidad de -3.86 mm al bregma	30
Figura 8. Efecto de la isquemia y la reperfusión (IR) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en el estriado de rata.....	35
Figura 9. Efecto de la isquemia y la reperfusión (IR) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en la corteza de rata.....	36
Figura 10. Efecto de la isquemia y la reperfusión (IR) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en el hipocampo de rata.....	37
Figura 11. Dibujo e imagen a 10X de las regiones del hipocampo donde se evaluó el daño morfológico.....	38
Figura 12. Alteraciones morfológicas inducidas por la isquemia (30 min) en el giro dentado (GD)	39
Figura 13. Alteraciones morfológicas inducidas por la isquemia (30 min) en la región CA1	40
Figura 14. Alteraciones morfológicas inducidas por la isquemia (30 min) en la región CA3.....	41
Figura 15. Porcentaje de células con daño en las 3 regiones del hipocampo después de 30 min de isquemia (I), evaluado mediante la tinción de H&E.....	42
Figura 16. Efecto de la isquemia sobre la expresión de Nrf2 en el giro dentado (GD).....	43

Figura 17. Efecto de la isquemia sobre la expresión de Nrf2 en la región CA1....	44
Figura 18. Efecto de la isquemia sobre la expresión de Nrf2 en la región CA3....	45
Figura 19. Porcentaje de células que expresan Nrf2 en las 3 regiones del hipocampo después de 30 min de isquemia (I).....	46
Figura 20. Efecto de la isquemia sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en el giro dentado (GD).....	48
Figura 21. Efecto de la isquemia sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en la región CA1.....	49
Figura 22. Efecto de la isquemia sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en la región CA3.	50
Figura 23. Porcentaje de células positivas a malondialdehído (MDA) en las 3 regiones del hipocampo después de 30 min de isquemia (I).....	51
Figura 24. Vascularización Intrahipocampal.....	57

IV. RESUMEN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) isquémica es la segunda causa de muerte y la primera causa de discapacidad permanente en adultos de todo el mundo. La patogénesis exacta de la isquemia-reperfusión (IR) cerebral aún no se comprende completamente, pero se ha demostrado que la inflamación, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN) y la apoptosis son mecanismos implicados en la muerte celular. Por lo tanto, es razonable suponer que los pacientes que han sufrido un evento de IR se beneficien si los niveles de ERO disminuyen. En este sentido, Nrf2 es un factor de transcripción considerado como el principal regulador de la defensa antioxidante endógena, ya que promueve la expresión de una amplia variedad de genes antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de Nrf2 durante la isquemia con y sin perfusión. Los animales se sometieron a 15, 30, 60 y 120 min de isquemia y a 60 min de isquemia y 15, 30, 60 y 120 min de perfusión utilizando el modelo de oclusión de la arteria cerebral media. Se midieron los niveles proteicos de Nrf2 por western blot en el cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo. La isquemia no indujo cambios en los niveles nucleares de la proteína Nrf2 en el estriado ni en la corteza, pero aumentó los niveles proteicos de este factor en el hipocampo de rata a los 30 min de isquemia. Por otra parte, la perfusión sanguínea no modificó los niveles nucleares de Nrf2 en ninguno de los tejidos estudiados comparado con los animales sham. Dado que, 30 min posterior a la isquemia, se observó un aumento de Nrf2 en el hipocampo, las siguientes determinaciones se realizaron a los 30 min de isquemia en 3 regiones del hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado (GD)). La isquemia indujo daño morfológico significativo del 40.1 ± 6.2 % en el GD, 45.7 ± 6.7 % en la región CA1 y del 79.6 ± 1.5 % en la región CA3 con respecto al grupo Sham, e incremento de los niveles de Nrf2 ya que el porcentaje de células que expresaron Nrf2 fue 25.0 ± 4.3 % en el GD, 26.4 ± 5.7 % en la región CA1 y 50.9 ± 3.0 % en la región CA3 comparado con el grupo Sham. También se cuantificaron los niveles de malondialdehído (MDA) como marcador indirecto de la presencia de las ERO en el hipocampo y se observó un aumento en el porcentaje de células positivas a MDA en el grupo de isquemia de

39.3±4.1 % en el GD, 38.9±5.0 % en la región CA1 y 53.6.6±2.6 % en la región CA3, con respecto al grupo sham. Estos resultados indican que, durante la isquemia, las células se encuentran en un estado pro-oxidante, suficiente para inducir un aumento de los niveles nucleares de Nrf2 a los 30 min; sin embargo, a este tiempo no es posible observar la actividad citoprotectora del factor Nrf2 ya que a pesar de estar aumentada su expresión hay daño morfológico en las 3 regiones estudiadas.

V. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad vascular cerebral (EVC)

La EVC es una patología que afecta a los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro. Se produce cuando se interrumpe el riego sanguíneo a una parte del cerebro o cuando se produce un derrame de sangre en el cerebro o alrededor de él (Díez-Tejedor *et al.*, 2001).

El cerebro necesita un suministro constante de oxígeno (O₂) y glucosa, por ello cuando la sangre no puede llegar a ciertas partes del cerebro, se interrumpe el suministro de éstos y otros nutrientes a esas zonas (Katsura *et al.*, 1994).

La EVC es una de las principales causas de muerte en el mundo (Figura 1) solo por debajo de la cardiopatía isquémica (OMS, 2016) y es la causa principal de discapacidad neurológica en el adulto. Su incidencia aumenta exponencialmente con la edad y por lo tanto con el envejecimiento de la población mundial; por ello, es probable que se convierta en un problema aún más importante. La EVC también es una causa importante de demencia y deterioro cognitivo relacionado con la edad (Markus, 2011).

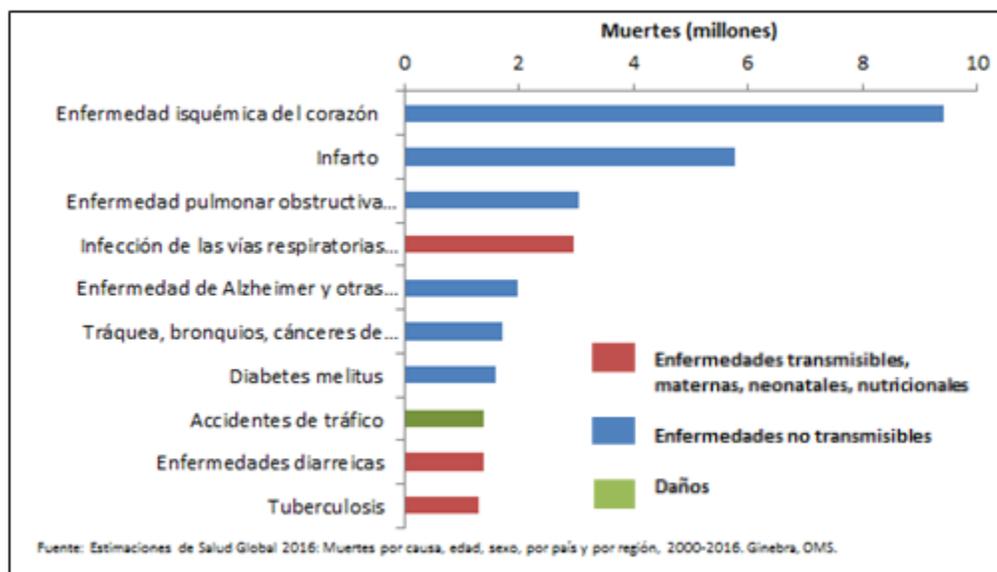


Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo. (OMS, 2016).

Se estima que las principales causas de muerte a nivel mundial en el 2030 serán el cáncer, la enfermedad isquémica del corazón, la EVC, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las infecciones respiratorias bajas (principalmente neumonía) (Figura 2).

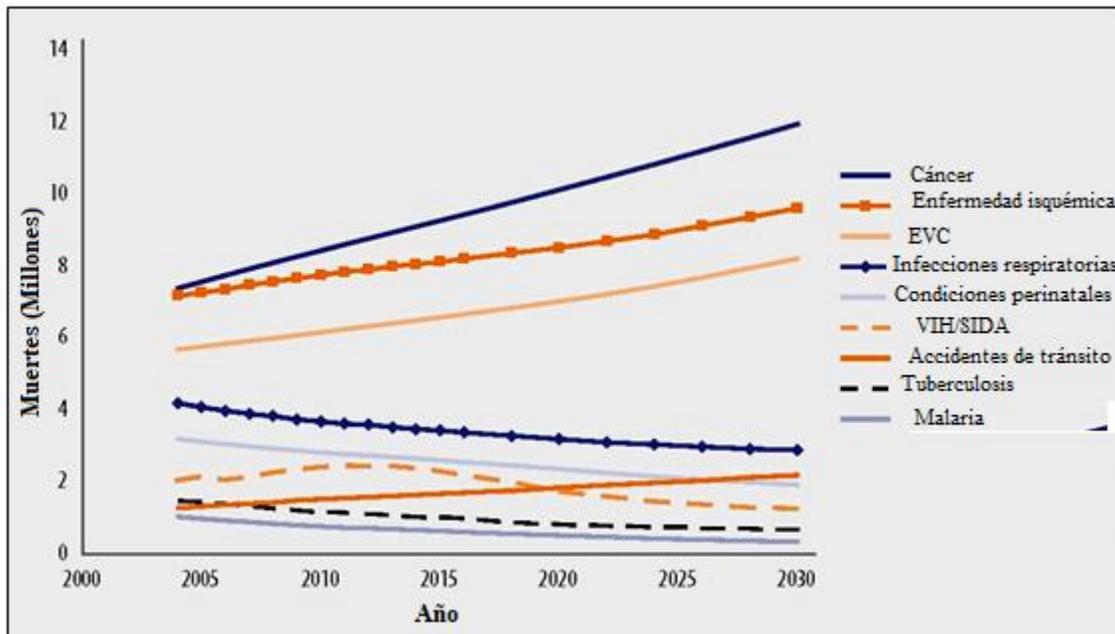


Figura 2. Muertes mundiales estimadas por causas seleccionadas de 2004-2030. Global Health Risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks Geneva, (OMS, 2016.)

La figura 2 ilustra claramente el aumento estimado en el número de muertes por enfermedades crónicas no transmisibles y la disminución estimada para las enfermedades infecciosas transmisibles.

Los cambios proyectados en el número de muertes pueden deberse a cambios en las tasas de mortalidad por enfermedad y lesiones específicas por edad, o debido a cambios demográficos que alteran el tamaño y la composición por edad de la población, o ambos. Las tasas de mortalidad son fuertemente dependientes de la edad para la mayoría de las causas, por lo que los cambios en la estructura de edad de una población pueden dar lugar a cambios sustanciales en el número de muertes, incluso cuando las tasas específicas por edad no cambian (OMS, 2016).

En México, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la EVC ocupó el cuarto lugar de causa de muerte en el año 2016 (Tabla 1) lo cual representa en grave problema de salud pública (INEGI, 2016).

Tabla 1. Principales causas de muerte en México.

Principales causas	Defunciones
Total	291 637
Enfermedades del corazón ^a	60 670
Enfermedades isquémicas del corazón	38 882
Diabetes mellitus	50 705
Tumores malignos	40 612
De la mama	6 273
Del cuello del útero	4 009
Del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	3 245
Enfermedades cerebrovasculares	17 595
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	9 964
Enfermedades del hígado	9 958
Enfermedad alcohólica del hígado	1 068
Accidentes	8 856
De tráfico de vehículos de motor	3 348
Influenza y neumonía	8 430
Insuficiencia renal	5 961
Ciertas afecciones originadas en el período perinatal ^b	5 556
Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	2 403
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	4 352
Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	3 633
Agresiones	2 383
Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	2 189
Enfermedades infecciosas intestinales	1 985
Anemias	1 815
Septicemia	1 441
Lesiones autoinfligidas intencionalmente	1 280
Áleo paralítico y obstrucción intestinal sin hernia	1 252
Colelitiasis y colecistitis	1 171
Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio, no clasificados en otra parte	5 364
Las demás causas	46 465

INEGI, 2016

Los criterios para la selección de las 20 principales causas de muerte consideran la Lista Mexicana de Enfermedades y comprende por lo menos el 80% del total de las defunciones registradas. Se excluyen los grupos cuyas causas de muerte fueron insuficientemente especificadas (INEGI, 2016).

Diez-Tejedor y colaboradores (2001) elaboraron una clasificación de la EVC con el objetivo de unificar la nomenclatura y los criterios en los países iberoamericanos (Figura 3). Es importante resaltar que son sinónimas las denominaciones EVC, accidente cerebrovascular, ataque cerebrovascular y apoplejía.

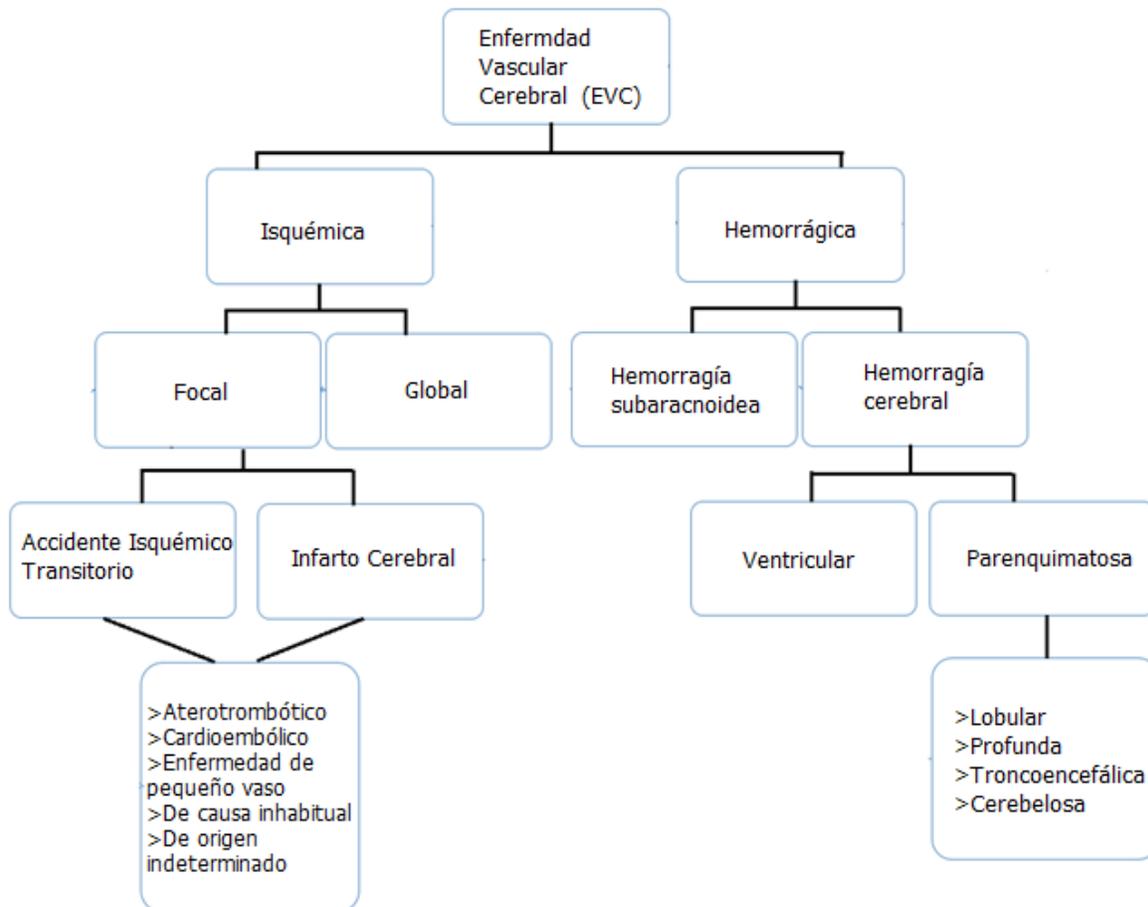


Figura 3. Clasificación de la enfermedad vascular cerebral (EVC) (Diez-Tejedor *et al.*, 2001).

2. Signos y síntomas

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el síntoma más común de la EVC es la pérdida súbita, generalmente unilateral, de la fuerza muscular en los brazos, piernas o cara. Otros síntomas consisten en: la aparición súbita, generalmente unilateral, de entumecimiento en la cara, piernas o brazos; confusión, dificultad para hablar o comprender lo que se dice; problemas visuales en uno o ambos ojos; dificultad para caminar, mareos, pérdida del equilibrio o coordinación; dolor de cabeza intenso de causa desconocida; y debilidad o pérdida de la conciencia (OMS, 2016).

Existe una sigla en inglés (F.A.S.T.) que facilita recordar los signos de un accidente cerebrovascular y lo que se debe hacer si se sospecha que ha ocurrido uno, según la American Heart and Stroke Association.

- FACE (cara). Pídale a la persona que sonría. Revise para ver si uno de los lados de la cara se cuelga.
- ARMS (brazos). Pídale a la persona que levante ambos brazos. Observe si alguno de los brazos se desplaza hacia abajo.
- SPEECH (habla). Pídale a la persona que repita una oración simple. Escuche para ver si arrastra las palabras y si repite correctamente la frase.
- TIME (tiempo). Si una persona presenta alguno de estos síntomas, el tiempo es esencial. Es importante llegar al hospital lo antes posible.

3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo de la EVC se dividen en modificables y no modificables, los cuales están representados en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores de riesgo de la enfermedad vascular cerebral (EVC).

No Modificables	Relevancia
Edad	+++
Sexo	++(Hombres)
Etnicidad	+
Genético-Herencia	++
Modificables	
Presión arterial alta	+++
Diabetes	++
Dislipidemia	++
Fumar	+++

Alcohol	+
Obesidad	++
Poca actividad física (sedentarismo)	++
Dieta	++
Fibrilación auricular y otras fuentes de embolia	++
Otros factores:	
• Hiperhomocisteinemia	++
• Hipercoagulabilidad	+
• Lipoproteínas	+
• Síndrome de apnea obstructiva del sueño	++

Factores de riesgo, junto con una evaluación cualitativa (indicado con el símbolo +) de su influencia en la patología, en función de su prevalencia y de su relevancia (Palomeras-Soler & Casado-Ruiz, 2010).

4. Irrigación sanguínea cerebral

El cerebro está provisto abundantemente de vasos sanguíneos, está innervado por dos arterias carótidas internas y dos arterias vertebrales, conectadas por una anastomosis central, que se encuentra en la fosa interpeduncular en la base del cerebro. La arteria carótida interna se divide en las arterias cerebrales: anterior y media, las dos arterias cerebrales anteriores están unidas por la arteria comunicante anterior. Por otro lado, la arteria basilar formada por la unión de las dos arterias vertebrales se ramifica en las dos arterias cerebrales posteriores. Finalmente, la arteria comunicante posterior, una rama de la carótida interna, completa el polígono arterial, conocido como polígono de Willis, al unirse con la arteria cerebral posterior (Iqbal, 2013) (Figura 4).

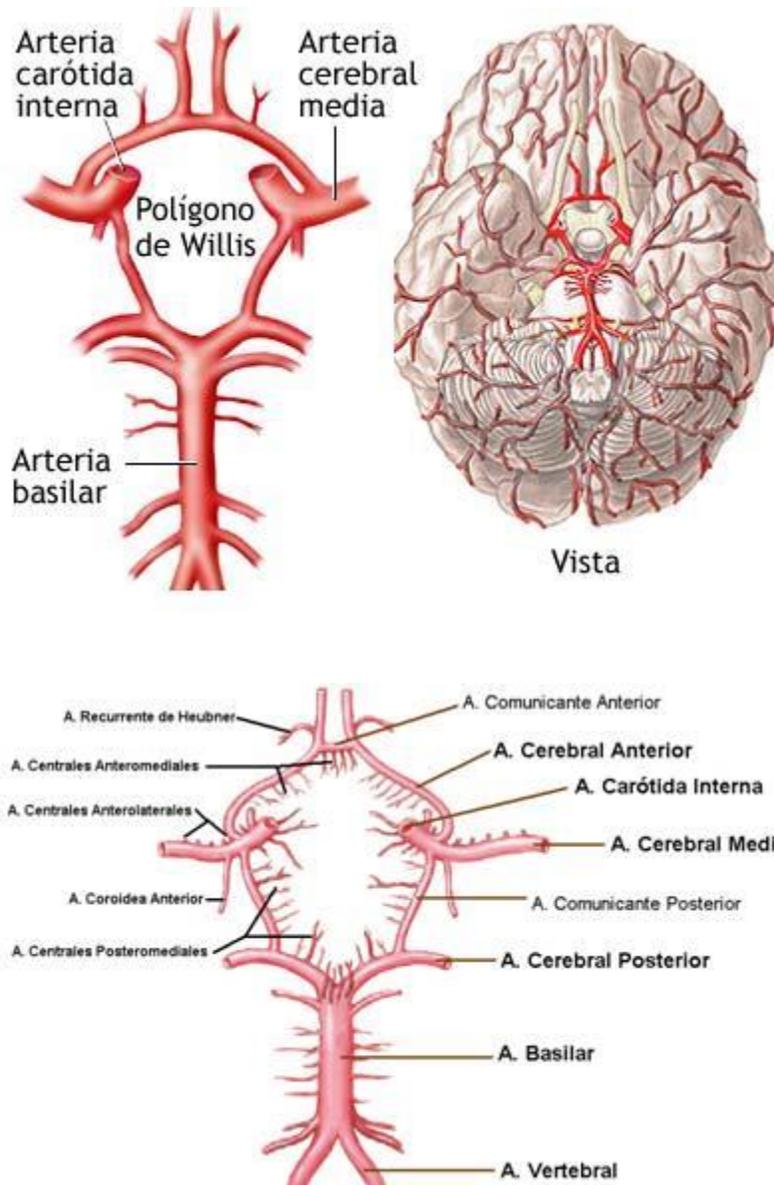


Figura 4. Irrigación sanguínea cerebral. Polígono de Willis visto desde la base del cerebro (Medlineplus, 2018).

Puede haber variaciones en esta configuración típica ya que los vasos generalmente varían en calibre o a menudo son hipoplásicos, duplicados o incluso ausentes. Varios estudios han demostrado que estas variaciones pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EVC (Hoksbergen *et al.*, 2003).

Las variaciones anatómicas probablemente están determinadas genéticamente, se desarrollan en la etapa embrionaria temprana y persisten en la vida postnatal (Crompton, 1962). Cualquier cambio en la morfología normal del polígono puede condicionar la apariencia y la gravedad de los síntomas en los trastornos cerebrovasculares, como aneurismas, infartos y otras anomalías vasculares (Riggs & Rupp, 1963).

5. Isquemia cerebral

La EVC isquémica es el resultado de una reducción transitoria o permanente en el flujo sanguíneo cerebral que se restringe al territorio de una arteria cerebral importante. La reducción del flujo es, en la mayoría de los casos, causada por la oclusión de una arteria cerebral, ya sea por un émbolo o por una trombosis local (Donnan *et al.*, 2008).

De acuerdo con Lakhan y colaboradores (2009), la EVC de tipo isquémica es la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad permanente en adultos de todo el mundo. La evidencia ha demostrado que la inflamación (Jean *et al.*, 1998; Lakhan *et al.*, 2009), el estrés oxidante (Sugawara & Chan, 2003; Muralikrishna Adibhatla & Hatcher, 2006) y la apoptosis (Duan *et al.*, 2004; Eefting *et al.*, 2004; Nakka *et al.*, 2008) están involucrados en la muerte neuronal en el infarto cerebral. Los mecanismos subyacentes a la patogénesis de la lesión isquémica cerebral son complejos, aunque la inflamación local de los tejidos desempeña un papel clave (Basu *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2010).

La isquemia cerebral desencadena vías patológicas que, en última instancia, provocan una lesión neuronal irreversible en el núcleo isquémico o área de infarto a los pocos minutos de su ocurrencia (Dirnagl *et al.*, 1999); sin embargo, un volumen mucho mayor de tejido cerebral que rodea a esta área de infarto, conocido como penumbra isquémica o área de penumbra, puede ser recuperado si el flujo sanguíneo cerebral se restablece rápidamente. La definición de la penumbra isquémica se refiere a aquellas áreas del cerebro que están dañadas, pero no muertas, ofreciendo la promesa de que, si se pudieran encontrar terapias

adecuadas, se podría rescatar el tejido cerebral y reducir la discapacidad después de la EVC.

A pesar de los avances en la comprensión de la fisiopatología de la isquemia cerebral, las opciones terapéuticas para la EVC isquémica siguen siendo muy limitadas (Donnan *et al.*, 2008). La reperfusión sanguínea al cerebro es la mejor manera de salvar la vida y limitar el desarrollo del área de infarto (Li *et al.*, 2012). Actualmente solo un fármaco, con actividad trombolítica, está aprobado para su uso clínico en el tratamiento de la isquemia aguda en los Estados Unidos: el activador de plasminógeno tisular de naturaleza recombinante (rt-PA) que se administra por vía intravenosa. Cuando éste se administra dentro de las 3 h posteriores a la aparición de los síntomas reduce los déficits neurológicos y mejora el resultado funcional de los pacientes con isquemia; sin embargo, la restauración del flujo sanguíneo al cerebro puede resultar paradójicamente en un daño secundario llamado lesión por isquemia-reperfusión (IR) convirtiéndolo en otro problema clínico importante en el tratamiento del daño cerebral (Lakhan *et al.*, 2009).

La fisiopatología definitiva con respecto a la lesión por IR sigue siendo poco clara; Sin embargo, se sugiere que los mediadores del estrés oxidante como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) liberadas por las células inflamatorias alrededor de las áreas lesionadas juegan un papel crítico (Wong *et al.*, 2008). El aumento de las ERO y ERN desencadena la expresión de una serie de genes pro-inflamatorios mediante la inducción de la síntesis de factores de transcripción, incluyendo NF- κ B, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF1), el factor regulador del interferón (IRF) y STAT3. Como resultado, diversas citocinas son reguladas positivamente en el tejido cerebral y en consecuencia, se induce la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie de las células endoteliales, atrayendo neutrófilos circulantes que pueden migrar y adherirse a los tejidos isquémicos centrales, propagando así la respuesta inflamatoria local (Yilmaz & Granger, 2008).

6. Excitotoxicidad

El concepto de excitotoxicidad fue propuesto por primera vez por el Dr. Olney en 1969 como un efecto tóxico de la activación excesiva o prolongada de los receptores a los aminoácidos excitatorios (EAAs por sus siglas en inglés Excitatory Amino Acids) (Olney, 1969). La excitotoxicidad podría mediar el daño neuronal en diversos trastornos neurológicos, incluyendo la isquemia y las enfermedades neurodegenerativas (Bruijn *et al.*, 2004).

El glutamato es el principal aminoácido excitatorio, pero también otras moléculas endógenas tales como el ácido aspártico, el ácido quinolínico, el ácido homocistéico y moléculas exógenas como el N-metil-D-aspartato (NMDA) y el kainato también pueden actuar a través de receptores de glutamato (Doble, 1999). Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres: NMDA, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y kainato; mientras que los receptores metabotrópicos de glutamato se dividen en: clase I (mGluR1 y mGluR5), clase II (mGluR2 y mGluR3) y de clase III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) (Hollmann *et al.*, 1994, Pin & Duvoisin, 1995)

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos que se abren al unir su ligando (en este caso glutamato), conduciendo a la afluencia de Na^+ y/o Ca^{2+} y al flujo de K^+ . Por otro lado, los receptores metabotrópicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y su activación lleva a cambios en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares como el retículo endoplásmico (Arundine *et al.*, 2004).

Los receptores de kainato son receptores heteroméricos permeables al Na^+ , K^+ y a veces al Ca^{2+} (Dingledine *et al.*, 1999). La excitotoxicidad potenciada por la activación del receptor de kainato puede deberse a la liberación de glutamato y a la entrada de Na^+ para despolarizar la membrana y liberar el Mg^{2+} que se encuentra bloqueando al receptor NMDA dando lugar a la posterior activación de éste (Berman *et al.*, 1997; Ferkany *et al.*, 1982). Además, hay varios estudios que sugieren que la estimulación excesiva de los receptores de glutamato no NMDA con ácido kaínico

puede inducir autofagia y activar las enzimas lisosomales, que juegan un papel importante en la lesión neuronal excitotóxica (Wang *et al.*, 2006; 2008).

Bajo condiciones patológicas, como convulsiones o hipoxia-isquemia, muchas células pueden aumentar su influjo de Ca^{2+} , independientemente de la estequiometría existente de AMPA o NMDAr (Friedman, 2006).

El cerebro posee la mayor tasa metabólica de todos los órganos y depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa para la producción de energía. Por lo tanto, la interrupción del flujo sanguíneo, que limita la disponibilidad de glucosa, O_2 y otros nutrientes, altera, entre otras cosas, la reserva energética requerida para mantener los gradientes iónicos, provocando que se pierda el potencial de membrana y que las neuronas y la glia se despolaricen (Katsura *et al.*, 1994). En la presinapsis, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son activados por la despolarización, lo que induce la liberación de glutamato al espacio extracelular. Al mismo tiempo, otros procesos dependientes de energía, como la recaptura presináptica de glutamato, se alteran, provocando la acumulación de este neurotransmisor en el espacio extracelular. La excitación excesiva de los receptores de glutamato tipo NMDA induce un incremento intracelular de Ca^{2+} y Na^+ (*excitotoxicidad*) (Nishizawa, 2001); además, el agua se dirige pasivamente hacia la región con mayor concentración de solutos, ya que la afluencia de Na^+ y Cl^- es mucho mayor que la salida de K^+ , haciéndose presente el edema.

El incremento intracelular de Ca^{2+} induce cambios que alteran la viabilidad celular tales como: 1) activación de proteasas, lipasas y endonucleasas que dañan la estructura celular; 2) modificación de la actividad de cinasas y fosfatas que regulan procesos celulares como la conducción iónica, la síntesis de proteínas, la apoptosis, etc.; y 3) activación de segundos mensajeros (Mabuchi *et al.*, 2001) que inducen la formación de ERO y ERN, causantes de desarreglos metabólicos y eventualmente de la muerte.

7. Estrés oxidante

Las ERO y ERN que causan estrés oxidante son importantes en la fisiología celular, ya que normalmente se producen en respuesta a diferentes estímulos exógenos y endógenos y además se generan, transforman y agotan continuamente en los tejidos durante el metabolismo (Schieber *et al.*, 2014).

Biológicamente, el estrés oxidante se refiere a un desequilibrio entre la producción de ERO y ERN y la capacidad de eliminarlos. Las alteraciones en el estado redox normal de las células pueden causar efectos negativos ya que las especies reactivas dañan componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN. El efecto de las ERO y ERN sobre las funciones celulares depende de la cantidad de éstas y del tiempo a que la célula este expuesta (Reshi *et al.*, 2014). Además, algunas ERO y ERN actúan como mensajeros celulares en la señalización redox; por lo tanto, el estrés oxidante puede causar alteración en los mecanismos de señalización celular, regulación de citocinas, acción hormonal, transcripción, transporte iónico, neuromodulación, inmunomodulación y apoptosis (Sies *et al.*, 2015), de hecho se ha encontrado que el estrés oxidante desempeña un papel importante en diversas condiciones patológicas como el cáncer, la diabetes y las enfermedades neurológicas (Dhalla, 2000; Jenner, 2003).

Las ERO son moléculas químicamente reactivas que contienen O_2 . Los ejemplos incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\bullet OH$) y oxígeno singulete (O^1_2). Cuando se controla estrechamente su nivel, éstas funcionan como moléculas de señalización mediante la modulación de la actividad de sus objetivos oxidados (Scherz-Shouval & Elazar, 2011). Hay diferentes tipos de especies oxidantes, pero los de mayor importancia en los sistemas biológicos son los que derivan del oxígeno y el nitrógeno, ambas derivadas de fuentes endógenas (mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico, células fagocíticas, etc.) y fuentes exógenas (contaminación, alcohol, humo de tabaco, metales pesados, metales de transición, solventes industriales, pesticidas, ciertas drogas como halotano, paracetamol y radiación) (Phaniendra *et al.*, 2015).

Los niveles excesivos de ERO pueden ser eliminados por los sistemas de defensa antioxidantes que incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (o químicos).

Los antioxidantes enzimáticos son proteínas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), mientras que los antioxidantes no enzimáticos incluyen a moléculas como el glutatión (GSH) (Kahles *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2015). La IR cerebral perturba el equilibrio entre la producción de ERO y su inactivación por los sistemas antioxidantes, lo que finalmente conduce a una acumulación excesiva de ERO, lo cual contribuye al daño del tejido cerebral causando disfunción celular y la muerte celular a través de la peroxidación de los lípidos y la oxidación de proteínas, ADN y ARN (Ouyang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2011; Chan, 2001). Por lo tanto, es razonable suponer que los pacientes que han sufrido un evento de IR se puedan beneficiar de la reducción de los niveles de ERO como terapia.

La mitocondria es la principal consumidora de O_2 en la célula. Por ello, actúa como el sensor que transmite la información sobre los niveles de O_2 en toda la célula. Se ha puesto de manifiesto que las ERO también sirven como un mecanismo de señalización para los bajos niveles de O_2 celular. Las mitocondrias pueden generar O_2^- en los complejos I, II y III, el citocromo c, el aceptor de electrones de complejo III, se considera que desempeña el papel más destacado en la respuesta celular contra la hipoxia (Chandel *et al.*, 2000). Es posible que el citocromo c reducido, que es incapaz de aceptar un electrón del complejo III y por lo tanto hace que el complejo III produzca oxígeno reactivo, sea un sensor directo de la hipoxia celular, ya que esta molécula dona directamente sus electrones al O_2 . Cuando las reservas de O_2 son bajas, el complejo III no puede lanzar sus electrones correctamente y crea de esta manera ERO, señalando una respuesta hipóxica (Kietzmann & Görlach, 2005). Aunque se ha sugerido que las mitocondrias son innecesarias para la activación del factor HIF-1 (Enomoto *et al.*, 2002), otros estudios han demostrado que la producción de ERO mitocondrial es necesaria para que la célula pueda montar una respuesta hipóxica (Bell *et al.*, 2007; Chandel *et al.*, 1998; Hamanaka *et al.*, 2016).

8. Nrf2

El sistema de defensa celular está equipado con la capacidad de regular al alza los niveles de expresión de los genes de enzimas citoprotectoras. Por ello, el factor relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (del inglés nuclear factor erythroid 2-related factor 2) se considera uno de los reguladores maestros de la defensa antioxidante endógena (Itoh *et al.*, 1997; 1999). Este factor pertenece a la subfamilia de factores transcripcionales cap-n-collar (CNC) y contiene un dominio tipo-CNC cierre básico de leucinas (bZIP) (Basic-region leucine zipper) (Motohashi *et al.*, 2004) necesario para su unión al ADN.

Nrf2 tiene seis dominios conservados, designados como dominios Neh1-6 (**Nrf2-ECH** homology, por sus siglas en inglés) (Zhang, 2006).

Nrf2 se dimeriza con miembros de la familia pequeña Maf y se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés Antioxidant Response Element) (Sato *et al.*, 2006; Niture *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2014) situados en las regiones reguladoras de sus genes blanco. Entre los genes regulados por Nrf2 se encuentran los genes para muchas enzimas de la defensa antioxidante (Itoh *et al.*, 1997) incluyendo la hemo oxigenasa-1 (HO-1), las SODs, la GPx, las CATs, algunos miembros de las peroxiredoxinas (PRDXs), la NAD(P)H: quinona oxidorreductasa-1 (NQO1), la glutamin cisteína ligasa (GCL), la GSH reductasa (GR), las GSH S-transferasas (GST) y la γ -glutamilcisteína sintetasa (Chen *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2009; Shelton *et al.*, 2013). Se han identificado más de mil genes blanco de Nrf2 a través de análisis de perfiles de la expresión génica y el análisis de inmunoprecipitación de la cromatina, o bien mediante el uso de ratones knock out para el gen Nrf2 (Suzuki *et al.*, 2013). Entre los genes blanco de Nrf2 están aquellos que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis y conjugación del glutatión, enzimas antioxidantes, enzimas metabolizadoras de drogas, transportadores y enzimas involucradas en la vía de las pentosas fosfato (Suzuki *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 2014) Por lo tanto, Nrf2 activa una amplia gama de procesos de defensa celular, aumentando así la capacidad global de las células para desintoxicar y eliminar sustancias nocivas.

El papel citoprotector de Nrf2 implica una comunicación cruzada con otros procesos celulares, por ejemplo, la proteína p62 que es clave en la señalización en la apoptosis y la autofagia, también induce a Nrf2 al inhibir la represión de Keap1 (Keiko *et al.*, 2011). Entre las posibles vías de señalización involucradas en la regulación de Nrf2 se incluyen las MAPK (mitogen-activated protein kinases), PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa), PKC (protein cinasa C) y CK2 (casein cinase 2) (Surh *et al.*, 2008). Se ha descubierto que Nrf2 tiene una amplia influencia en procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, la carcinogénesis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la obesidad y la neurodegeneración (Kensler *et al.*, 2007). Papp y colaboradores presentaron en 2012 un recurso de nivel de sistema para el interactoma y reguloma de Nrf2, que incluye 289 interacciones proteína-proteína, 7469 interacciones del factor de transcripción con el DNA y 85 interacciones con miRNA. Como ejemplos, a nivel de sistemas de señalización relacionada con Nrf2, identificaron bucles reguladores de proteínas que interactúan con Nrf2 (por ejemplo, JNK1 y CBP) y un sistema regulador ajustado, donde 35 factores de transcripción regulados por Nrf2 influyen sobre 63 miRNAs que regulan negativamente la expresión de Nrf2 (Papp *et al.*, 2012).

Nrf2 parece desempeñar un papel importante en la protección de las células cerebrales contra la lesión isquémica cerebral, ya que una pérdida de su función aumenta el tamaño del infarto cerebral y los déficits neurológicos después de un evento isquémico (Shah *et al.*, 2007; Shih *et al.*, 2005).

La proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) se ha identificado como un factor de interacción con el dominio Neh2 (Nrf2-ECH dominio homólogo 2) de Nrf2 (Itoh *et al.*, 1999). Keap1 es una subunidad adaptadora de la proteína culina 3 (Cul3), ésta última con actividad de ubiquitina E3 ligasa. Un homodímero de Keap1 se une a moléculas Nrf2 individuales por medio de dos uniones a través de los motivos DLG y ETGE. Ambos motivos se unen individualmente en el dominio DC (doble repetición de glicina y C-terminal) de Keap1. Residuos de lisina que residen entre los dos motivos DLG y ETGE son los objetivos de la ubiquitinación (Kobayashi *et al.*, 2004). Bajo condiciones de no estrés, Keap1 se une a Nrf2 en el citoplasma y promueve su ubiquitinación y subsecuente degradación proteasomal, a través de

la vía ubiquitina-proteasoma 26S. Tras la exposición a sustancias químicas (a menudo electrófilos) o a ERO, la actividad de la ubiquitina E3 ligasa del complejo Keap1-Cul3 disminuye y Nrf2 se estabiliza. El factor Nrf2 estabilizado se acumula en el núcleo y activa sus genes blanco.

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reperfusión del tejido cerebral isquémico es fundamental para restaurar la función normal de las células, aunque puede resultar paradójicamente en un daño secundario llamado lesión por IR donde se sugiere que las ERO y ERN juegan un papel crítico; sin embargo, se ha demostrado *in vitro* que aún en condiciones de hipoxia se pueden generar ERO. Por ello, la expresión del factor Nrf2, al ser considerado uno de los reguladores maestros de la defensa antioxidante endógena, aumentará desde los primeros tiempos de isquemia y aún más durante la reperfusión, mostrando una correlación con los niveles de ERO en un modelo *in vivo*.

VII. HIPÓTESIS

Si la isquemia favorece la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), entonces la oclusión a diferentes tiempos de la arteria cerebral media y diferentes tiempos de reperfusión provocará un aumento tiempo dependiente en la traslocación al núcleo del factor Nrf2 durante la isquemia y aun más durante la reperfusión en el estriado, corteza frontal e hipocampo asociada con el contenido de ERO.

VIII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión a nivel proteico del factor de transcripción Nrf2 en el cerebro de ratas sometidas a un proceso de oclusión de la arteria cerebral media con y sin reperusión como modelo de infarto cerebral y su asociación con el estado oxidante celular.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar los niveles de proteína del factor Nrf2 mediante western blot en fracciones nucleares enriquecidas en el cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo en animales sometidos a diferentes tiempos de isquemia (15, 30, 60 y 120 min) y reperusión (1 h de isquemia y 15, 30, 60 y 120 min de reperusión).

Evaluar en el hipocampo de animales sometidos a 30 min de isquemia:

2. El daño morfológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina.
3. La expresión del factor de transcripción Nrf2 mediante inmunohistoquímica.
4. El estado oxidante celular mediante la presencia de aductos de malondialdehído (MDA) por inmunohistoquímica.

X. METODOLOGÍA

1. Reactivos

Los reactivos y anticuerpos se obtuvieron de acuerdo con lo indicado en las tablas 3 y 4 respectivamente, los demás reactivos se obtuvieron a través de fuentes comerciales locales.

Tabla 3. Lista de reactivos utilizados.

Reactivo o Kit	Compañía
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Aprotinina	
DTT	
Folin Ciocalteu	
Immobilon Western (Luminol, Solución de peróxido)	
Leupeptina	
Paraformaldehído	
Pepstatina	
Fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF)	
Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System K3468 (reactivo con estreptoavidina y 3, 3´diaminobencidina)	Dako North America Inc., (Carpinteria, CA, EUA)
Isoflorano	Pisa Agropecuaria (Guadalajara, JAL, MEX)

Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Número de Catálogo	Compañía
Conejo anti-Nrf2	sc-722	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA)
Conejo anti-PCNA	ab2426	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Conejo anti-MDA	ab6463	
Anticuerpo secundario universal biotinilado	Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System K3468	Dako North America Inc., (Carpinteria, CA, EUA)
Burro anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano	711-035-152	Jackson ImmunoResearch Inc. (Jennersville, PA, EUA)

2. Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar de 270 a 300 g de peso que se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, en grupos de 4 animales por caja con libre acceso al alimento y al agua. Todos los procedimientos experimentales realizados en los animales estuvieron apegados a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, proyecto 44/15. Los animales fueron utilizados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 SAGARPA Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

3. Diseño experimental

El diseño experimental se dividió en dos etapas, en la primera etapa se midieron los niveles del factor de transcripción Nrf2 en extractos enriquecidos de proteínas nucleares de corteza, estriado e hipocampo a diferentes tiempos de isquemia y a diferentes tiempos de reperfusión. La segunda etapa se realizó en el tiempo y en el tejido en el que se observó la mayor expresión de Nrf2, donde se evaluó el daño morfológico, la expresión de Nrf2 y un marcador indirecto de la producción de ERO en cortes transversales de cerebro de rata.

3.1 Primera etapa

Los animales se dividieron en 3 grupos (n=6/grupo): 1) Sham, animales sometidos al procedimiento quirúrgico para ocluir la arteria cerebral media (MCAO por sus siglas en inglés; Middle Cerebral Artery Occlusion), pero sin oclusión; 2) Isquemia, animales sometidos a MCAO durante 15, 30, 60 y 120 min; 3) IR, animales sometidos a 1 h de isquemia mediante MCAO y diferentes tiempos de reperfusión (15, 30, 60 y 120 min) (Figura 5). Después de cada tiempo los animales se sacrificaron por decapitación para obtener el estriado, la corteza y el hipocampo, los cuales se emplearon para medir los niveles de Nrf2 por western blot.

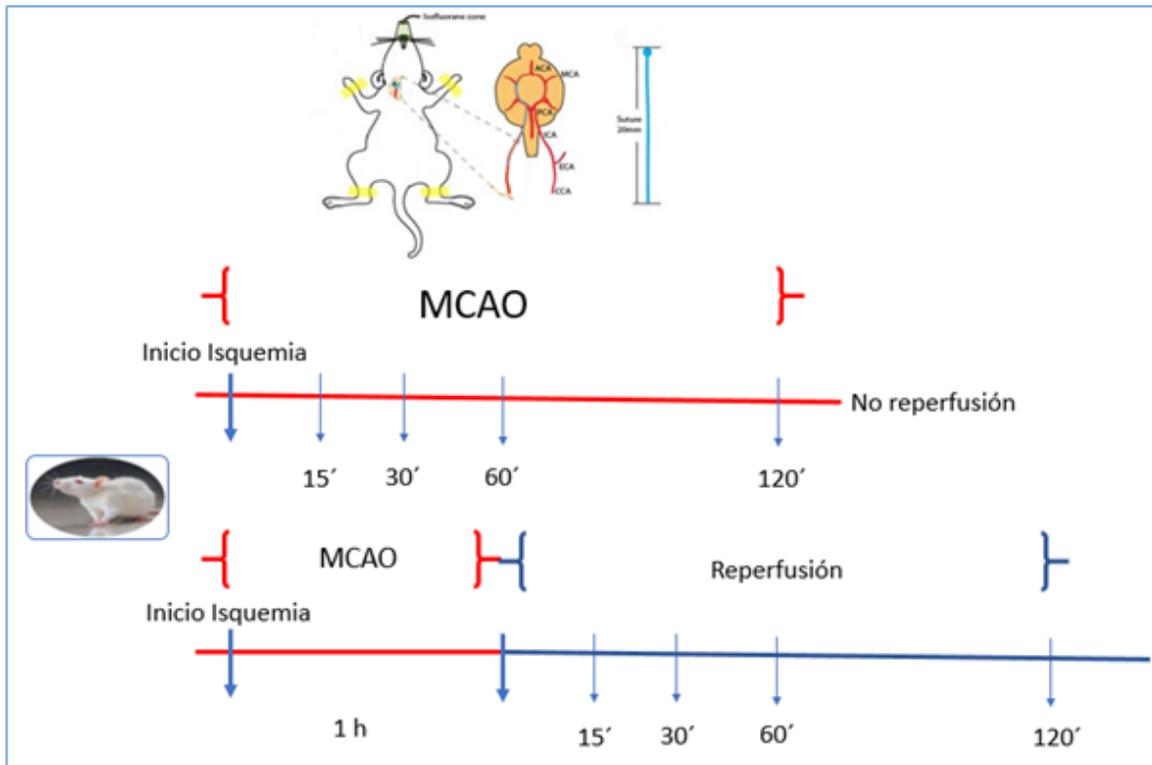


Figura 5. Primera etapa de la metodología. Animales sometidos a isquemia por el modelo de la arteria cerebral media (MCAO). Las líneas horizontales rojas representan el tiempo de isquemia, la línea horizontal azul indica el tiempo de reperusión, las flechas verticales azules indican el tiempo en que los tejidos cerebrales (corteza, estriado e hipocampo) fueron recolectados (n=6/grupo).

Debido a que solo se observó aumento en los niveles de Nrf2 en el hipocampo a los 30 min de isquemia, este tiempo y dicho tejido fueron los que se usaron en la siguiente etapa.

3.2 Segunda etapa

Los animales se dividieron en 2 grupos (n=5/grupo): Sham y 30 min de Isquemia (Figura 6). Transcurrido el tiempo de isquemia los animales fueron perfundidos con paraformaldehído 4% para obtener el cerebro completo del cual se obtuvieron cortes transversales de cerebro de rata (Ver sección 7 de la Metodología).

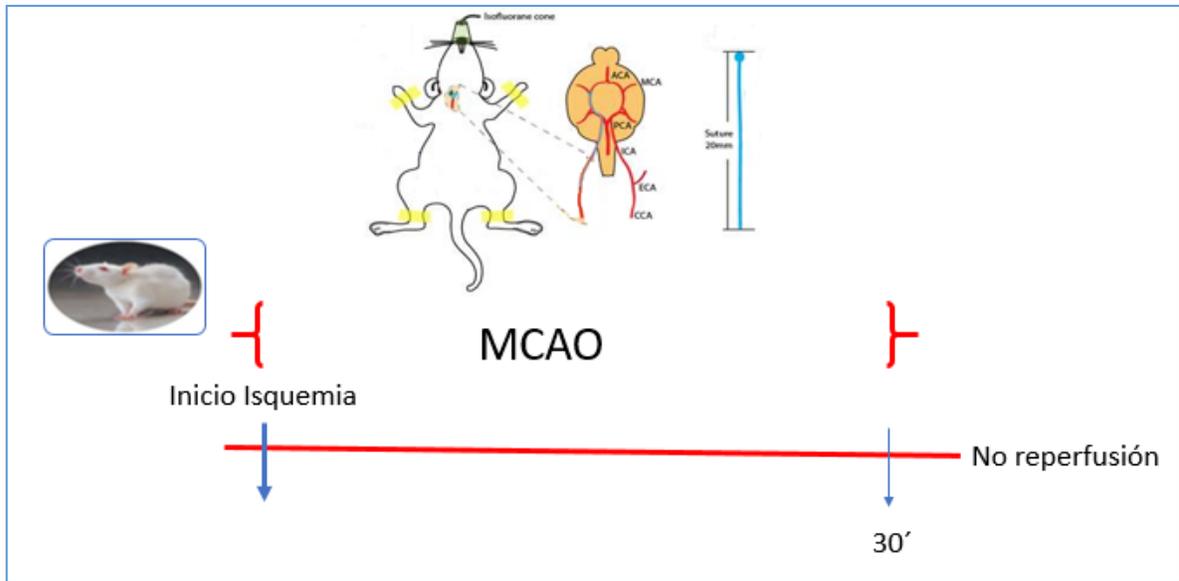


Figura 6. Segunda etapa de la metodología. Animales sometidos a isquemia por el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Línea horizontal roja representa el tiempo de isquemia, la flecha vertical azul indica el tiempo en que los animales fueron perfundidos (n=5/grupo).

4. Oclusión de arteria cerebral media como modelo de isquemia cerebral

Los animales fueron introducidos en una cámara en donde se indujo la anestesia con una mezcla de isoflurano 5% en O₂ durante 3 min, posteriormente los animales se colocaron sobre una superficie de acrílico donde reposó decúbito supino y se sujetó a su hocico una mascarilla con la cual el animal inhalaba la mezcla de isoflurano 2% en O₂ durante toda la cirugía. Se rasuró el pelo de la región supraesternal y se realizó una incisión longitudinal recta en dirección cefálica-ventral de aproximadamente 1 cm en la región supraesternal izquierda con la finalidad de exponer la bifurcación de la arteria carótida común en donde nacen las arterias carótida interna (ACI) y externa (ACE). El procedimiento principal consistió en introducir una sutura intraluminal de nylon 3-0 en la ACI y avanzarla intracranealmente para bloquear el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media; el flujo sanguíneo colateral se redujo al interrumpir todas las ramas de la ACE y todas las ramas extracraneales de la ACI. El tiempo de isquemia inició desde el momento en que se introdujo el filamento de nylon 3-0, mientras que la reperfusión inició al momento de retirar el filamento de nylon que interrumpía el flujo sanguíneo.

5. Fracciones enriquecidas con proteínas nucleares

Transcurrido el tiempo de isquemia (15, 30, 60 o 120 min) o 1 h de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión (15, 30, 60 o 120 min), se extrajo el cerebro e inmediatamente se disectó el estriado, la corteza y el hipocampo ipsilaterales a la lesión. Los tejidos se homogenizaron en 300 μ L de amortiguador hipotónico [HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 1 mM, DTT 1 mM, inhibidores de proteasas: 1 μ g/mL (leupeptina, aprotinina y pepstatina), PMSF 1 mM e inhibidores de fosfatasas] adicionado con Nonidet P40 0.5%. Se incubaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a 850 x g por 10 min. Los "pellets" se resuspendieron en 300 μ L de amortiguador hipotónico, se incubaron por 10 min en hielo seguido de la adición de 15 μ L de Nonidet-P40 10% y se incubaron 5 min más. Las muestras se agitaron en vortex a la máxima intensidad por 10 s, se centrifugaron a 14,000 x g por 30 s y el pellet se resuspendió en 75 μ L de amortiguador de lisis [HEPES 20 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, glicerol 20%, NaCl 420 mM, DTT 1 mM, inhibidores de proteasas: 1 μ g/mL (leupeptina, aprotinina y pepstatina), PMSF 1 mM e inhibidores de fosfatasas]. Las muestras se mezclaron por 10 s, se incubaron 30 min con agitación orbital y se centrifugaron a 14000 x g por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se recolectó y se congeló a $-80^{\circ}C$ hasta su uso.

6. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se preparó un curva patrón por duplicado con albúmina sérica bovina con un intervalo de 25- 250 μ g/ml, las muestras de fracciones enriquecidas con proteínas nucleares se diluyeron 1:50 con agua destilada. Los estándares de la curva patrón, así como las diluciones de las muestras tenían un volumen final de 200 μ l a los cuales se les adicionó 1 ml de solución C (mezcla 50:1 de solución A ($NaCO_3$ 0.2%, NaOH 0.4%, Tartrato de sodio 0.02%) y solución B ($Cu(SO_4)_3$ 0.5%)), se agitó y posteriormente se incubó 10 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100 μ l de reactivo de Folin Ciocalteu 1 N y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras y los estándares se colocaron en una placa de 96 pozos y leyeron en un espectrofotómetro Synergy HT (Winooski, Vermont, EUA) a una longitud de onda de 660 nm.

7. Western blot

Geles de poliacrilamida 10 % fueron cargados con 65 µg de proteína procedente de las fracciones enriquecidas con proteínas nucleares y se realizó la electroforesis durante 120 min/100 V. Después, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF durante 120 min/450 A. Las membranas se bloquearon con 20 mL de leche descremada al 5% disuelta en TBST (Tris 20 mM, NaCl 0.5 M y tween 0.1%) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se incubaron durante 24 h con un anticuerpo específico contra el factor Nrf2, generado en conejo (Santa Cruz C-20 1:1000). Posteriormente, fueron lavadas e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano–HRP (1:10,000). Para corroborar la carga de proteína en cada pozo, se realizó una remoción del anti-Nrf2 o “stripping” para su incubación con un anticuerpo primario anti-PCNA montado en conejo (abcam 2426 1:1000) durante 24 h y revelado con un anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa del rábano–HRP (1:10,000). Las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia Immobilon Western (Millipore (Darmstadt, Alemania)). La densidad óptica de las bandas se cuantificó utilizando el programa ImageJ v.1.49 y la cuantificación relativa del factor Nrf2 se calculó referida a la señal de PCNA.

8. Obtención de muestras para el análisis histológico e inmunohistoquímica

Se les administró a los animales una dosis letal de pentobarbital (0.2 ml/100 g) y posteriormente se perfundieron con solución salina con heparina (25000 U/L) hasta observar el hígado completamente limpio de sangre y enseguida se perfundieron con paraformaldehído 4%. Se obtuvo el cerebro para realizar cortes transversales del cerebro a una distancia aproximada de 2 cm del bregma y se dejó en paraformaldehído 4% durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación los cerebros se colocaron individualmente en casetes de inclusión y se lavaron con agua en agitación durante 20 min; posteriormente, los cerebros se deshidrataron en

8.1 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

Con la finalidad de evaluar el daño morfológico y determinar el porcentaje de células con daño, los cortes se tiñeron con H&E.

Los cortes transversales de cerebro de rata se colocaron en xilol durante 1 h con la finalidad de desparafinarlos. Transcurrido el tiempo los cortes se rehidrataron pasando por soluciones de concentración decreciente de etanol (etanol-xilol 1:1, etanol 100% I, etanol 100% II, etanol 96% I y etanol 96% II) hasta llegar a agua. Posteriormente, se sumergieron en hematoxilina, se lavaron con agua, se introdujeron en una solución de Li_2CO_3 , se lavaron con agua, se sumergieron en eosina, se lavaron nuevamente con agua y finalmente se procedió a la deshidratación de los tejidos, para ello fueron sumergidos en soluciones de concentración creciente de etanol (96% I, 96% II, 100% I, 100%II), seguido de etanol-xilol 1:1, xilol I y xilol II, para finalmente montarlos con resina para preservar hasta su observación al microscopio.

Los cortes se observaron al microscopio (Nikon Eclipse E200, Yokohama, Japón) con un objetivo 40x y se tomaron fotos (Media Cybernetics Evolution MP Color) de 3 regiones del hipocampo: GD, la región CA1 y la región CA3; recolectando imágenes de 3 campos por región. Los resultados se expresan como porcentaje de células dañadas.

8.2 Inmunohistoquímica

Los cortes transversales de cerebro de rata se colocaron en xilol durante 1 h con la finalidad de desparafinarlos. Transcurrido el tiempo los cortes se rehidrataron pasando por soluciones de concentración decreciente de etanol (etanol-xilol 1:1, etanol 100% I, etanol 100% II, etanol 96% I y etanol 96% II) hasta llegar a agua. Posteriormente los cortes se colocaron dentro de un recipiente coplin, se adicionó PBS+Tween20 0.5% (PBS-T) y se dejó durante 1 h. Se retiró el PBS-T y se adicionó solución de citrato de sodio 10 mM + Tween20 0.05% + Triton-X100 0.2% durante 1 h en baño maría con la finalidad de exponer los antígenos presentes en el corte cerebral. Transcurrido el tiempo, los coplin fueron retirados del baño y se dejaron

enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 1 h). Se lavaron los cortes con PBS-T durante 5 min (a partir de este punto todos los lavados que se mencionen se realizaron con PBS-T a menos que se indique un lavado con otra solución).

Se adicionó solución de H₂O₂ 0.1% durante 15 min para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena y se lavó durante 5 min. El área circundante al corte se secó y con un plumón hidrofóbico (Super Pap Pen Cat #71312) se delineó para poder adicionar 50 µl de anticuerpo anti-Nrf2 (Santa Cruz C-20 1:25) o anti-MDA (Abcam6463 1:500) diluido en solución bloqueadora, los anticuerpos se incubaron en una cámara húmeda durante 40 h. Transcurrido el tiempo de incubación se retiraron los anticuerpos y los cortes se lavaron.

Para visualizar los lugares en el tejido cerebral en donde el anticuerpo primario había reconocido a su antígeno (revelado), se utilizó un Kit universal de revelado (Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System K3468; Anticuerpo secundario universal biotinilado, reactivo con estreptoavidina y 3, 3´diaminobencidina) colocando una gota de anticuerpo universal durante 1 h en cámara húmeda. Los cortes se lavaron y se colocó una gota de reactivo con estreptoavidina por 1 h en cámara húmeda y se lavó, los cortes fueron revelados con 3, 3´diaminobencidina, la reacción se detuvo lavando los cortes.

Posterior al revelado, los cortes fueron contra teñidos con hematoxilina y fueron deshidratados al ser sumergidos en soluciones de concentración creciente de etanol (96% I, 96% II, 100% I, 100%II), etanol-xilol 1:1, xilol I y xilol II, para finalmente montarlos con resina para preservar hasta su observación al microscopio.

Los cortes se observaron al microscopio (Nikon Eclipse E200, Yokohama, Japón) con un objetivo 40x y se tomaron fotos (Media Cybernetics Evolution MP Color, Lakewood Ranch, Florida, EUA) de 3 regiones del hipocampo: GD, la región CA1 y la región CA3-, recolectando imágenes de 3 campos por región. Los resultados se expresan como % de células que sobreexpresan Nrf2 o % de células positivas a MDA.

9. Análisis estadístico

Los resultados de Western blot se muestran como la media \pm EEM. Los datos se analizaron estadísticamente mediante prueba ANOVA de una vía con pruebas *post hoc* de Dunnett, empleando el programa GraphPad Prism. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

Los resultados de análisis histológico y las inmunohistoquímicas se muestran como la media \pm EEM. Los datos se analizaron estadísticamente mediante prueba de Kruskal-Wallis con pruebas *post hoc* de comparación múltiple de Dunn, empleando el programa GraphPad Prism. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

XI. RESULTADOS

1. Niveles proteicos de Nrf2 en fracciones enriquecidas con proteínas nucleares de corteza, estriado e hipocampo

Para examinar si la isquemia con y sin reperfusión induce cambios en los niveles proteicos del factor Nrf2 traslocado al núcleo, se utilizaron extractos enriquecidos con proteínas nucleares de la corteza frontal, el estriado y el hipocampo ipsilateral a la lesión. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de Nrf2 nuclear a ningún tiempo de isquemia sin reperfusión en el estriado (Figura 8 A y C) y la corteza (Figura 9 A y C). Sin embargo, en hipocampo a los 30 min de isquemia sin reperfusión se observó un aumento en la traslocación al núcleo del factor Nrf2, el cual disminuyó 1 y 2 h después de la isquemia (Figura 10 A y C). Por otro lado, la reperfusión sanguínea después de 1 h de isquemia no mostró modificaciones en la traslocación al núcleo de Nrf2 en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (Figura 8 B y C, Figura 9 B y C, Figura 10 B y C).

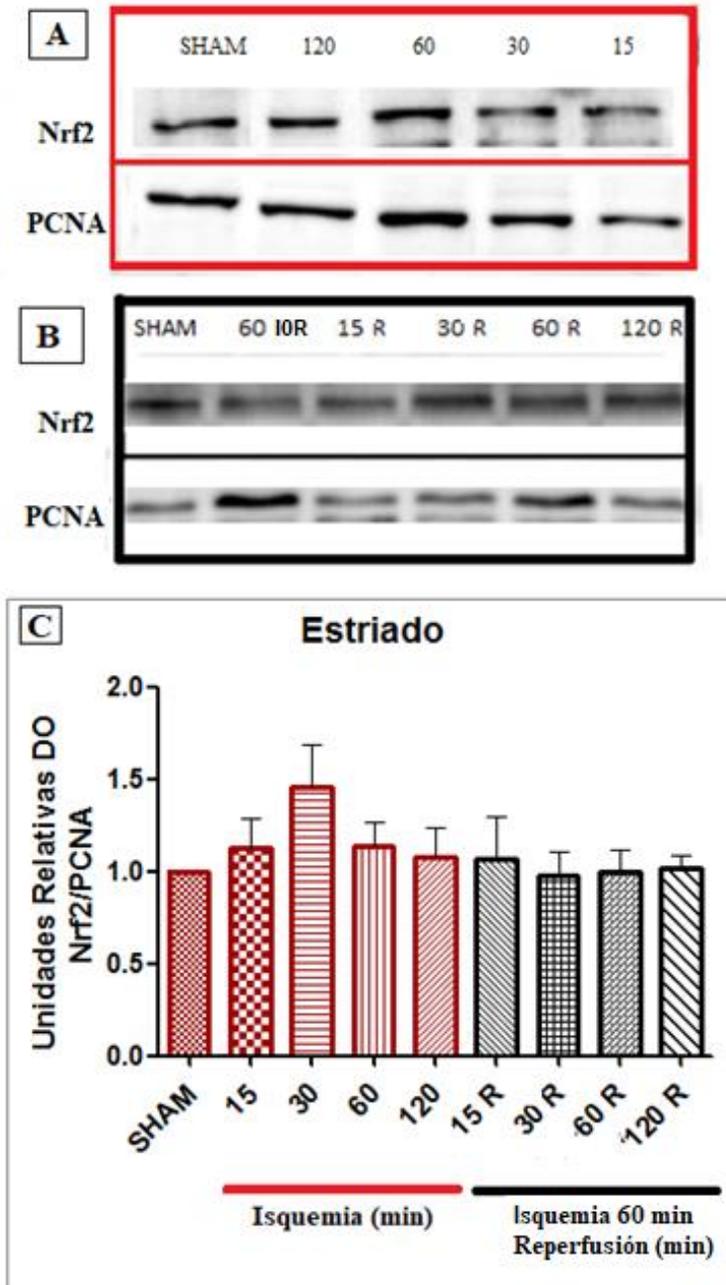


Figura 8. Efecto de la isquemia y la perfusión (IR) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en el estriado de rata. **A.** Niveles de Nrf2 en animales sometidos a 15, 30, 60 y 120 min de isquemia. **B.** Niveles de Nrf2 en animales sometidos a 1 h de isquemia y 0, 15, 30, 60 y 120 min de perfusión. **A** y **B** muestran una imagen representativa, después del “stripping” de las mismas membranas, se empleó PCNA como control de carga de las muestras. **C** muestra la gráfica de los valores de la señal de Nrf2 normalizada con PCNA y ajustados a 1 con respecto al grupo sham. Las barras representan la media \pm EEM. n=6/grupo.

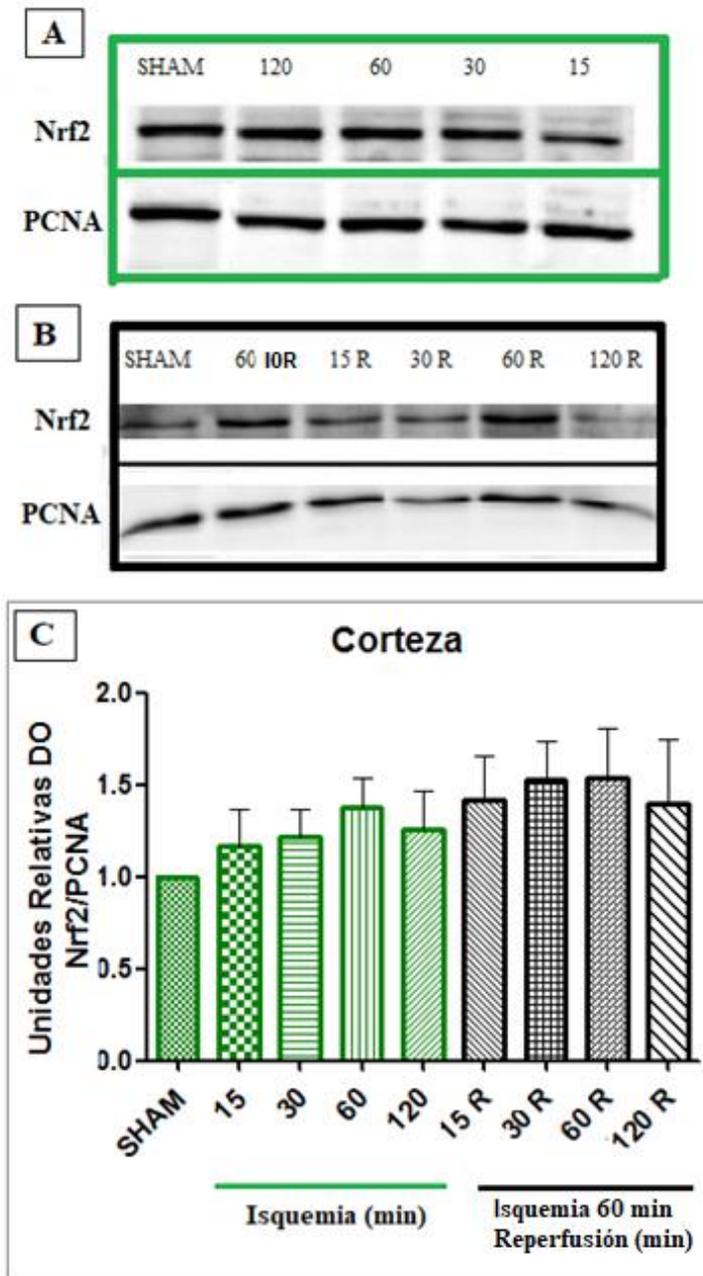


Figura 9. Efecto de la isquemia y la reperfusion (IR) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en la corteza de rata. **A.** Niveles de Nrf2 en animales sometidos a 15, 30, 60 y 120 min de isquemia. **B.** Niveles de Nrf2 en animales sometidos a 1 h de isquemia y 0, 15, 30, 60 y 120 min de reperfusion. **A** y **B** muestran una imagen representativa, después del “stripping” de las mismas membranas, se empleó PCNA como control de carga de las muestras. **C** muestra la gráfica de los valores de la señal de Nrf2 normalizada con PCNA y ajustados a 1 con respecto al grupo sham. Las barras representan la media \pm EEM. n=6/grupo.

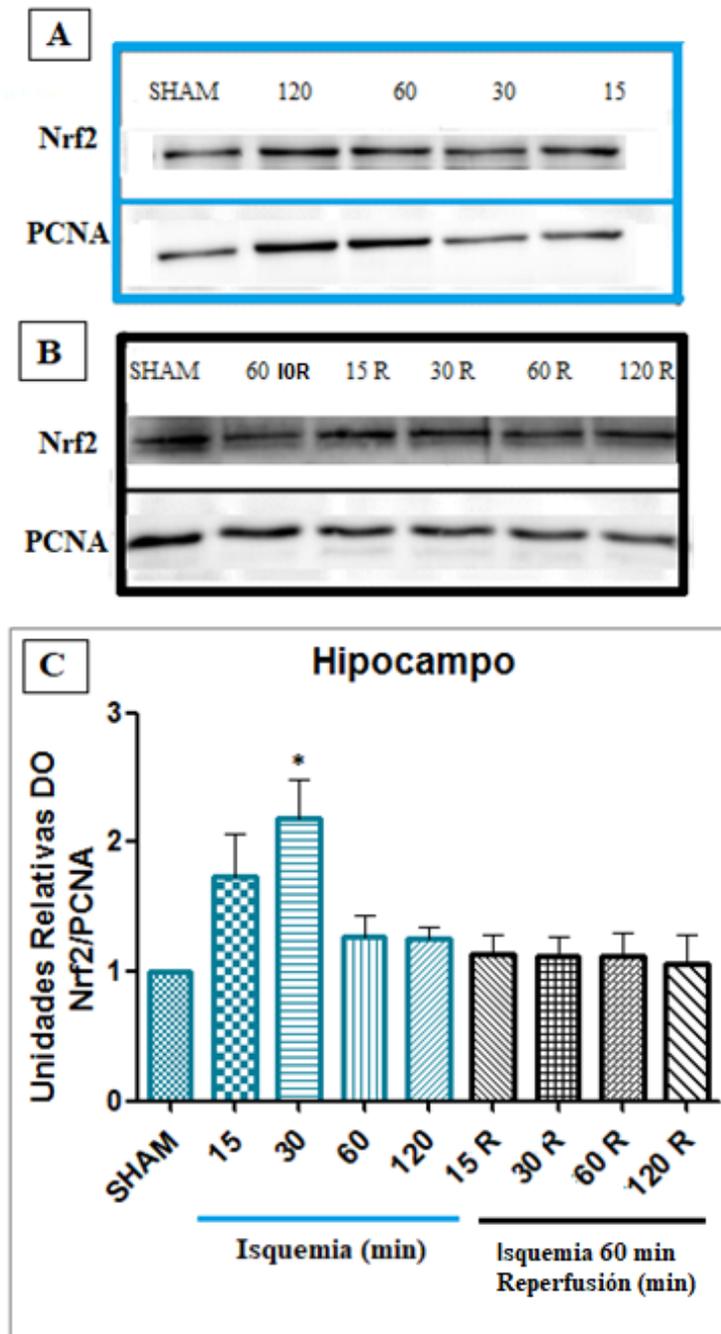


Figura 10. Efecto de la isquemia y la perfusión (IR) sobre los niveles nucleares de Nrf2 en el hipocampo de rata. **A.** Niveles de Nrf2 en animales sometidos a 15, 30, 60 y 120 min de isquemia. **B.** Niveles de Nrf2 en animales sometidos a 1 h de isquemia y 0, 15, 30, 60 y 120 min de perfusión. **A** y **B** muestran una imagen representativa, después del “stripping” de las mismas membranas, se empleó PCNA como control de carga de las muestras. **C** muestra la gráfica de los valores de la señal de Nrf2 normalizada con PCNA y ajustados a 1 con respecto al grupo sham. Las barras representan la media \pm EEM. $n=6$ /grupo. * $p<0.05$ vs el grupo sham

2. Alteraciones morfológicas en el hipocampo

Debido a que solo se observaron cambios en los niveles de expresión de Nrf2 en el hipocampo a los 30 min de isquemia, las siguientes determinaciones se realizaron en 3 regiones del hipocampo: GD, región CA1 y región CA3 (Figura 11) a los 30 min de isquemia.

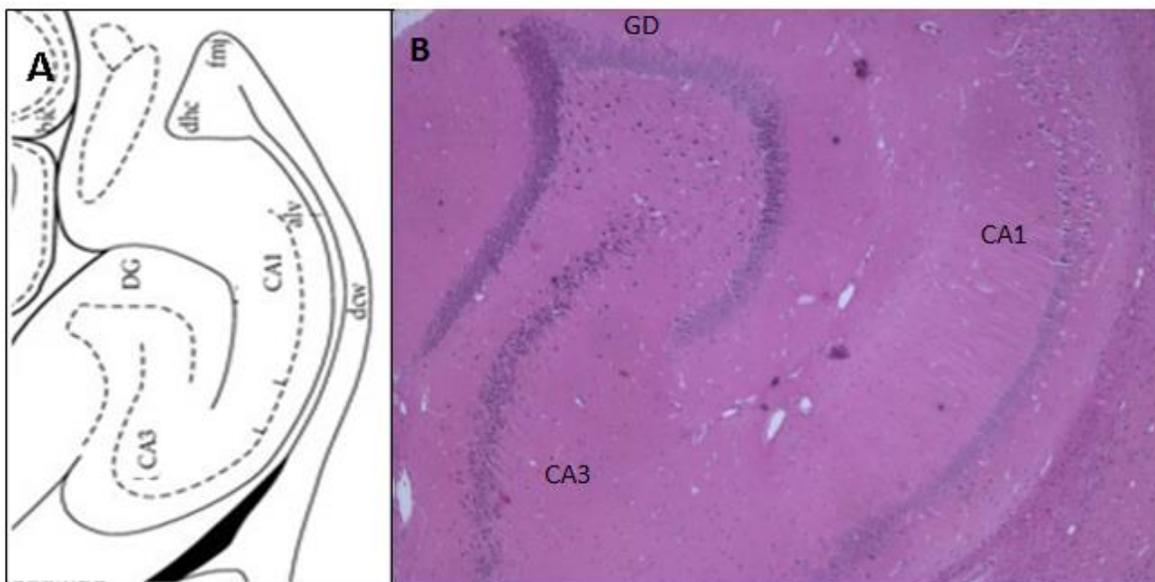


Figura 11. Dibujo e imagen a 10X de las regiones del hipocampo donde se evaluó el daño morfológico. **A.** Corte transversal de cerebro de rata a una profundidad de -3.86 mm al bregma que muestra la región del hipocampo (Imagen tomada y modificada de Paxinos & Watson, 2006). **B.** Imagen representativa a 10X del hipocampo izquierdo teñido con H&E donde se detallan las regiones estudiadas: Giro dentado (DG), región CA1 y región CA3 a una profundidad aproximada de -3.86 mm del bregma.

La isquemia (30 min) indujo núcleos picnóticos y daño en el neuropilo comparado con el grupo sham en las 3 regiones estudiadas del hipocampo: GD (Figura 12), CA1 (Figura 13) y CA3 (Figura 14). De las 3 regiones del hipocampo mencionadas se tomaron fotografías de 3 campos diferentes de un solo portaobjetos, es decir, si se tiene una $n=5$, en total se tienen 15 fotografías de cada región del hipocampo. Es importante mencionar que solamente en el GD el daño morfológico no fue uniforme a lo largo de esta región (Figura 12, ver discusión) y por eso solo en esta región se presentan 3 fotografías de la parte central, inicial y final del GD. Respecto a las regiones CA1 y CA3 tanto en el grupo sham e isquemia el daño fue uniforme a lo largo de estas regiones hipocampales, por tal motivo solo se presenta una imagen representativa.

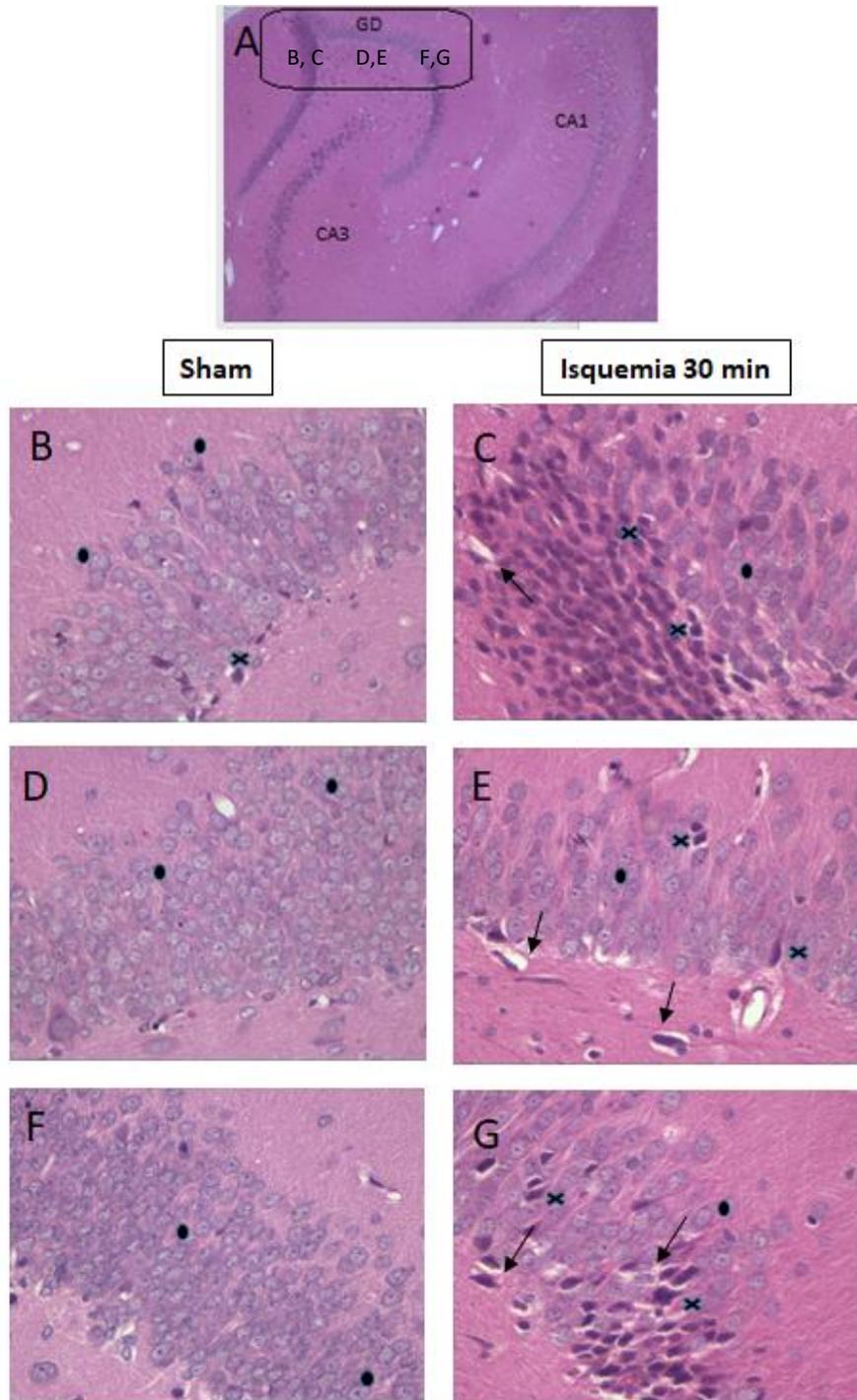


Figura 12. Alteraciones morfológicas inducidas por la isquemia (30 min) en el giro dentado (GD)
A. Imagen a 10X del hipocampo izquierdo teñido con H&E donde se señala el área del GD donde fueron tomadas las imágenes **B-G**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: sham (**B, D y F**) e isquemia 30 min (**C, E y G**). Se indica daño en el neuropilo (flecha negra), picnosis (cruz negra) y células viables (punto negro). n=5/grupo.

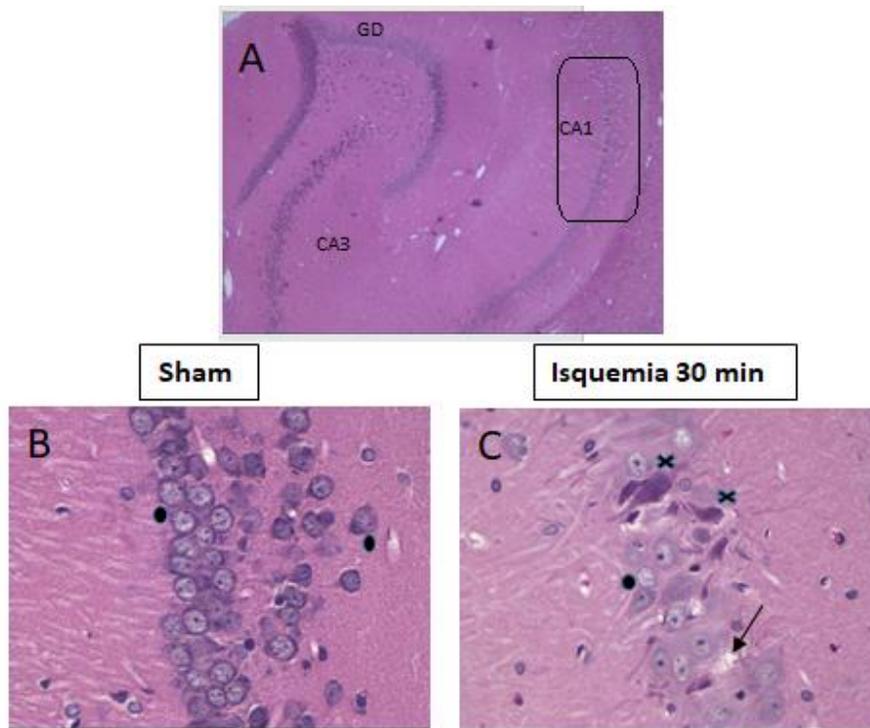


Figura 13. Alteraciones morfológicas inducidas por la isquemia (30 min) en la región CA1. **A.** Imagen a 10X del hipocampo izquierdo teñido con H&E donde se señala el área de la región CA1 donde fueron tomadas las imágenes **B-C**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: sham (**B**) e isquemia 30 min (**C**). Se indica daño en el neuropilo (flecha negra), picnosis (cruz negra) y células viables (punto negro). n=5/grupo.

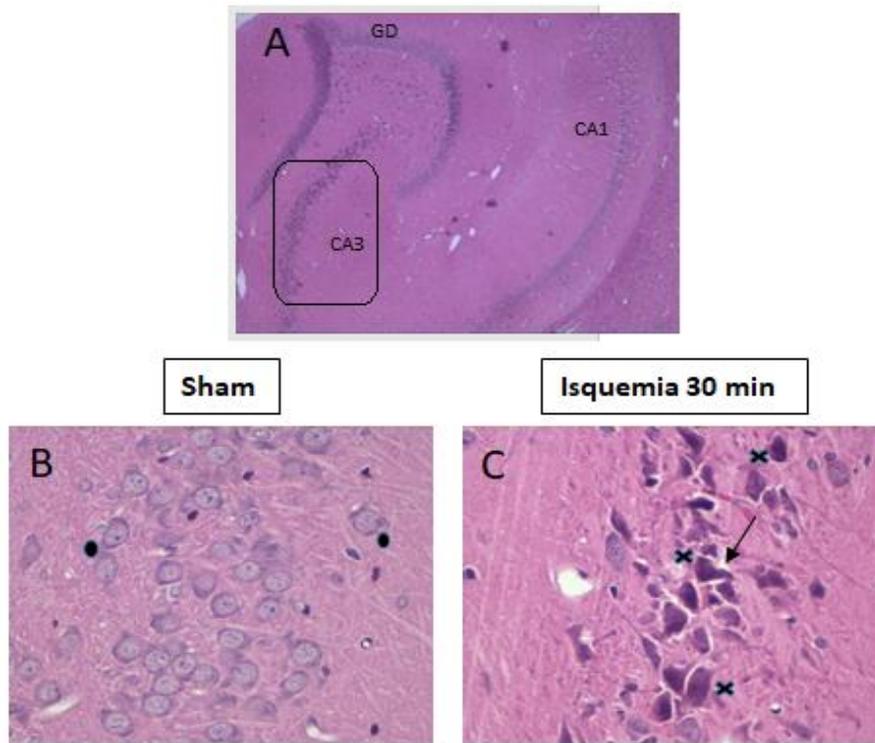


Figura 14. Alteraciones morfológicas inducidas por la isquemia (30 min) en la región CA3. **A.** Imagen a 10X del hipocampo izquierdo teñido con H&E donde se señala el área de la región CA3 donde fueron tomadas las imágenes **B-C**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: sham (**B**) e isquemia 30 min (**C**). Se indica daño en el neuropilo (flecha negra), picnosis (cruz negra) y células viables (punto negro). n=5/grupo.

El porcentaje de células con daño morfológico en el grupo de isquemia fue 40.1 ± 6.2 % en el GD, 45.7 ± 6.7 % en la región CA1 y 79.6 ± 1.5 % en la región CA3. En las tres regiones se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con los animales del grupo sham (5.2 ± 1.1 % en el GD, 5.0 ± 0.8 % en la región CA1 y 9.9 ± 1.0 % en la región CA3) (Figura 15).

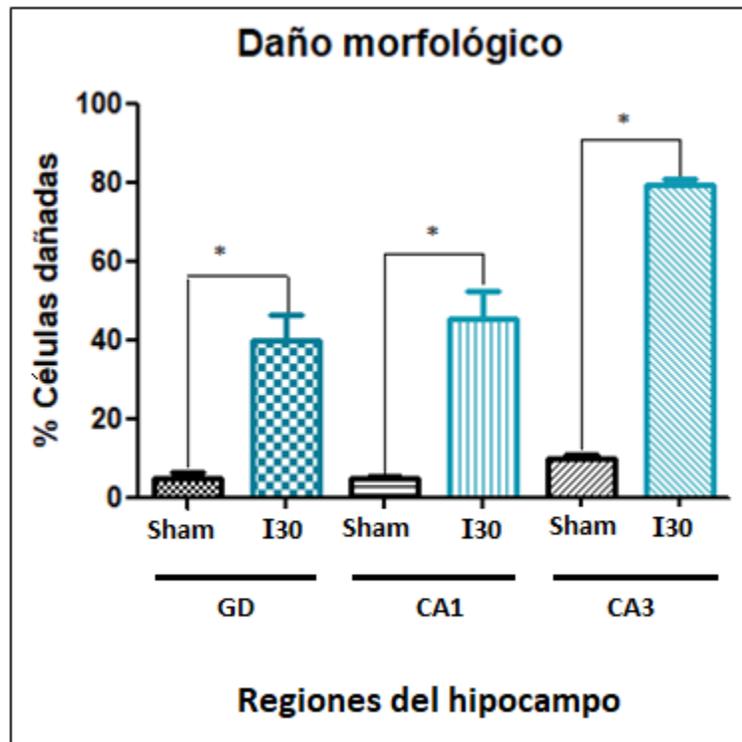


Figura 15. Porcentaje de células con daño en las 3 regiones del hipocampo después de 30 min de isquemia (I), evaluado mediante la tinción de H&E. Las tres regiones del hipocampo analizadas fueron GD, la región CA1 y la región CA3. Los resultados se muestran como la media \pm EEM, * $p < 0.05$ vs el grupo sham de su región. $n=5$ /grupo.

3. Niveles de Nrf2 en el hipocampo

Se evaluaron los niveles de expresión de Nrf2 en tres diferentes regiones del hipocampo mediante inmunohistoquímica (Figuras 16-18). En el grupo sham, la expresión de Nrf2 fue baja ya que se observan pocas células positivas a Nrf2 en las tres regiones del hipocampo, identificadas por una débil marca café en el citoplasma. Por otro lado, las células con mayor expresión del factor (marca café intensa) se observan en el grupo de isquemia 30 min.

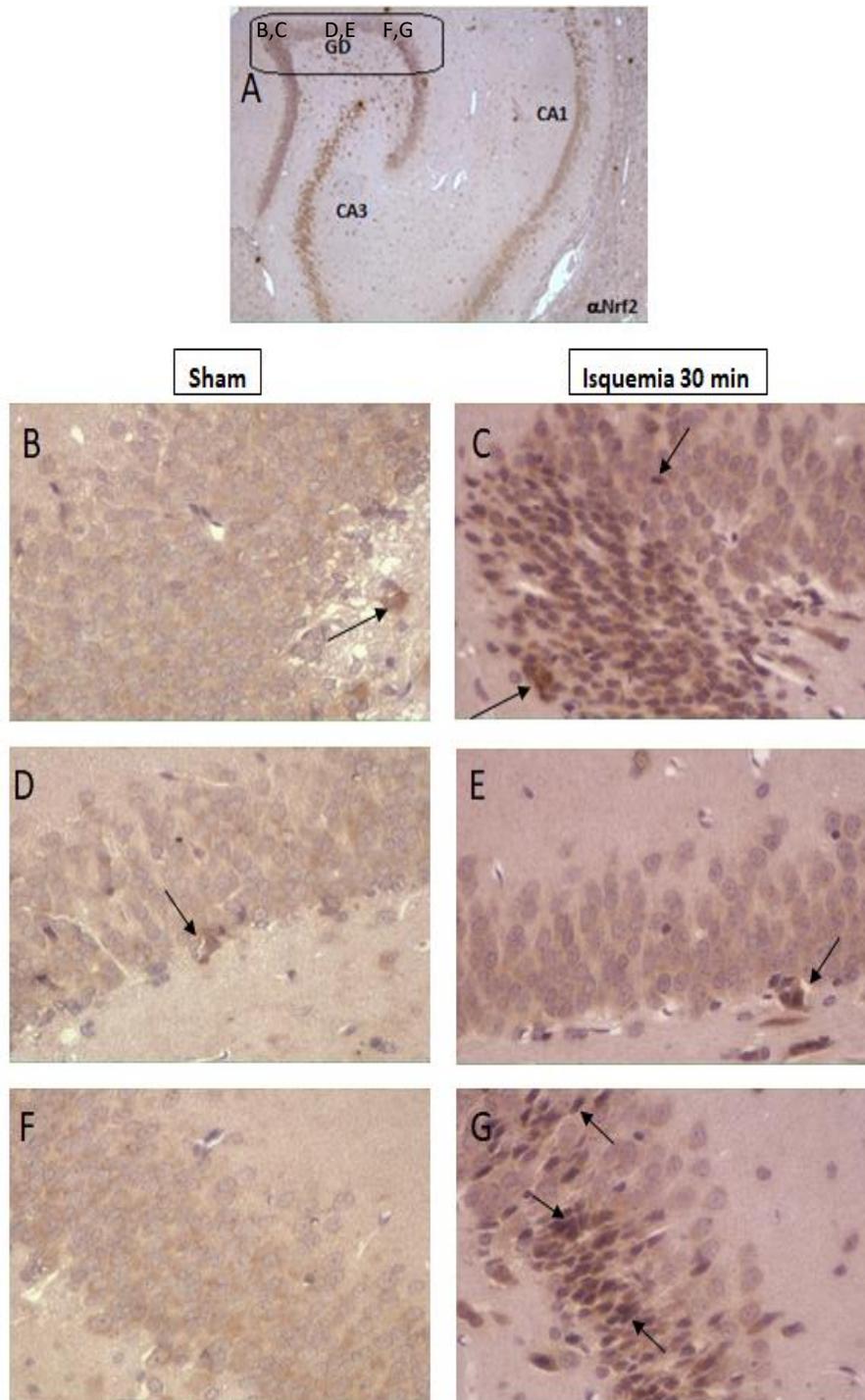


Figura 16. Efecto de la isquemia sobre la expresión de Nrf2 en el giro dentado (GD). **A.** Imagen a 10X de inmunohistoquímica contra Nrf2 del hipocampo izquierdo donde se señala el área del GD donde fueron tomadas las imágenes **B-G**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: sham (**B, D y F**) e isquemia 30 min (**C, E y G**). Se indican células positivas a la expresión de Nrf2 (flecha negra). n=5/grupo.

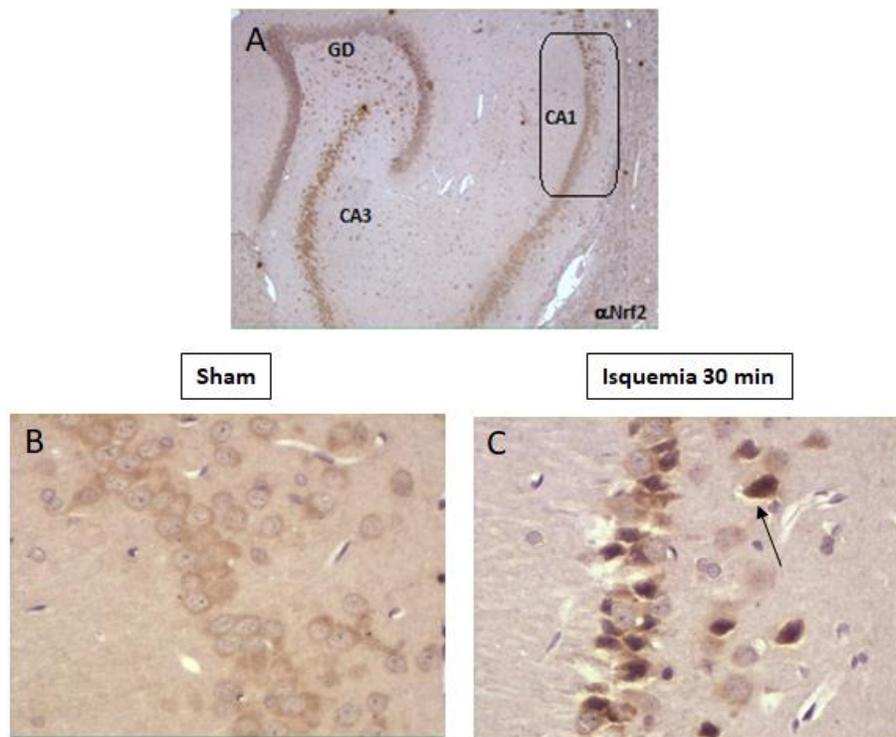


Figura 17. Efecto de la isquemia sobre la expresión de Nrf2 en la región CA1. **A.** Imagen a 10X de inmunohistoquímica contra Nrf2 del hipocampo izquierdo donde se señala el área de la región CA1 donde fueron tomadas las imágenes **B-C**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: sham (**B**) e isquemia 30 min (**C**). Se indican células positivas a la expresión de Nrf2 (flecha negra). n=5/grupo.

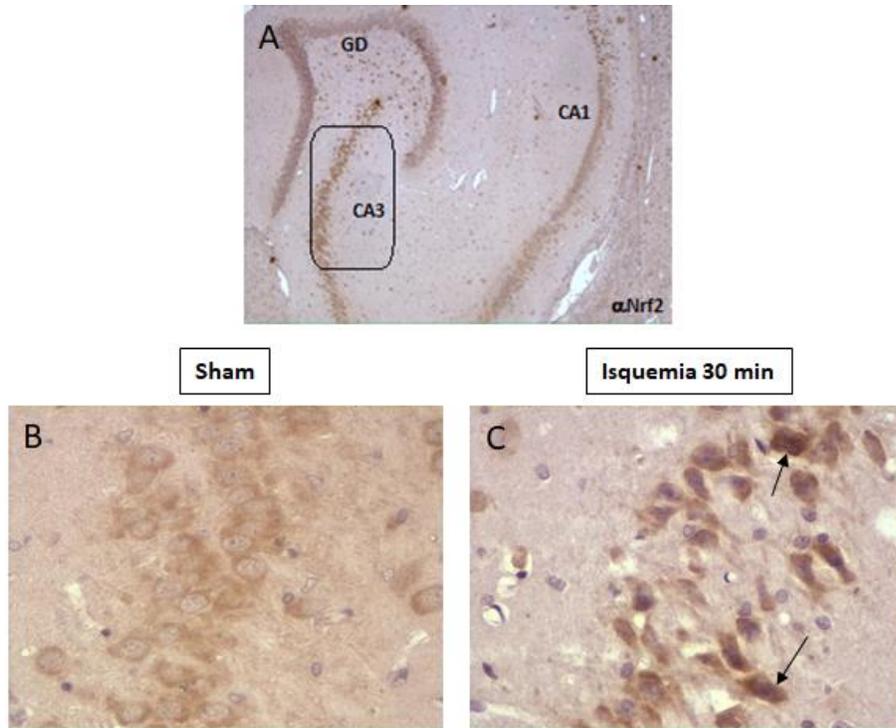


Figura 18. Efecto de la isquemia sobre la expresión de Nrf2 en la región CA3. **A.** Imagen a 10X de inmunohistoquímica contra Nrf2 del hipocampo izquierdo donde se señala el área de la región CA3 donde fueron tomadas las imágenes **B-C**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: sham (**B**) e isquemia 30 min (**C**). Se indican células positivas a la expresión de Nrf2 (flecha negra). (n=5/grupo).

El porcentaje de células que expresan Nrf2 en el grupo de isquemia fue $25.0 \pm 4.3\%$ en el GD, $26.4 \pm 5.7\%$ en la región CA1 y $50.9 \pm 3.0\%$ en la región CA3. En las tres regiones se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con los animales del grupo Sham ($2.8 \pm 0.8\%$ en el GD, $1.2 \pm 0.6\%$ en la región CA1 y $4.4 \pm 1.3\%$ en la región CA3) (Figura 19).

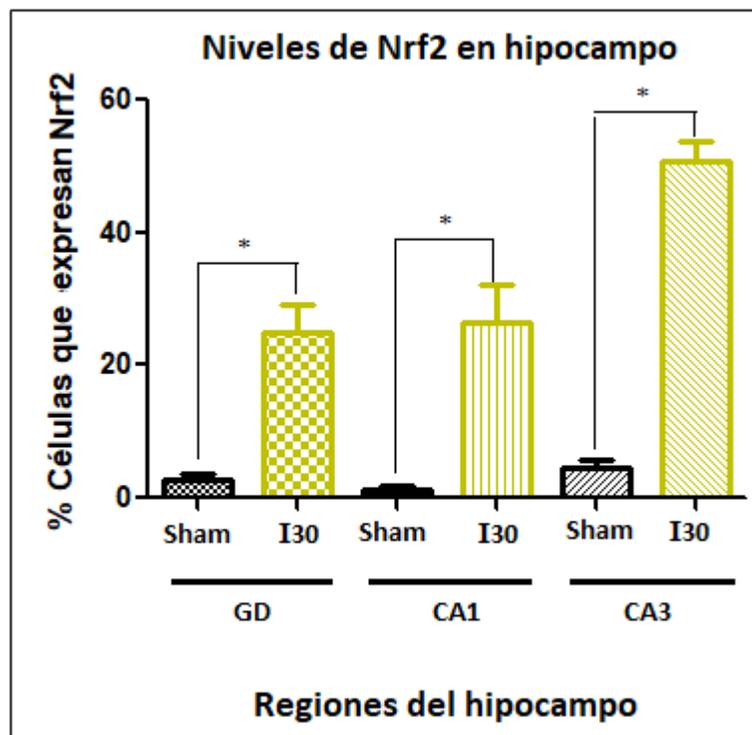


Figura 19. Porcentaje de células que expresan Nrf2 en las 3 regiones del hipocampo después de 30 min de isquemia (I). Las tres regiones del hipocampo analizadas fueron GD, la región CA1 y la región CA3. Los resultados se muestran como la media \pm EEM, * $p < 0.05$ vs el grupo sham de su región. $n=5$ /grupo.

4. Niveles de malondialdehído (MDA) en el hipocampo

Se evaluaron los niveles de MDA (un producto de la peroxidación de lípidos) como marcador indirecto de la presencia de EROs en el hipocampo (Figuras 20-22) mediante inmunohistoquímica. Células positivas a MDA se observaron con una coloración café intensa en el grupo de Isquemia 30 min en todas las regiones del hipocampo contrario a lo observado en el grupo Sham donde un escaso número de células positivas a MDA son observadas. El anticuerpo contra MDA permite visualizar los “aductos de MDA”, es decir, el MDA conjugado con una macromolécula. El MDA es un compuesto formado en todas las células de mamíferos como producto de la peroxidación de lípidos (ver discusión). Por ello, cuando se hable de “*niveles de MDA*” nos referimos a los “*aductos de MDA*” y no al MDA libre.

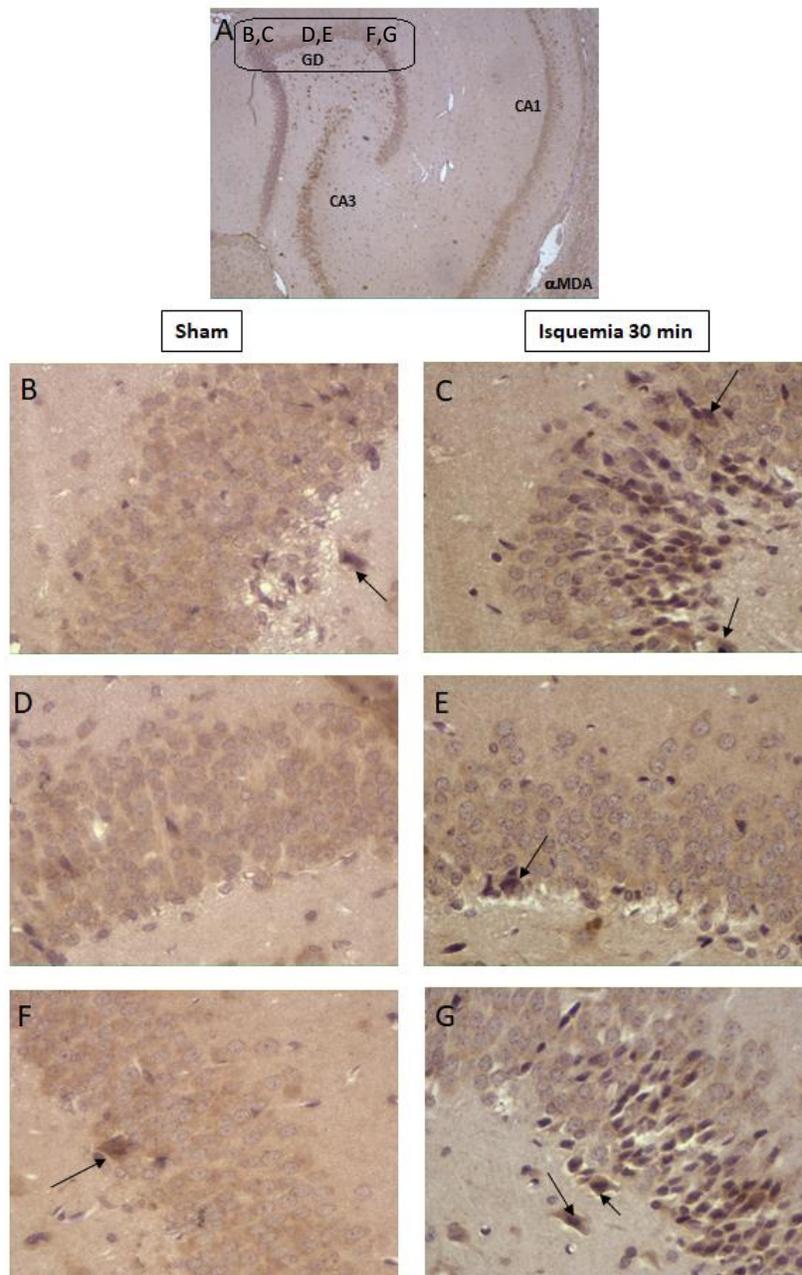


Figura 20. Efecto de la isquemia sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en el giro dentado (GD). **A.** Imagen a 10X de inmunohistoquímica contra MDA del hipocampo izquierdo donde se señala el área del GD donde fueron tomadas las imágenes **B-G**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: Sham (**B, D y F**) e isquemia 30 min (**C, E y G**). Se indican células positivas a MDA (flecha negra) $n_{sham} = 4$ y $n_{isquemia} = 5$.

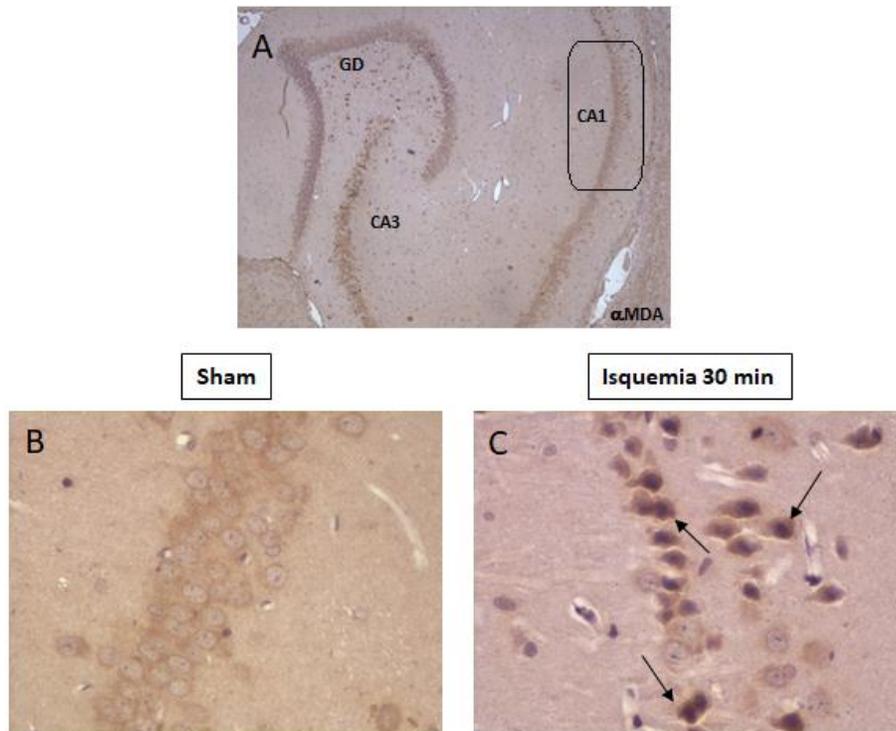


Figura 21. Efecto de la isquemia sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en la región CA1. **A.** Imagen a 10X de inmunohistoquímica contra MDA del hipocampo izquierdo donde se señala el área de la región CA1 donde fueron tomadas las imágenes **B-C**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: Sham (**B**) e isquemia 30 min (**C**). Se indican células positivas a MDA (flecha negra). $n_{sham} = 4$ y $n_{isquemia} = 5$.

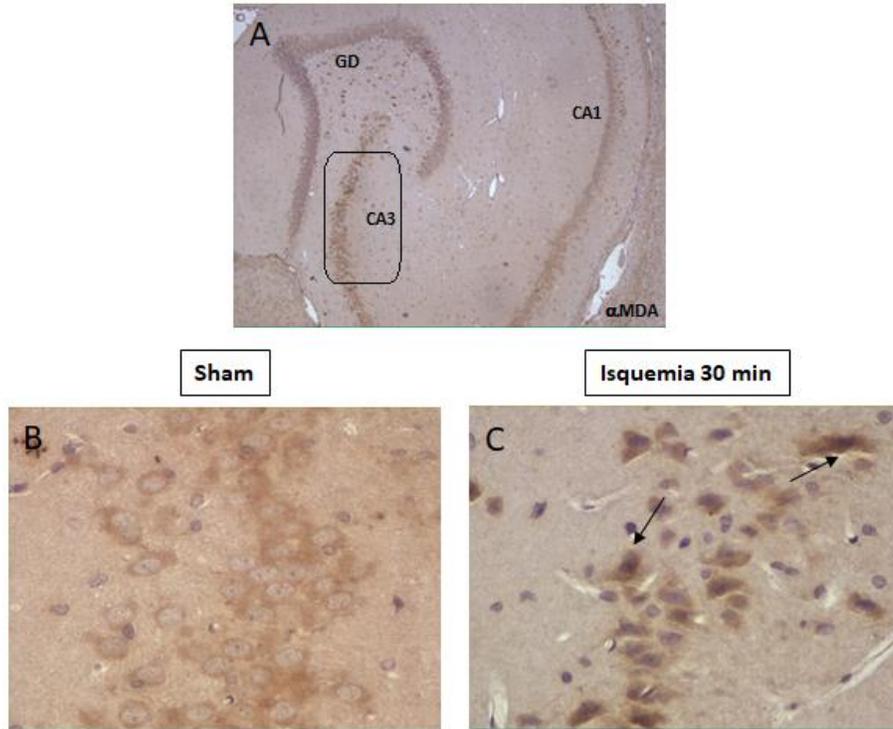


Figura 22. Efecto de la isquemia sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en la región CA3. **A.** Imagen a 10X de inmunohistoquímica contra MDA del hipocampo izquierdo donde se señala el área de la región CA3 donde fueron tomadas las imágenes **B-C**. Imágenes representativas a 40X en ambos grupos: Sham (**B**) e isquemia 30 min (**C**). Se indican células positivas a MDA (flecha negra). $n_{sham} = 4$ y $n_{isquemia} = 5$.

El porcentaje de células positivas a MDA en el grupo de isquemia fue 39.3 ± 4.1 % en el GD, 38.9 ± 5.0 % en la región CA1 y 53.6 ± 2.6 % en la región CA3. En las tres regiones se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con los animales del grupo sham (4.6 ± 1.3 % en el GD, 1.5 ± 0.5 % en la región CA1 y 9.5 ± 3.0 % en la región CA3) (Figura 23).

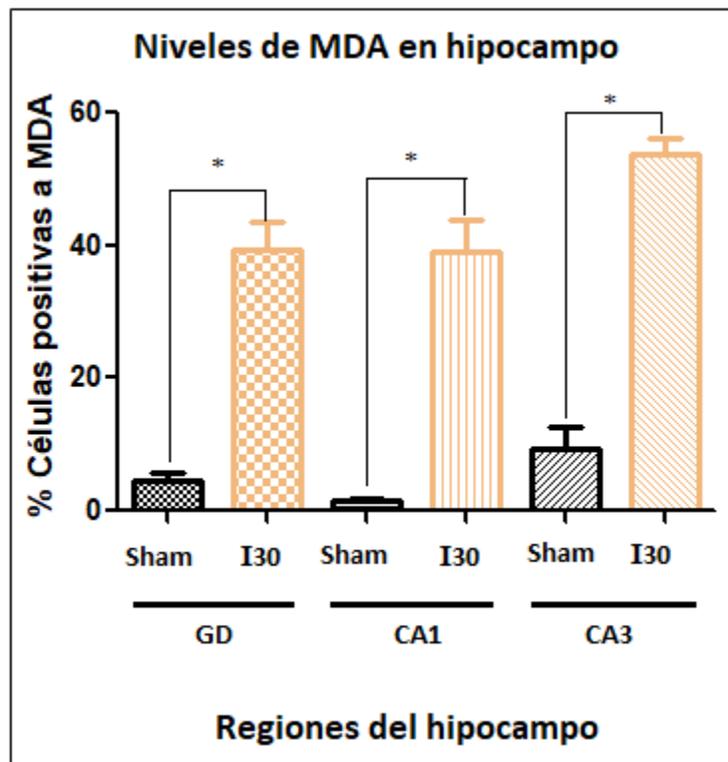


Figura 23. Porcentaje de células positivas a malondialdehído (MDA) en las 3 regiones del hipocampo después de 30 min de isquemia (I). Las tres regiones del hipocampo analizadas fueron GD, la región CA1 y la región CA3. Los resultados se muestran como la media \pm EEM, * $P < 0.05$ vs el grupo sham de su región.

Finalmente, la tabla 3 muestra la comparación del daño morfológico, así como los niveles de Nrf2 y MDA en las 3 regiones estudiadas. Se observa que la región con mayor daño es la región CA3 y es la misma región que muestra el mayor porcentaje de células positivas a Nrf2 y a MDA.

Tabla 5. Comparación del daño morfológico, expresión de Nrf2 y presencia de MDA en las diferentes regiones del hipocampo durante la isquemia.

	Regiones del hipocampo		
	GD	CA1	CA3
% células con daño morfológico	40.1±6.2 %	45.7±6.7 %	79.6±1.5 %
% de células que expresan Nrf2	25.0±4.3 %	26.4±5.7 %	50.9±3.0 %
% de células positivas a MDA	39.3±4.1 %	38.9±5.0 %	53.6.6±2.6 %

Los resultados se muestran como la media ± EEM. GD: giro dentado, CA1: región del hipocampo *cornu ammonis* 1, CA3: región del hipocampo *cornu ammonis* 3.

XII. DISCUSIÓN

Existen diferentes modelos experimentales para estudiar la lesión cerebral isquémica en animales adultos, uno de ellos es el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). En dicho modelo, la isquemia se inicia al introducir un filamento que ocluye el flujo de la arteria cerebral media, produciendo lesiones focales, con un núcleo isquémico, una zona de penumbra y tejido remoto no lesionado. Se sabe que la muerte celular comienza en el estriado y se extiende a la corteza y el hipocampo con tiempos prolongados de oclusión generando una lesión más grave (Larphaveesarp & Gonzalez, 2017).

La reperusión comienza cuando se retira el filamento. Actualmente la mejor manera de salvar vidas y limitar el desarrollo del área de infarto es la reperusión; sin embargo, si no inicia oportunamente se presenta el daño por isquemia-reperusión (IR) que es un problema clínico importante en el tratamiento del daño cerebral (Lakhan *et al.*, 2009). La patogénesis exacta de la IR cerebral aún no se comprende completamente, pero se ha demostrado que la inflamación, las ERO y ERN y la apoptosis son mecanismos implicados en la muerte celular (Wong *et al.*, 2008). La IR interrumpe el equilibrio entre la producción de ERO, favoreciendo la inactivación de los sistemas antioxidantes, lo que conduce a una acumulación excesiva de ERO que contribuye al daño del tejido cerebral causando disfunción y muerte celular por la lipoperoxidación, así como la oxidación de proteínas, ADN y ARN (Reshi *et al.*, 2014).

El factor Nrf2 parece desempeñar un papel importante en la protección de las células cerebrales contra la lesión isquémica cerebral, ya que una pérdida de función del Nrf2 aumenta el tamaño del infarto cerebral y los déficits neurológicos después de un evento isquémico (Shah *et al.*, 2007; Shih *et al.*, 2005). Por ello, el objetivo fue evaluar la expresión del factor de transcripción Nrf2 en el cerebro de rata en respuesta a los diferentes tiempos de isquemia con y sin reperusión. Por ello, se midieron los niveles proteicos de Nrf2 en el estriado, la corteza y el hipocampo de rata mediante western blot después de diferentes tiempos de

isquemia (15, 30, 60 y 120 min) y durante 1 h de isquemia con diferentes tiempos de reperfusión (15, 30, 60 y 120 min).

Los niveles de Nrf2 en el núcleo no se modificaron en el estriado ni en la corteza, lo cual podría deberse a que los niveles de ERO no fueron suficientes para desestabilizar la unión Keap1/Nrf2 y por tanto el factor de transcripción Nrf2 no puede traslocarse al núcleo. Otro factor que podría inducir esta falta de respuesta es que tanto el estriado como la corteza están irrigados principalmente por la arteria cerebral media (Larphaveesarp & Gonzalez, 2017), localizándose en la zona del núcleo isquémico. Esto podría explicar por qué en el estriado se observa una tendencia a aumentar los niveles del factor en el núcleo en los primeros 30 min de isquemia y en tiempos más prolongados estos niveles disminuyen.

Se puede suponer erróneamente que en condiciones de hipoxia o durante la disminución del aporte sanguíneo a ciertos tejidos, como en el caso de los animales sometidos al modelo de MCAO, no habrá producción de ERO por la baja cantidad de O₂; pero evidencia demuestra la producción ERO en células Hep3B durante la hipoxia por parte del Complejo III mitocondrial (Chandel *et al.*, 1998). Así mismo, diferentes grados de hipoxia provocan un aumento en la producción de ERO en función de la presión parcial de O₂ a la que los cardiomiocitos son expuestos (Duranteau *et al.*, 1998); además, la hipoxia redujo los niveles de varios antioxidantes en cultivos de células endoteliales, lo que se atribuyó a la formación de ERO durante la disminución de la presión parcial de O₂ (Plateel *et al.*, 1995). En nuestro conocimiento el presente trabajo es el primero en reportar un marcador indirecto de producción de ERO durante la isquemia *in vivo*, demostrándolo mediante la presencia de MDA el cual es un marcador indirecto de presencia de ERO.

Es importante mencionar que el flujo sanguíneo cerebral en un humano adulto es de 60 ml/100 g de tejido, por debajo del 10% de este flujo se genera el núcleo isquémico en donde la mayoría de las células mueren por necrosis. Cuando el flujo es mayor a 10% pero menor a 50% se genera la zona de penumbra donde las células se encuentran metabólicamente comprometidas, pero pueden recuperarse

(Sánchez, 2009). Por ello, durante la isquemia es posible la formación de ERO, especialmente en la zona de penumbra lo que puede favorecer la liberación de Nrf2 y su posterior traslocación al núcleo.

Dado que Nrf2 se considera uno de los reguladores maestros de la defensa antioxidante endógena ya que es sensible al estado redox celular (Itoh *et al.*, 1997; 1999), se esperaba que durante la reperfusión sanguínea los niveles nucleares de Nrf2 aumentaran en todas las regiones cerebrales estudiadas, ya que diversos autores han reportado un aumento de las ERO y ERN liberadas por las células inflamatorias alrededor de las áreas lesionadas (Wong *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012); sin embargo, los niveles nucleares de Nrf2 no se modificaron en la corteza, el estriado, ni el hipocampo durante la reperfusión, probablemente debido a que la lesión por IR es demasiado grave y afecta a las células aledañas a la lesión, evitando que estas puedan responder al estado oxidante, o bien el tiempo de reperfusión aún es muy corto. La gravedad de la lesión se puede evaluar a través de una variedad de métodos, que incluyen resonancia magnética, análisis conductuales a corto o largo plazo o por histología (Larphaveesarp & Gonzalez, 2017).

Por otra parte, en el hipocampo a los 30 min de isquemia se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles nucleares de Nrf2, con lo cual se podría favorecer la protección celular al unirse el factor Nrf2 a las secuencias ARE en las regiones reguladoras de genes como HO-1, las SODs, la GPx, las CATs, algunos miembros de las PRDXs, la NQO1, la GCL, la GSH reductasa, la GST y la γ -glutamylcisteina sintasa (Chen *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2009; Shelton *et al.*, 2013).

A diferencia de la corteza y el estriado que son irrigados principalmente por la arteria cerebral media (Larphaveesarp & Gonzalez, 2017), la vascularización arterial del hipocampo depende de las ramas colaterales de la arteria cerebral posterior y de la arteria coroidea anterior, formando la red de arterias hipocampales superficiales que a su vez conducen a arterias intrahipocampales profundas (Tatu & Vuillier, 2014), por lo que puede recibir mayor cantidad de aporte sanguíneo durante la MCAO.

Debido a que solo observamos aumento de Nrf2 nuclear en el hipocampo a los 30 min de isquemia, la presente investigación se centró en este tejido y este tiempo de isquemia. El hipocampo es una estructura formada por dos láminas de allocorteza entrelazadas, el giro dentado (GD) y el *cornu ammonis* (CA), este último, se divide generalmente en cuatro campos corticales: CA1, CA2, CA3 y CA4. Esta división se basa en la morfología celular de las neuronas corticales, la región de la CA también se ha clasificado según su susceptibilidad a la hipoxia: CA1 se considera un sector vulnerable a la hipoxia, mientras que CA3 se considera la más resistente (Tatu & Vuillier, 2014).

Se realizó el análisis histológico de los grupos sham e isquemia 30 min solamente en el hipocampo, en tres regiones de éste: DG, la región CA1 y la región CA3. En el grupo isquemia se observaron núcleos picnóticos, daño en el neuropilo en todas las regiones hipocampales, por lo cual se puede decir que la MCAO daña las células del hipocampo en comparación con el grupo sham. El porcentaje de células con daño en el grupo de isquemia fue 40.1 ± 6.2 % en GD, 45.7 ± 6.7 % en la región CA1 y 79.6 ± 1.5 % en la región CA3, lo cual nos indica que la región CA1 es la más resistente a la isquemia y la región CA3 es la menos resistente.

Para poder entender por qué hay diferencia en el porcentaje de daño morfológico en las diferentes regiones hipocampales estudiadas, es necesario conocer la vascularización interna del hipocampo. La arteria cerebral posterior conduce a las arterias temporales inferiores (anterior, medial y posterior), las arterias coroideas posterolaterales y las arterias esplénicas (Haegelen *et al.*, 2012). De estas arterias colaterales surgen las arterias hipocampales superficiales (Stephens, 1969; Marinković *et al.*, 1992), éstas últimas, dan lugar a arterias intraparenquimatosas que pueden clasificarse en arterias intrahipocampales ventrales principales, arterias intrahipocampales dorsales principales, arterias intrahipocampales ventrales pequeñas y arterias intrahipocampales dorsales pequeñas.

Las arterias intrahipocampales ventrales principales penetran en el hipocampo entre los dientes del margo denticulatus y luego vascularizan CA1 y CA2. Las arterias intrahipocampales dorsales principales tienen una trayectoria más corta, que pasa

entre los dientes del margo denticulatus y entra en CA4 y CA3. Las arterias intrahipocampales dorsales principales también vascularizan la parte distal del giro dentado a través de las arterias rectilíneas (Duvernoy, 2013) (Figura 24).

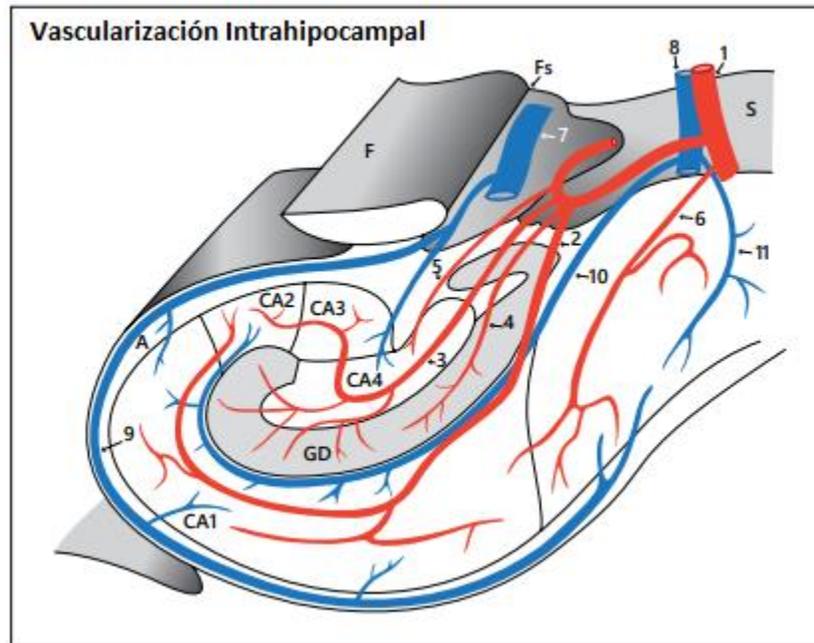


Figura 24. Vascularización Intrahipocampal (Tatu & Vuillier, 2014).

A = Alveus; F = fimbria; Fs = surco fimbriodentado; S = subiculum; GD = giro dentado; 1 = arteria hipocampal superficial; 2 = arteria hipocampal ventral principal; 3 = arteria hipocampal dorsal principal; 4 = arteria hipocampal ventral pequeña; 5 = arteria hipocampal dorsal pequeña; 6 = arterias del subiculum; 7 = arco venoso del surco fimbriodentado; 8 = arco venoso del surco del hipocampo; 9 = venas intrahipocampales subependimarias; 10 = venas intrahipocampales del surco; 11 = venas del subiculum.

El hecho de que existan diversas arterias que irrigan el hipocampo podría explicar la diferencia en el porcentaje de células con daño en las regiones de este, sugiriendo que la arteria intrahipocampal ventral se vea menos afectada por la isquemia en comparación con la arteria intrahipocampal dorsal, por ello CA3 muestra el mayor daño.

Además del daño morfológico, se evaluó la expresión del factor Nrf2, así como el estado redox de las células del hipocampo durante la isquemia.

Mediante inmunohistoquímica se observó que la expresión de Nrf2 aumenta en el hipocampo durante la isquemia. El porcentaje de células que expresan el factor Nrf2 en el grupo de isquemia fue 25.0 ± 4.3 % en el GD, 26.4 ± 5.7 % en la región CA1 y 50.9 ± 3.0 % en la región CA3, en las tres regiones se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con los animales del grupo Sham.

Como ya se mencionó, existe evidencia de la producción de ERO durante la hipoxia en ensayos *in vitro*, pero hasta ahora no hay estudios que evidencien la producción de ERO durante la isquemia *in vivo*, siendo el presente trabajo el primero en mostrar un marcador indirecto de presencia de ERO *in vivo*. Por lo cual se puede intuir que durante la isquemia también se producen ERO a pesar del bajo aporte de O₂.

Para evaluar si la presencia de ERO es lo que está favoreciendo la traslocación al núcleo de Nrf2 que se evidenció en los ensayos de western blot y se comprobó mediante inmunohistoquímica, se evaluó mediante inmunohistoquímica la presencia de MDA, el cual es un compuesto formado en todas las células de mamíferos como producto de la peroxidación lipídica. MDA es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo producido como un subproducto de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y el metabolismo del ácido araquidónico. El MDA se combina fácilmente con varios grupos funcionales en moléculas que incluyen proteínas, lipoproteínas y ADN, reacciona con este último para formar aductos de desoxiguanosina y desoxiadenosina, el aducto principal del ADN es una pirimidopurinona llamada M1G. Las proteínas modificadas con MDA pueden mostrar un comportamiento fisicoquímico y antigenicidad alterados. Los anticuerpos contra esta molécula ayudan a visualizar los aductos de MDA y por lo tanto puede ser utilizado como marcador indirecto de la presencia de ERO y para evidenciar que ya se ha producido daño por presencia de ERO.

El porcentaje de células positivas a MDA en el grupo de isquemia fue 39.3 ± 4.1 % en el GD, 38.9 ± 5.0 % en la región CA1 y 53.6 ± 2.6 % en la región CA3. En las tres regiones se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con los animales del grupo Sham.

En GD se observó que tanto el daño morfológico, la expresión de Nrf2, así como la presencia de MDA no es uniforme a lo largo de esta región hipocampal, es decir, hacia la parte distal y proximal hay mayor daño y mayor presencia de Nrf2 y MDA; mientras que en la parte central del GD el daño es menor, así como la expresión de Nrf2 y la presencia de MDA. Es importante mencionar que la pequeña arteria intrahipocampal ventral suministra de sangre la parte proximal del giro dentado y una ramificación de la arteria dorsal principal irriga la región central y distal de GD, es por esto que la región central presenta menor daño morfológico, pero en la parte distal se incrementa el daño al estar más alejada del nacimiento de la ramificación de la arteria que lo irriga.

Dado que los lípidos son responsables de mantener la integridad de las membranas celulares, los peróxidos lipídicos ejercen sus efectos tóxicos al alterar el ensamblaje, la composición, la estructura y la dinámica de las membranas lipídicas (Gaschler & Stockwell, 2017). Los dos ERO que pueden afectar profundamente a los lípidos son el radical hidroxilo y el hidroperoxilo (Ayala *et al.*, 2014).

Una vez formado el MDA, se puede metabolizar enzimáticamente o reaccionar con proteínas celulares y tisulares o con el ADN para formar aductos que producen daños biomoleculares (Esterbauer *et al.*, 1991). Los aductos de MDA son biológicamente importantes porque pueden participar en reacciones, como el entrecruzamiento intramolecular o intermolecular de proteína y/o ADN que puede inducir una alteración profunda en las propiedades bioquímicas de las biomoléculas y acumularse durante el envejecimiento y las enfermedades crónicas (Ayala *et al.*, 2014). Los resultados ponen de manifiesto la presencia de aductos de MDA como consecuencia de la presencia de ERO durante la isquemia.

Resulta interesante el hecho de que de acuerdo con la bibliografía se observa un patrón de vulnerabilidad selectiva en el hipocampo: el daño isquémico generalmente afecta a las neuronas en el área de CA1, sin embargo, los estudios que sustentan este hecho se han realizados en modelos de isquemia-reperfusión en donde los animales son sometidos a isquemia focal o local y las muestras histológicas son recolectadas a las 24, 72 o a los 7 días de perfusión (Schmidt & Kastner, 2017).

Los resultados presentados en este trabajo evidencian mayor daño morfológico en la región CA3 comparado con la región CA1 a los 30 min de isquemia, contrario a lo observado por otros autores. Este es el primer trabajo que describe el efecto de la isquemia sin reperfusión sobre el hipocampo. En este punto es importante recordar que la región CA3 es la región que mayor expresión de Nrf2 presentó. La presencia de ERO durante la isquemia en el hipocampo favorece la desestabilización del complejo Keap1/Nrf2, con lo cual Nrf2 puede traslocarse al núcleo para unirse a sus genes blanco, y esto podría ser la explicación de por qué durante la reperfusión, consistente con lo observado en la bibliografía, resulta ser más resistente la región CA3 comparado con la región CA1, por lo tanto se podría suponer que el aumento en la expresión de Nrf2 durante la isquemia le conferirá a la células mayor protección durante la reperfusión, haciendo una analogía sería similar a cuando los osos se preparan para el invierno.

Entre los genes regulados por Nrf2 se encuentran los genes de muchas enzimas de la defensa antioxidante (Itoh *et al.*, 1997); sin embargo, aunque la expresión de Nrf2 aumenta, éste no está ejerciendo su actividad citoprotectora durante la isquemia ya que observamos daño. Por otra parte, el GD a pesar de ser la región hipocampal con menor expresión de Nrf2 durante la isquemia fue la región más resistente, ya que presentó el menor daño morfológico de todas las regiones hipocampales, aunque presentó mayor porcentaje de células positivas a MDA comparado con la región CA1.

XIII. CONCLUSIÓN

La oclusión de la arteria cerebral media induce la traslocación al núcleo del factor Nrf2 en el hipocampo a los 30 min de isquemia, pero no induce cambios en el estriado ni en la corteza frontal. La reperfusión sanguínea después de 1 hora de isquemia no induce cambios en los niveles nucleares del factor Nrf2 en estriado, corteza frontal ni hipocampo.

Durante la isquemia hay formación de MDA antes de los 30 min sugiriendo la presencia de un estado pro-oxidante que es suficiente para inducir la traslocación de Nrf2 al núcleo; sin embargo, a los 30 min de isquemia no es posible observar la actividad citoprotectora del factor Nrf2 ya que a pesar de estar aumentada su expresión hay daño.

En este modelo de isquemia, la región del hipocampo más resistente a la isquemia es GD> CA1> CA3.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- American Heart and Stroke Association, Four Letters: F-A-S-T, three numbers: 9-1-1, recuperado de:
http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/WarningSigns/Stroke-Warning-Signs-and-Symptoms_UCM_308528_SubHomePage.jsp 30 de mayo 2017 16:15
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61:657–668.
- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* ;2014:360438.
- Basu A, Lazovic J, Krady JK, Mauger DT, Rothstein RP, Smith MB and Levison SW (2005) Interleukin-1 and the interleukin- 1 type 1 receptor are essential for the progressive neurodegeneration that ensues subsequent to a mild hypoxic/ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 17-29.
- Berman FW, Murray TF (1997) Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is mediated predominantly by NMDA receptors that are activated as a consequence of excitatory amino acid release. *J Neurochem* 69:693–703.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723–749.
- Chan PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:2–14.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, & Schumacker PT (1998). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Induced Transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20 11715.
- Chen B, Lu Y, Chen Y, Cheng J (2015) The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol* 225:R83–R99.

- Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14:1505–1517.
- Crompton MR. (1962). The pathology of ruptured middle cerebral aneurysms with special reference to the differences between the sexes. *Lancet*; 2:421–25.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655–673.
- Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabin J, Muñoz M, Abiusi G (2001) Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol*. 33(5):455-464.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7–61.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22:391-397.
- Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163–221.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet*, 371:1612-1623.
- Duan Q, Wang X, Wang Z, Lu T, Han Y and He S (2004) Role of mitochondria in neuron apoptosis during ischemia-reperfusion injury. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 24, 441-444.
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, & Schumacker PT (1998). Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*, 273(19), 11619–11624.
- Duvernoy HM (2013). *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI*. Berlin: Springer.
- Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ and Doevendans PA (2004) Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 61, 414-426.

- Esterbauer H, Schaur R, Zollner H (1991) Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11(1):81–128.
- Ferkany JW, Zaczek R, Coyle JT (1982) Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 298:757–759.
- Friedman LK (2006) Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Mol Interv* 6:315–329.
- Fujita M, Tsuruta R, Kaneko T, Otsuka Y, Kutsuna S, Izumi T, Aoki T, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M and Maekawa T (2010) Hyperoxia suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats: laboratory study. *Shock* 34, 299-305.
- Gaschler MM, & Stockwell BR (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 419–425.
- Haegelen C, Berton E, Darnault P, & Morandi X (2012). A revised classification of the temporal branches of the posterior cerebral artery. *Surgical & Radiologic Anatomy*, 34(5), 385–391.
- Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A (2009) Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 46: 443–453.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem. Sci.* 39 199–218.
- Hoksbergen AW, Fulesdi B, Legemate AD, Csiba I (2003) Collateral configuration of the circle of Willis: Transcranial color-coded duplex ultrasonography and comparison with postmortem anatomy. *Stroke*. 31:1346–51.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31–108

INEGI, Estadísticas de mortalidad, recuperado de:

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est> ,

consultada 30 de mayo 2017 15:10

Iqbal S (2013) A Comprehensive Study of the Anatomical Variations of the Circle of Willis in Adult Human Brains. *JCDR*, 7(11), 2423–2427.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 313–322.

Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M (1999) Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress, *Free Radic. Res.* 31 319–324.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh 2 domain, *Genes Dev.* 13 76–86.

Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES and Low WC (1998) Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery* 43, 1382-1396; discussion 1396-1397.

Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53(Suppl 3): S26–36

Kahles T, Brandes RP (2012) NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. *Cell Mol Life Sci* 69:2345–2363.

Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22:991-996.

Keiko, T., Hozumi, M., & Masayuki, Y (2011) Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes To Cells*, (2), 123. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x

Kensler TW, Wakabayashi N & Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 47:89-116.

- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K , Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3- based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2, *Mol. Cell. Biol.* 24 7130–7139.
- Lakhan SE, Kirchgessner A and Hofer M (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl. Med.* 7, 97.
- Larphaveesarp A, & Gonzalez FF (2017) Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Neonatal Stroke in P10 Rats. *Journal Of Visualized Experiments: Jove*, (122).
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ and Choi DW (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J. Clin. Invest.* 106, 723-731.
- Li M, Qu YZ, Zhao ZW, Wu SX, Liu YY, Wei XY, Gao L and Gao GD (2012) Astragaloside IV protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury correlating to suppression of neutrophils adhesion-related molecules. *Neurochem. Int.* 60, 458-465.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, Takasawa K, Ohtsuki T, Xia Z, Storm D, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M. (2001). Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *J Neurosci* 21:9204-9213.
- Marinković S, Milisavljević M, & Puskas L (1992) Microvascular anatomy of the hippocampal formation. *Surgical Neurology*, 37(5), 339–349.
- Markus HS (2011) Stroke genetics. *Hum Mol Genet.* 20(R2): R124-R131
- Medline Plus, Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. “Accidente cerebrovascular” recuperado de:
https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_presentations/100218_2.htm consultada 18 de mayo 2019 10:22
- Motohashi H, Yamamoto M (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism, *Trends Mol. Med.* 10 549–557.

- Muralikrishna Adibhatla R and Hatcher JF (2006) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 376-387.
- Nakka VP, Gusain A, Mehta, SL and Raghuram R (2008) Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol* 37, 7-38.
- Nishizawa Y. (2001). Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 69:369-381
- Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK (2014) Regulation of Nrf2—an update. *Free Radic Biol Med* 66:36–44.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719–721.
- OMS (2016) *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. Geneva, World Health Organization.
- OMS, Las 10 principales causas de defunción, recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/> consultada 19 de mayo 2019, 15:13
- Ouyang YB, Stary CM, White RE, Giffard RG (2015) The use of microRNAs to modulate redox and immune response to stroke. *Antioxid Redox Signal* 22:187–202.
- Palomeras-Soler E, Casado-Ruiz V (2010) Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences *Curr Cardiol Rev.* Aug; 6(3): 138–149.
- Papp D, Lenti K, Módos D, Fazekas D, Dúl Z, Türei D, & Korcsmáros T (2012). The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. *FEBS Letters*, 586(13), 1795-1802.
- Phaniendra A, Jestadi DB, & Periyasamy L (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1–26

- Plateel M, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R, & Teissier E (1995) Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. *Journal Of Neurochemistry*, 65(5), 2138–2145.
- Reshi ML, Su YC, Hong JR (2014) RNA viruses: ROS-mediated cell death. *Int J Cell Biol* 2014:467452.
- Riggs HE, Rupp C. (1963). Variation in form of circle of Willis. The relation of the variations to collateral circulation: anatomic analysis. *Arch Neurol*; 8:24–30.
- Satoh T, Okamoto SI, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, Tohyama K, Lipton SA (2006) Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:768–773.
- Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24: R453–R462.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 36:30–38.
- Shah ZA, Li RC, Thimmulappa RK, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, Dore S (2007) Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury. *Neuroscience* 147:53–59.
- Shelton LM, Park BK, Copple IM (2013) Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. *Kidney Int* 84:1090–1095.
- Shih AY, Li P, Murphy TH (2005) A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J Neurosci* 25:10321–10335.
- Sies H (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4:180–183.
- Stephens, R. B. (1969). Arteries and veins of the human brain. *Springfield, Ill.: Thomas.*
- Schmidt-Kastner R (2015) Genomics approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience* 309, 259-279.

- Sugawara T and Chan PH (2003) Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 597-607.
- Surh Y, Kundu JK, & Na H (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica* 74(13), 1526-1539.
- Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M (2013) Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 340–346.
- Tatu L, & Vuillier F (2014) Structure and vascularization of the human hippocampus. *Frontiers Of Neurology And Neuroscience*, 34, 18–25.
- Yilmaz G, Granger DN (2008) Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res*, 30:783-93.
- Wang Y, Gu ZL, Cao Y, Liang ZQ, Han R, Bennett MC, Qin ZH (2006) Lysosomal enzyme cathepsin B is involved in kainic acid-induced excitotoxicity in rat striatum. *Brain Res* 1071:245–249
- Wang Y, Han R, Liang ZQ, Wu JC, Zhang XD, Gu ZL, Qin ZH (2008) An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy* 4:214–226
- Wong Ch, Crack PJ (2008) Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injur. *Curr Med Chem* 15:1-14.
- Zhang DD (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews* 38(4): 769-789.
- Zhou S, SunW, Zhang Z, ZhengY (2014) The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure. *Oxidative Med Cell Longev* 2014:260429.