



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN
MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“El extracto de ajo envejecido aumenta la
expresión de GLUT-1 en neuronas y
astrocitos en isquemia cerebral”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

JUAN PARRA ABARCA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MÓNICA ESPINOZA ROJO
CODIRECTORA: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DEL 2011



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

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de octubre de dos mil once, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "El extracto de ajo envejecido aumenta la expresión de GLUT-1 en neuronas y astrocitos, en isquemia cerebral", presentada por el alumno Juan Parra Abarca, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis

Dra. Penélope Aguilera Hernández
Codirección de tesis

Dr. Donaciano Flores Robles

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Dr. Alfonso Bernabé Carreño

Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Vo. Bo

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

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

Bajo la dirección de la
Dra. Mónica Espinoza Rojo

La codirección de la
Dra. Penélope Aguilera Hernández

La colaboración y asesoría del
Dr. Pavel Montes de Oca Balderas

La asesoría de
Dra. María Elena Moreno Godínez
Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Dr. Donaciano Flores Robles

Durante el periodo en que el C. **Juan Parra Abarca** cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca del **CONACyT** con número de becario: **231173**. Además, recibió el apoyo del **Banco Santander** al otorgarle la beca de **Movilidad Nacional Santander** durante el periodo de Agosto-Diciembre del 2010.

Agradecimientos

A la ***Dra. Mónica Espinoza Rojo***, la maestra y amiga que me ha inculcado la sabiduría, el raciocinio, la vocación y el amor a la ciencia. Gracias por confiar en mí y ante todo gracias por haber formado parte de mi superación personal.

A la ***Dra. Penélope Aguilera Hernández*** por apoyarme en mi trabajo y haber encaminado mis errores en aciertos. Una gran persona y a la vez una gran mujer a quien admiro mucho como investigadora.

Al Dr. ***Eduardo Castañeda Saucedo*** por su gran vocación en la enseñanza e investigación.

Al ***Dr. Pavel Montes de Oca*** por ser mi mentor en el desarrollo de mi tesis y por tener la paciencia de enseñarme el conocimiento necesario para obtener con claridad los resultados de mi investigación. A usted a quien admiro y que además considero un AMIGO.

Al ***Dr. Moisés Rubio*** por confiar en mí y por brindarme la oportunidad de trabajar con toda la confianza en su laboratorio. Gracias por brindarme su amistad y confianza.

A mis sinodales: la ***Dra. María Elena Moreno Godínez***, al Dr. ***Alfonso Bernabé Carreño*** y al ***Dr. Donaciano Flores Robles*** por su disposición y tiempo en revisar mi tesis.

A mis amigos de la Maestría: ***Faustino, Víctor, Manuel*** y ***Zuby*** por haber compartido bellos momentos conmigo. También a mi amigo ***José Antonio (Pepe-Toño)*** por haberlo conocido. Ya saben que en mí tienen un gran amigo.

A mis entrañables amigos ***Daniel, Temo, Lupita, Esaú y Eduardo*** por ser mis amigos de siempre, y a los cuales quiero mucho.

Dedicatorias

A mi mamá, **Emilia Ramírez Mendoza**. A la cual quiero decirle que la amo. Que todo el sacrificio, las lágrimas y decepciones que le he dado en toda mi vida las he enmendado con esfuerzo y dedicación en todo lo que tú me has enseñado: la ALEGRÍA de seguir soñando. Le doy gracias a Dios por haberme dado el privilegio ser su hijo.

A mi madre, **M^a de Lourdes Abarca Ramírez** por darme la vida y a la figura paterna que siempre he visto en **Alfredo Muñoz Ortega**.

A mi amiga, confidente, y esposa **Michelle Treviño Carreón** por haber creído en mí siempre y nunca dejar que mis problemas existenciales fueran un obstáculo para salir adelante. A ti que me bajabas de las nubes de la presunción y me regresabas a la realidad terrenal de mi sabiduría y no de mis vanidades. Te amo chaparrita.

A mis hermanos que quiero mucho, **Carlos, Oscar** y **Diana**. Simplemente les quiero decir: que nunca dejen de soñar en lo que quieren ser, miren siempre anhelando alcanzar sus metas sin envidias ni rencores. Sean humildes con lo que piensen y hagan ante los demás, ya que esa es la más bella virtud del ser humano.

A mis tíos **Ana Lilia** y **Víctor Manuel** a quienes considero mis hermanos. Gracias por confiar y apoyarme en todo.

A mi abuelita **Consuelo Mendoza Díaz** por su amor, cariño y por inculcarme el amor hacia mi familia y ante todo su fe a Dios.

Con un gran cariño, admiración y respeto a mis tíos, **Raymundo** y **Edith** y a sus hijos, **Ray**, **Janeth** y **Ramón** por nunca negarme su cariño y apoyo cuando lo necesite. Gracias por todo, los quiero mucho.

A mis suegros **Víctor M. Treviño** y **Enriqueta Carreón** por formar parte de mi vida y a mis cuñados a los cuales quiero mucho. Gracias por aceptarme y formar parte de su familia.

A toda mi familia y amigos que forman parte importante en mi vida. A todos ustedes que me brindan su cariño y valioso amor.

INDICE

PÁGINAS

| | | |
|----|------------------------|----|
| 1. | Resumen | 1 |
| 2. | Abstract | 2 |
| 3. | Introducción | 3 |
| 4. | Material y Métodos | 7 |
| 5. | Resultados | 11 |
| 6. | Discusión y Conclusión | 19 |
| 7. | Referencias | 24 |
| 8. | Anexos | 29 |

1. RESUMEN

La disminución del flujo sanguíneo cerebral asociado a un evento isquémico restringe el aporte de oxígeno y glucosa a las neuronas alterando sus niveles energéticos. En modelos de isquemia cerebral se ha demostrado que el metabolismo energético mitocondrial y la sobrevivencia celular depende de la disponibilidad de glucosa. También se ha observado que los antioxidantes previenen el daño celular mediante el aumento de la función mitocondrial a través de mecanismos de regulación que están estrechamente asociados con el metabolismo de la glucosa. En este estudio se evaluó el efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) en el nivel de expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) en un modelo de isquemia cerebral. Ratas macho *Wistar* fueron sometidas a 2 hrs. de oclusión de la arteria cerebral media y 2 hrs. de reperfusión y posteriormente tratadas al inicio de la reperfusión con EAE (360 mg/kg de peso; i.p.). La inmunoreactividad de GLUT-1 en neuronas positivas a la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN) y astrocitos positivos a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el territorio de la arteria cerebral media (corteza y estriado frontoparietales) se cuantificaron en ensayos de inmunofluorescencia. Se encontró que el EAE incrementa la inmunoreactividad a GLUT-1 en un 25% en la corteza y en un 33% en el estriado ($p < 0.05$). A nivel neuronal el EAE incrementó la inmunoreactividad de GLUT-1 en 46% en la corteza y un 15% en el estriado ($p < 0.05$). En astrocitos se observó un 14% de incremento en la corteza y un 57% en estriado ($p < 0.05$). El incremento en la inmunoreactividad de GLUT-1 inducido por el tratamiento con el EAE, tanto en neuronas como en astrocitos después de un daño ocasionado por la isquemia/reperfusión, posiblemente este asociado a la activación de vías de señalización que permiten la redistribución del transportador como parte de un mecanismo para incrementar la captura de glucosa y mejorar el metabolismo energético en el área de penumbra.

Palabras clave: Isquemia cerebral, transportador de glucosa; GLUT-1, extracto de ajo envejecido.

2. ABSTRACT

Focal impairment of cerebral blood flow during stroke restricts the delivery of oxygen and glucose with consequent depletion in neuronal energy levels. In cerebral ischemia models it has been demonstrated that mitochondrial metabolism and cell survival dependent on glucose availability. It has also been observed that antioxidants prevent cellular damage by increasing mitochondrial function through regulating mechanisms closely associated with glucose metabolism. The present study was designed to evaluate the effect of aged garlic extract (AGE) on the level of glucose transporter 1 (GLUT-1) in cerebral ischemia. Male *Wistar* rats were subjected to 2 h of occlusion of middle cerebral artery and 2 h of reperfusion and then treated with AGE (360 mg / kg, ip) at the beginning of reperfusion. GLUT-1 immunoreactivity in neurons (NeuN positive) and astrocytes (GFAP positive) in the territory of the middle cerebral artery (frontoparietal cortex and striatum) were quantified performing an immunofluorescence assay. Immunoreactivity to GLUT-1 was increased by AGE treatment in the cortex (25%) and the striatum (33%) ($p < 0.05$). Neuronal immunoreactivity to GLUT-1 increased by 46% in the cortex and 15% in the striatum ($p < 0.05$) after treatment. In astrocytes it was also observed an increase in the cortex (14%) and in the striatum (57%) ($p < 0.05$). The AGE treatment induces an increase in the level of GLUT-1 expression in both neurons and astrocytes after injury caused by ischemia/reperfusion, possibly as a neuroprotective mechanism associated to energy metabolism improvement.

Key words: ischemia/reperfusion, glucose transporter type 1, aged garlic extract (AGE).

3. INTRODUCCIÓN

Los accidentes cerebro vasculares (ACV) representan un grave problema de salud pública (Tegos et al., 2000). Es la tercera causa de muerte en países industrializados y es la quinta causa de muerte en México; además, es la principal causa de discapacidad y la segunda de demencia en nuestro país (Ruíz et al., 2003). La isquemia cerebral (IC) representa aproximadamente el 80% de los ACV. La IC resulta de la interrupción abrupta del flujo sanguíneo (FS) cerebral por la formación de un émbolo o trombo en una arteria cerebral importante, que en la mayoría de los casos es la arteria cerebral media (ACM) (Cabrera et al., 2008). En la IC es posible observar dos regiones morfológicas de importancia fisiológica: 1) el núcleo isquémico o *área de infarto*, región directamente irrigada por la arteria ocluida, en donde se observa la muerte neuronal, y 2) el *área de penumbra*, región que se encuentra rodeando al área de infarto, y que preserva la viabilidad aunque no la función celular, debido a que la región recibe un FS residual dependiente de la circulación colateral (Lipton, 1999, Lee et al., 1999). El restablecimiento del FS (también denominado *reperusión*) es necesario para detener el daño al tejido; sin embargo, cuando el periodo de isquemia es prolongado, la *reperusión* puede aumentar el daño (Peters et al., 1998, Muranyi y Li, 2006, Tsuruta et al., 2010).

Se ha descrito una serie de eventos moleculares que se activan en la IC, entre ellos destacan la reducción significativa del nivel de ATP intracelular, la sobre estimulación de los receptores de glutamato y la carga neuronal de iones Na^{2+} , Cl^- y Ca^{2+} (Culmsee et al., 2001, Mccullough et al., 2005), el daño mitocondrial, la despolarización peri-infarto, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), la inflamación y la apoptosis (Juurlink y Sweeney, 1997, Dirnagl et al., 1999, Pedraza, 2001).

El estudio de los fenómenos celulares en la zona de penumbra es de suma importancia, ya que las neuronas localizadas en esta zona son susceptibles a ser rescatadas por la actividad de compuestos neuroprotectores. En esta zona se encuentran tanto las neuronas que sobrevivirán como aquellas que morirán por apoptosis. Se ha sugerido que ambos procesos dependen de la capacidad neuronal para compensar la pérdida de ATP; por ello, para incrementar el número de células

que sobreviven es determinante aumentar su capacidad para proveer combustible y cubrir las demandas energéticas (Kann et al., 2003, Brennan et al., 2006).

La glucosa es el principal sustrato energético en el cerebro; que en su paso por la glicolisis, el ciclo de los ácido tricarboxílicos (CAT) y la fosforilación oxidativa, es utilizada para la síntesis de ATP (Chih y Roberts Jr, 2003). En la IC la respiración mitocondrial se altera y las neuronas metabolizan la glucosa residual a ácido láctico en lugar de CO₂ y agua. Las escasas concentraciones de oxígeno y depósitos de glucosa son consumidos rápidamente y se utiliza el ATP de reserva, con lo cual disminuye el nivel energético en el cerebro ocasionando con el tiempo la muerte neuronal. Sin embargo, al no producirse ATP, se acumula AMP que no posee enlace de alta energía, pero que es capaz de activar vías de señalización que promueven el transporte de glucosa (Hill y Hachinski, 1998, Maiese, 1998, Weisova, 2009). La cinasa dependiente de AMP (AMPK) tiene una función importante como *sensor* del estado energético de las células: es fosforilada y activada en respuesta al incremento en las concentraciones intracelulares de AMP (y disminución de ATP). Estos cambios se presentan a causa de la inhibición de la fosforilación oxidativa que se observa durante un proceso isquémico (Corton et al., 1994, Abbud et al., 2000, Wood, 2003, Hardie et al., 2006). La activación de la AMPK está asociada a un incremento en el transporte de glucosa (Abbud et al., 2000).

La glucosa es captada por transportadores pertenecientes a la familia de transportadores de glucosa GLUT, los cuales transportan la glucosa por difusión facilitada en forma dependiente de la concentración (Castrejon et al., 2007). Los GLUT mantienen en equilibrio la concentración del sustrato al interior de la célula y el espacio extracelular impidiendo su acumulación (Simpson et al., 2007). Los GLUT son glicoproteínas de 45 a 55 kDa con 12 dominios transmembranales (Joost y Thorens, 2001), los dominios 3, 5, 7 y 11 forman un poro que permite el paso del monosacárido (Castrejon et al., 2007). Hasta la fecha se conocen 14 miembros de la familia de los GLUT, de los cuales GLUT-1 y GLUT-3 son los más abundantes a nivel cerebral (Simpson et al., 2008).

GLUT-1 es la forma más conservada y se expresa de manera ubicua en los organismos (Zhao y Keating, 2007). Existen dos isoformas de diferente peso

molecular (45 y 55 kDa), con un grado diferente de glicosilación, pero sin diferencias en su estructura o parámetros cinéticos ($K_m = 8\text{mM}$ $K_{cat} = 1,166/\text{seg}$). La forma de 45 kDa es muy abundante en las células gliales, mientras que la forma de 55 kDa se expresa exclusivamente en las células del endotelio vascular, las cuales integran la BHE (Simpson et al., 2007).

GLUT1, es considerada una proteína de estrés, cuya mayor expresión ha sido documentada en muchos tipos celulares en respuesta a una variedad de estímulos como factores de crecimiento, activación oncogénica y privación de glucosa (Klip et al., 1994, Massa y Swanson, 1996). De hecho, en neuronas la expresión de la isoforma de 45 kDa es limitada bajo condiciones normales, pero su expresión se incrementa en respuesta a factores de estrés ambiental o cuando las neuronas son mantenidas en cultivo (Wheeler et al., 1982, Gerhart et al., 1989, Lee y Bondy, 1993). La actividad de GLUT-1 en transportar la glucosa en neuronas y glía puede promover la sobrevivencia después de un daño en el SNC (Vanucci et al., 1997).

La IC causa un incremento en la glicolisis, la cual no puede mantenerse sin un incremento paralelo en la tasa de transporte de glucosa de la sangre hacia células cerebrales a través de la BHE. Se ha observado que la IC provoca un incremento en el aporte de glucosa cerebral a 1, 4 y 12 h de reperfusión (Vanucci et al., 1994). Este cambio puede estar asociado al incremento en la entrada de glucosa mediado por diferentes mecanismos. Por un lado, se puede atribuir al incremento en el transporte de glucosa mediado principalmente por el incremento en la expresión de los GLUT (Espinoza-Rojo et al., 2010). Las evidencias muestran que están implicados mecanismos tanto transcripcionales (dependientes de la activación del factor inducible a hipoxia 1) (Jones and Bergeron, 2001) como post-transcripcionales (estabilización del mRNA) (Stein et al., 1995, Levy et al., 1996, Behrooz y Ismail-Beigi, 1997).

El ajo (*Allium sativum*), en sus diferentes presentaciones como son el EAE, el extracto acuoso y el aceite de ajo reducen han demostrado reducir significativamente el daño celular ocasionado por la IC (Weinberg et al., 1993, Gupta et al., 2003, Saleem et al., 2006, Aguilera et al., 2010). Entre estos destaca el EAE, el cual se

obtiene macerando las láminas del bulbo de ajo en solución hidroalcohólica (15 al 20%) durante 20 meses o más a temperatura ambiente; posteriormente se filtra y concentra a baja temperatura y presión reducida (Luengo, 2007). El proceso de envejecimiento, transforma los compuestos irritantes del ajo en compuestos más estables y menos tóxicos (Weinberg et al., 1993, Amagase et al., 2001).

En el modelo experimental de IC inducido por oclusión de la arteria cerebral media (OACM) se ha observado que el EAE retarda significativamente la aparición del área de infarto al administrarse al inicio de la reperusión. Su efecto protector se ha asociado a la capacidad para prevenir el incremento de nitrotirosina y la disminución de la actividad enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa total, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa extracelular) inducida por la IC (Aguilera et al., 2010). Sin embargo, aunque se ha descrito que los compuestos antioxidantes del EAE están involucrados, hasta el momento se desconoce su mecanismo de acción.

En la actualidad se ha demostrado que algunos componentes antioxidantes pueden alterar la respuesta celular al mejorar el metabolismo energético. Por ejemplo el *resveratrol*, un potente antioxidante polifenólico, mejora el metabolismo energético al disminuir los niveles de ERO durante la IC (Simao et al., 2011, Li et al., 2011); la *L-acetil-Carnitina* incrementa el transporte de glucosa en neuronas y astrocitos después del daño ocasionado por el consumo de etanol (Abdul Muneer et al., 2011); y recientemente se demostró que la administración del EAE incrementa el nivel de ATP en ratas sometidas a la OACM (Gómez-Martínez, 2009). Por esta razón, en el presente estudio se evaluó el efecto del EAE en la inmunoreactividad de GLUT-1 en un modelo de isquemia cerebral por OACM, con la finalidad de iniciar la evaluación del mecanismo de acción del EAE teniendo como hipótesis el mejoramiento energético a través del incremento en la captura de glucosa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MODELO ANIMAL

Se emplearon ratas machos adultas de la cepa Winstar de 250-320 g de peso (aproximadamente 16 semanas de edad). Durante el estudio, las ratas fueron mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 horas de luz/oscuridad). Todos los experimentos se cumplieron de acuerdo a la “NIH Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio”.

4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar los cambios en la inmunoreactividad de GLUT-1 durante la isquemia/reperfusión (I/R), y el efecto que ejerce el EAE después del daño ocasionado por la I/R cerebral se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en neuronas y astrocitos. Para este fin, las ratas fueron divididas de manera aleatoria en los siguientes grupos experimentales: 1) ratas control (CT); 2) ratas control tratadas con extracto de ajo envejecido (CT+EAE); 3) ratas sometidas a 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión (2I/2R); y 4) ratas sometidas 2I/2R más el tratamiento con EAE (2I/2R+EAE).

4.3. CÁLCULO DEL NÚMERO DE MUESTRA

Para calcular el número de muestra se utilizó la fórmula de “Tamaño de muestra para pruebas de hipótesis”. Para ello fue necesario realizar un ensayo piloto (n=4 ratas), mediante el cual se calculó la proporción del área con infarto y área sin infarto cerebral a 2I/2R, se utilizó un tamaño de muestra igual 6 para cada grupo experimental.

4.3. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral transitoria se indujo mediante la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) empleando el método descrito por *Longa, et al.*, 1989. Los animales se anestesiaron con isoflurano al 2%. Inicialmente la bifurcación de la carótida cervical fue expuesta a través de una incisión en el cuello del animal. Posteriormente, un monofilamento de nylon de 3-0 se introdujo a través de la arteria

carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm). En este punto el filamento ocluyó el FSC de la arteria cerebral media (ACM). Después de 2 horas de obstrucción, el filamento se retiró cuidadosamente; los animales en esta etapa fueron anestesiados y suturados nuevamente con la finalidad de permitir la restauración del FSC (reperfusion) (Longa et al., 1989). Las ratas se sacrificaron después de 2 horas de reperfusion.

4.4. TRATAMIENTOS

Se aplicó una dosis de 360 mg/Kg (1.2 mL/Kg) de EAE (Kyolic WAKUNAGA® América Co., Ltd Mission Viejo, California, USA) vía intraperitoneal al término de las 2 horas de la OACM (inicio de la reperfusion).

4.5. PRUEBAS CONDUCTUALES PARA DETERMINAR EL DÉFICIT NEUROLÓGICO DESPUÉS DE LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

El estado neurológico de cada rata se determinó empleando 3 pruebas conductuales: 1) *Flexión de la pata contralateral a la lesión*, las ratas se suspendieron por la base de la cola y la postura de los miembros delanteros fue observada. Las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, mientras que los animales con daño doblan la pata contralateral como consecuencia de la lesión; 2) *Motilidad espontánea*, los animales se colocaron en una superficie plana (0.5 metros de diámetro). Los animales normales inician el movimiento antes de 10 segundos; 3) *Conducta de giro*, las ratas fueron sostenidas por la base de la cola, permitiéndoles moverse libremente al apoyar las patas delanteras; se observó la dirección del movimiento durante 30 segundos. Los animales dañados realizan al menos 5 vueltas en sentido contralateral a la lesión. A cada prueba conductual se le asignó un valor de 0 si el animal presentó una conducta normal y de 1 si presentó daño. La suma de los valores obtenidos en las 3 pruebas se utilizó como medida para determinar la presencia de un déficit neurológico. La evaluación se efectuó antes de la reperfusion. Los animales que en la evaluación obtuvieron menos de 2, fueron excluidos del estudio, ya que este valor en el déficit fue asociado a una cirugía inadecuada. Las ratas con déficit neurológico mayor a 2 invariablemente presentaron

un daño por isquemia y reperfusión (Longa et al., 1989, Menzies et al., 1992, Modo et al., 2000).

4.7. PERFUSIÓN INTRA-CARDIACA CON PARAFORMALDEHÍDO (PAF) AL 4% E INCLUSIÓN EN FRÍO DE LOS TEJIDOS CEREBRALES

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (63 mg/kg, i.p., *Sedal phorte*[®]). Enseguida se realizó una perfusión intracardiaca con 100 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) y 100 mL de paraformaldehído (PAF) al 4% (ver anexo). Posteriormente los cerebros fueron post-fijados con PAF al 2% toda la noche a 4°C. Los cerebros fijados con PAF fueron crioprotegidos y transferidos en diferentes soluciones de sacarosa (10, 20 y 30% en PBS) hasta alcanzar el equilibrio, en un periodo aproximado de 2 días, a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un corte coronal para extraer la región en la que se incluye la corteza frontoparietal y el estriado (Paxinos y Watson, 2004) (ver anexo). Inmediatamente los tejidos fueron incluidos en un medio de inclusión O.C.T. (Optimal Cutting Temperature, *Tissue Tek*[®]). Después se obtuvieron cortes seriados de los tejidos cerebrales (10 µm de ancho) empleando un criostato (*Microm HM 520*). Los cortes coronales se colocaron en portaobjetos cubiertos con xilano y gelatina al 5% (ver anexo).

4.8. INMUNOFLUORESCENCIA

Las cortes coronales del cerebro fijados e incluidos, fueron bloqueados y permeabilizados con 3% de suero normal de burro (SNB) y 0.5% de Tween-20 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios **anti-GLUT-1 policlonal de conejo** (1:50; *Santa Cruz Biotechnology*; sc-7903), **anti-NeuN monoclonal de ratón** (1:200; *Chemicon International*; MAB-357) y **anti-GFAP monoclonal de ratón** (1:250; *BioGenex*; GA-5) diluidos en albúmina de suero bovino (BSA) al 10% con 0.3% de Triton-X100 en PBS. Se realizaron dobles marcajes incubando los anticuerpos anti-GLUT-1 con anti NeuN (antígeno nuclear neuronal) y anti-GLUT-1 con anti proteína ácida fibrilar glial (GFAP) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Posteriormente los

cortes se lavaron por inmersión en 50 mL de PBS 3 veces cada uno por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos: **anti-IgG de conejo-DyLight-594** (rojo) (1:300; *Jackson ImmunoResearch*) y **anti-IgG de ratón-DyLight-488** (verde) (1:300; *Jackson ImmunoResearch*) en cámara húmeda en completa oscuridad durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos se lavaron 3 veces por inmersión con 50 mL de PBS durante 5 minutos cada uno. Para teñir los núcleos, los tejidos fueron incubados con **DAPI** (10 mg/ml; 1:1000; *Invitrogen*) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron los mismos procedimientos de lavado para remover el exceso de DAPI. Posteriormente, se agregó la solución de montaje con glicerol (10 % de glicerol en PBS). Los cortes se observaron en un microscopio de epifluorescencia Leica IM1000 versión 1.20 a 40x. Se fotografiaron 15 campos en los 3 canales del filtro de emisión del microscopio (verde, azul y rojo) de manera vertical al cerebro, tomando en consideración tanto la corteza (CZ) y estriado (ES) en ambos hemisferios (contra-lateral e ipsilateral a la lesión) (ver anexo). Se empleó una cámara Leica DFC-300 FX y las imágenes se observaron en un software LEICA IM1000.

La inmunoreactividad de GLUT-1, NeuN y GFAP se cuantificó considerando la intensidad de la fluorescencia y normalizando con el número de núcleos. Se utilizó el software LEICA IM1000 con ayuda de Photoshop CS[®], y el programa **ImageJ** “Image Processing and Analysis in Java” (imagej.nih.gov).

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se expresaran como la media \pm D.E. y se aplicó un análisis de varianza factorial completo (ANOVA). Posteriormente, se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usando el programa Prisma 5.0 Graph Pad. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. LA ISQUEMIA CEREBRAL DISMINUYE LA INMUNOREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA GLUT-1 EN NEURONAS Y ASTROCITOS

Con la finalidad de determinar el efecto de la isquemia en la expresión de la proteína GLUT-1 en el territorio irrigado por la ACM se realizó una cuantificación por inmunofluorescencia. Se observó que 2I/2R disminuye la inmunoreactividad de la proteína GLUT-1 en un 67% ($p<0.05$) en la CZ y en un 38% ($p<0.05$) en el ES del hemisferio IP a la lesión. En el hemisferio CL no se observó ningún cambio en la inmunoreactividad de GLUT-1 (**Figura 1**).

Para determinar si la isquemia disminuye la inmunoreactividad del transportador de glucosa específicamente en neuronas o astrocitos, se realizaron ensayos de doble marcaje empleando anticuerpos que reconocen proteínas que se expresan en estos tipos celulares. El marcaje específico de neuronas se realizó con anticuerpos que reconocen la proteína NeuN. Se observó que después del daño ocasionado por 2I/2R, la inmunoreactividad de GLUT-1 disminuyó un 71% en neuronas de la CZ ($p<0.05$) y un 65% en neuronas del ES ($p<0.05$) del hemisferio IP a la lesión (**Figura 2**). No se observaron cambios en el hemisferio CL.

Para determinar el nivel de GLUT-1 en astrocitos se cuantificó la inmunoreactividad de esta proteína utilizando la GFAP como marcador. A 2I/2R se observó que la inmunoreactividad de GLUT-1 disminuyó un 79% en la CZ ($p<0.05$) y un 80% en el ES ($p<0.05$) del hemisferio IP a la lesión. En el hemisferio CL, se observó que la CZ presentó una disminución del 31% en la inmunoreactividad sin presentarse ningún cambio en el ES ($p<0.05$) (**Figura 3**).

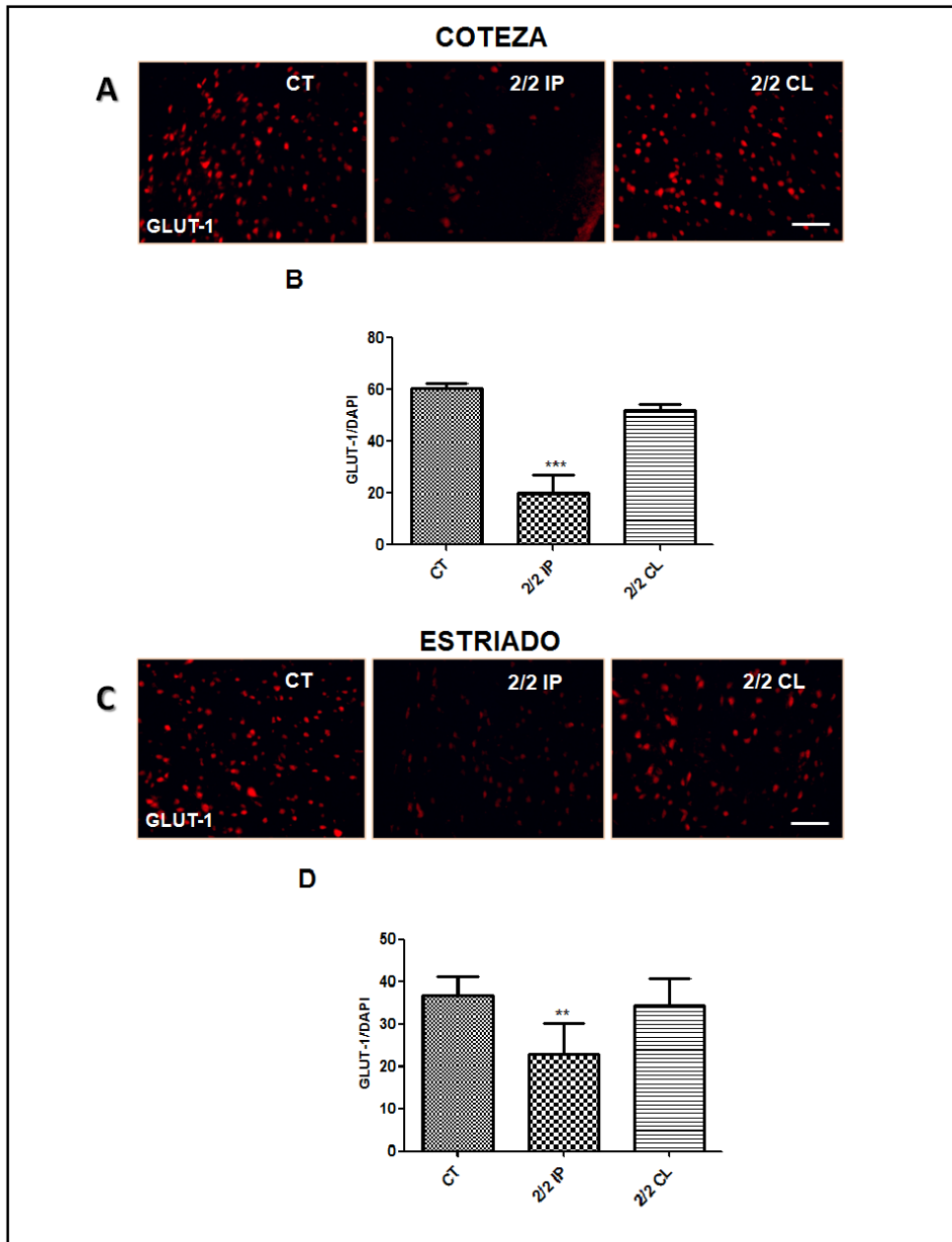


Figura 1. Nivel de GLUT-1. Animales de experimentación fueron sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de perfusión (2/2R) por oclusión de la arteria cerebral media. Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de GLUT-1 en la corteza y estriado cerebral de los hemisferios ipsilateral (IP) y contralateral (CL) (Paneles A y C). La marca fluorescente de GLUT-1 en rojo. En el panel B y D se muestra la representación gráfica de las imágenes (n = 6). Anova, Tukey ***p<0.001, **p<0.05. Escala de la barra= 10 μ m.

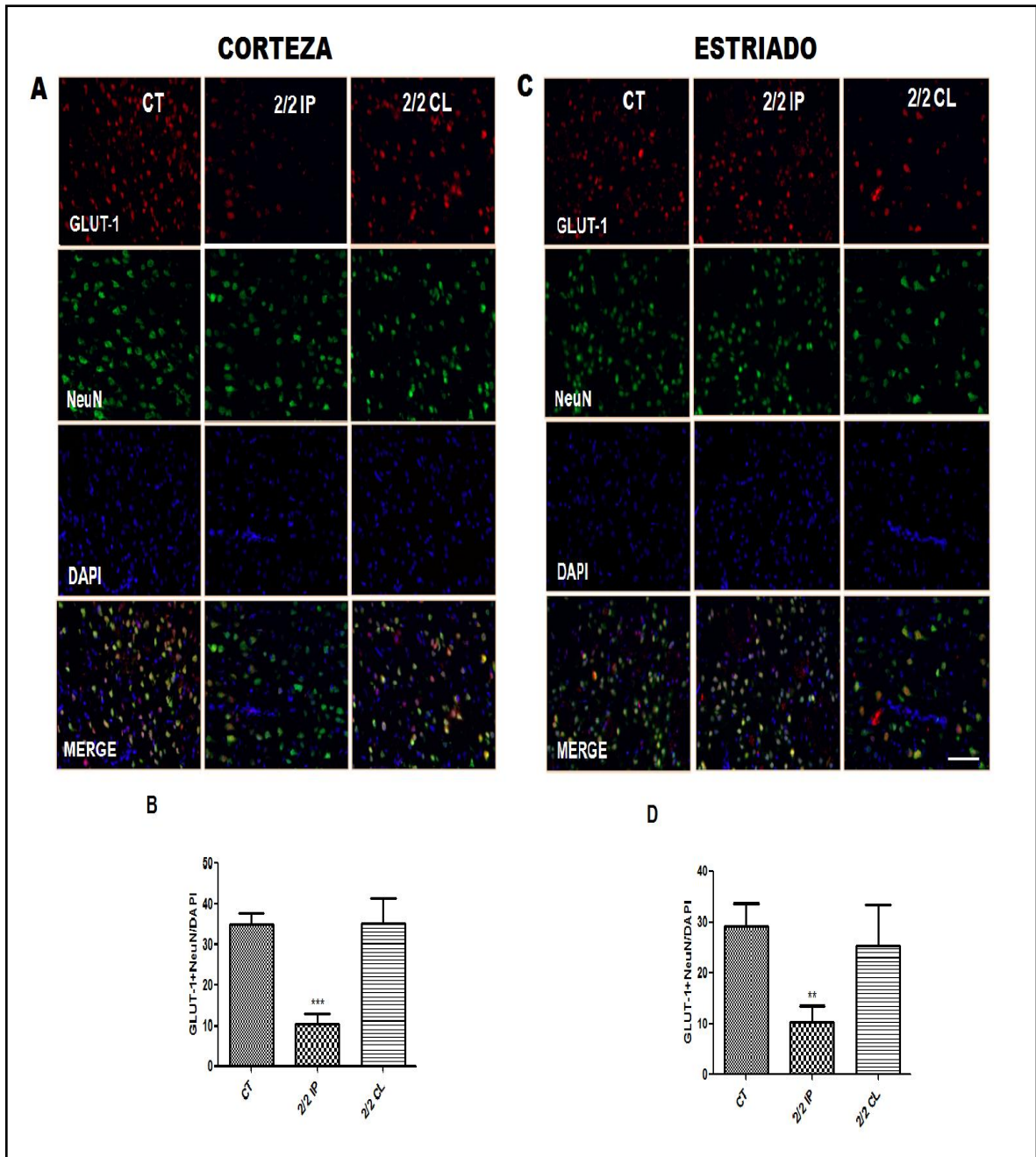


Figura 2. Nivel de GLUT-1 en neuronas. Animales de experimentación fueron sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperusión (2I/2R) por oclusión de la arteria cerebral media (OACM). Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de inmunoreactividad de GLUT-1 en neuronas (NeuN) en la corteza y estriado cerebral de los hemisferios ipsilateral (IP) y contralateral (CL) (Paneles A y C). Las marcas fluorescentes de GLUT-1 (rojo) y NeuN (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Los Paneles B y D son la representación gráfica de las imágenes (n = 6). Anova, Tukey ***p<0.001, **p<0.05. Escala de la barra= 10 μm.

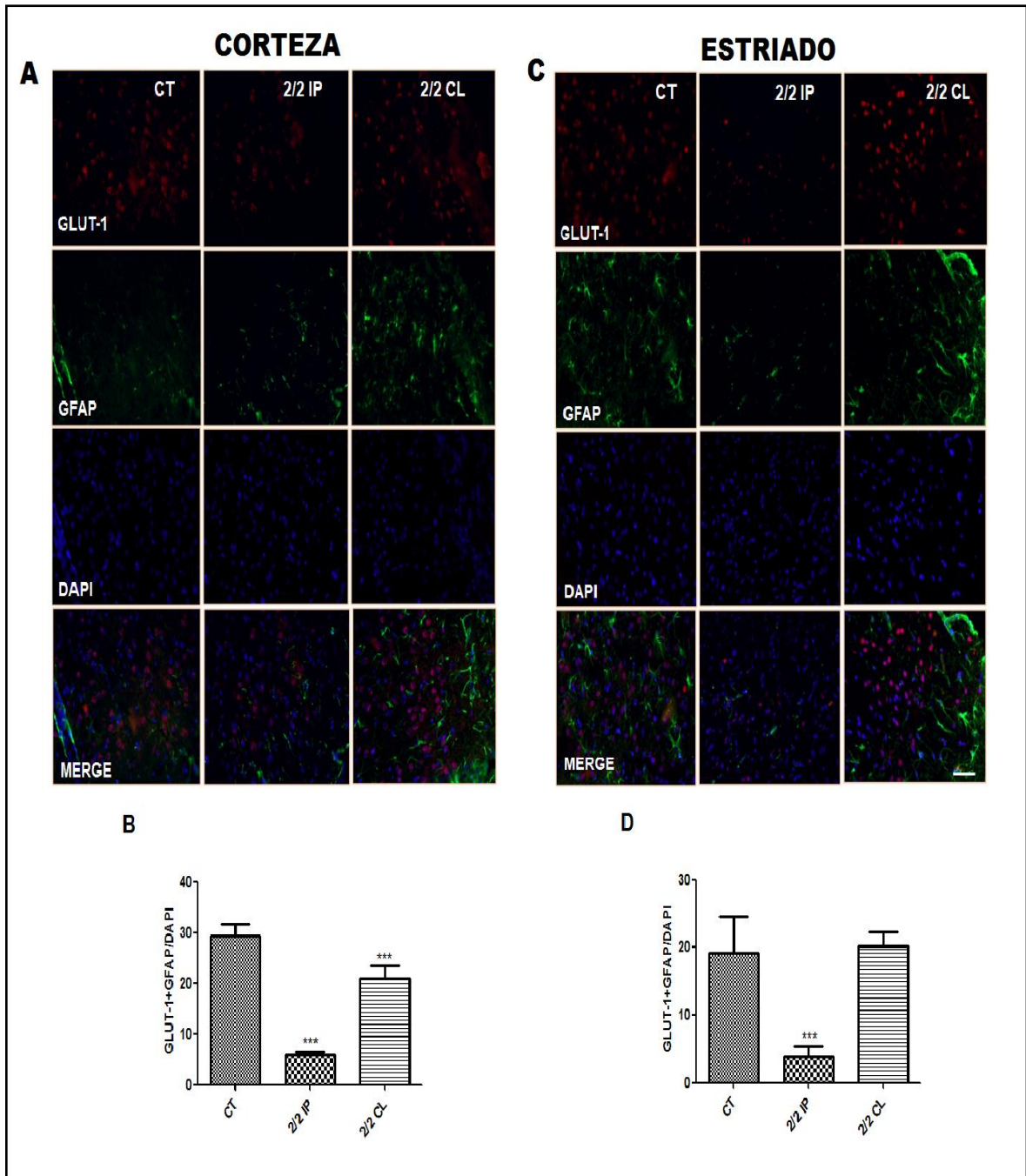


Figura 3. Nivel de GLUT-1 en astrocitos. Animales de experimentación fueron sometidos a 2 h de isquemia y 2 h de reperusión (2I/2R) por oclusión de la arteria cerebral media (OACM). Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de inmunoreactividad de GLUT-1 en astrocitos (GFAP) en la corteza y estriado cerebral de los hemisferios ipsilateral (IP) y contralateral (CL) (Paneles A y C). Las marcas fluorescentes de GLUT-1 (rojo) y GFAP (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Los Paneles B y D son la representación gráfica de las imágenes (n = 6). Anova, Tukey ***p<0.001, **p<0.05. Escala de la barra= 10 μ m.

5.2. EFECTO DEL EAE EN EL NIVEL DE LA PROTEÍNA GLUT-1 EN NEURONAS Y ASTROCITOS

Para determinar si el tratamiento con el EAE tiene efecto sobre la inmunoreactividad de GLUT1, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en CZ y ES de animales sometidos a 2I/2R. Se encontró que el EAE aumenta la inmunoreactividad de GLUT-1 en un 25% en la CZ ($p<0.05$) y en un 33% en el ES ($p<0.05$) del hemisferio IP a la lesión (**Figura 4**).

Se analizó el efecto que tiene el EAE en la inmunoreactividad de GLUT-1 en neuronas empleando ensayos de doble marcaje. Se observó que el EAE incrementa la inmunoreactividad de GLUT-1 en un 46% en la CZ ($p<0.05$) y un 15% en el ES del hemisferio IP a la lesión con respecto a las zona dañada de animales sometidas a isquemia sin tratamiento (**Figura 5**).

Para observar el efecto del EAE en el nivel de GLUT-1 en astrocitos localizados en la CZ y ES después de la 2I/2R, se utilizó un doble marcaje con anticuerpos anti GFAP. Se observó que el tratamiento con el EAE incrementa la inmunoreactividad de GLUT-1 en un 14% en la CZ ($p<0.05$) y en un 57% en el ES ($p<0.05$) del hemisferio IP a la lesión con respecto a la inmunoreactividad observada en ratas sometidas a 2I/2R sin tratamiento (**Figura 6**).

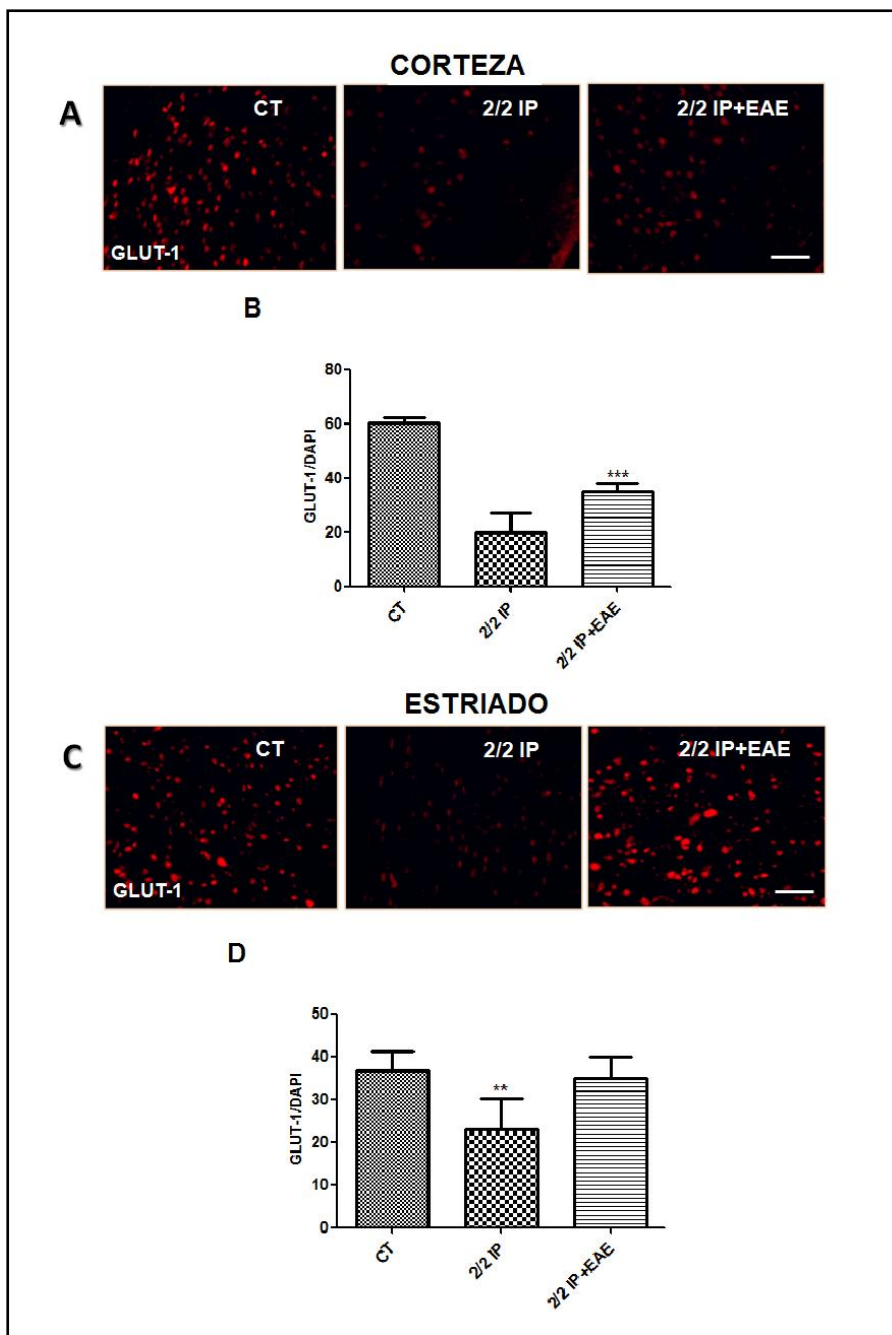


Figura 4. Efecto del EAE en el nivel de GLUT-1. Animales de experimentación fueron tratados con 360 mg/kg (1.2 mL/kg) de EAE al inicio de la reperusión con 2 h previas de oclusión de la arteria cerebral media (OACM). Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de GLUT-1 en la corteza y estriado cerebral de los hemisferios ipsilateral (IP) y contralateral (CL) (Paneles A y C). Las marca fluorescente de GLUT-1 en rojo. Paneles B y D representación gráfica de las imágenes (n = 6). Anova, Tukey ***p<0.001, **p<0.05. Escala de la barra= 10 µm.

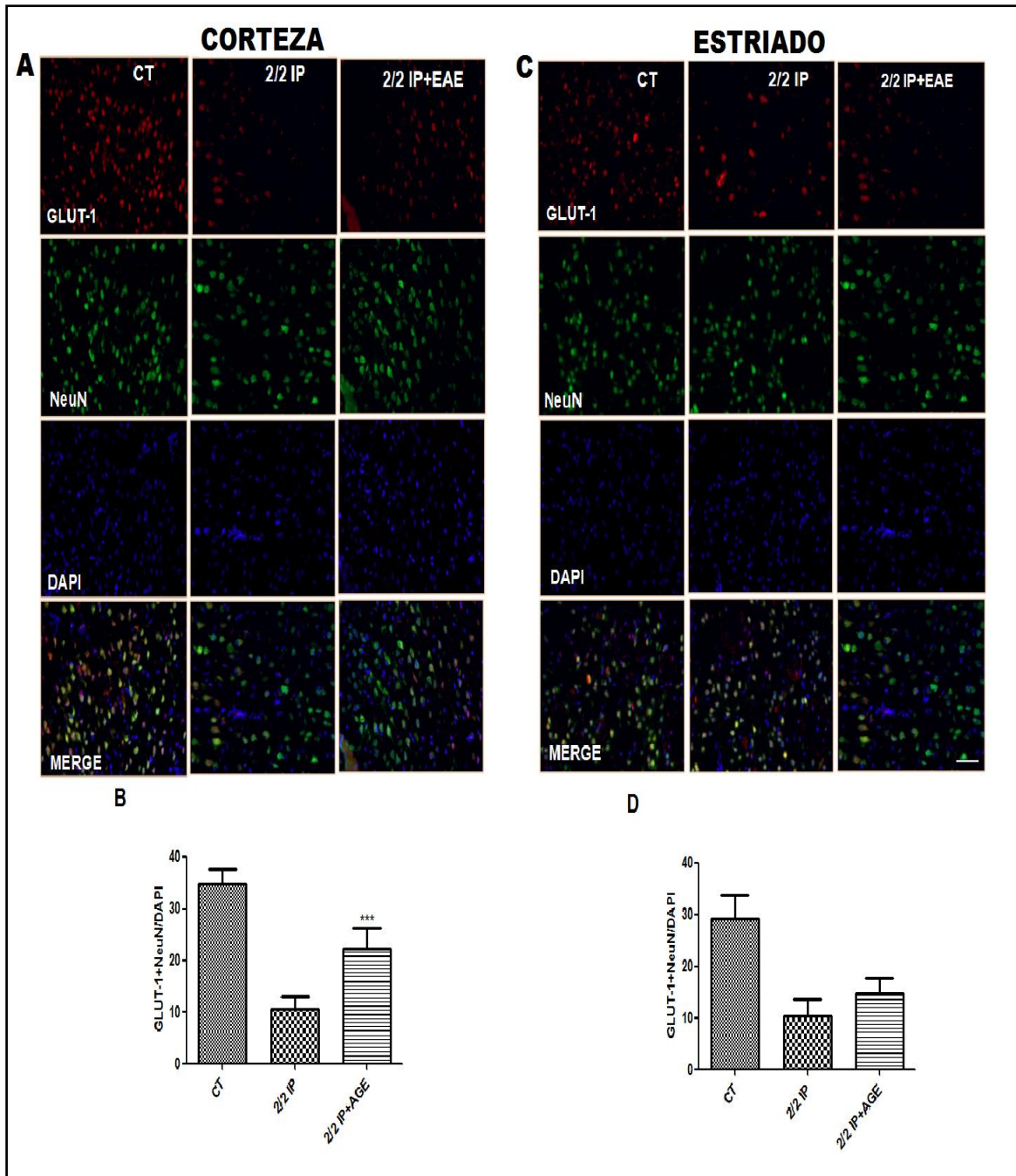


Figura 5. Efecto del EAE en el nivel de GLUT-1 en neuronas. Animales de experimentación fueron tratados con 360 mg/kg (1.2 mL/kg) de EAE al inicio de la reperfusion con 2 h previas de oclusión de la arteria cerebral media (OACM). Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de GLUT-1 en la corteza y estriado cerebral de los hemisferios ipsilateral (IP) y contralateral (CL) (Paneles A y C). Las marcas fluorescente de GLUT-1 en rojo, NeuN (verde) y el marcador nuclear (DAPI) en azul. Paneles B y D representación gráfica de las imágenes (n = 6). Anova, Tukey $***p < 0.001$, $**p < 0.05$. Escala de la barra= 10 μ m.

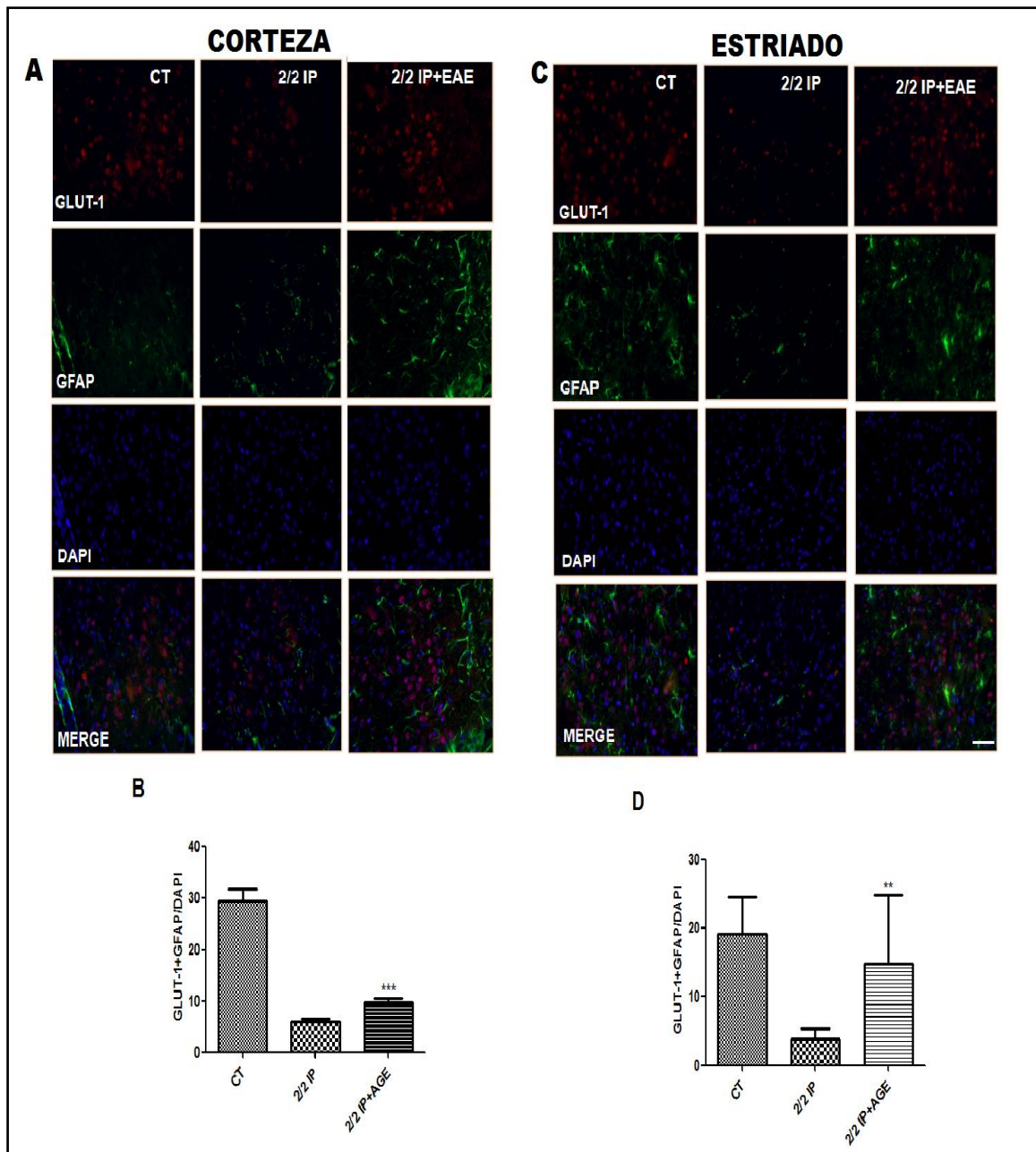


Figura 6. Efecto del EAE en el nivel de GLUT-1 en astrocitos. Animales de experimentación fueron tratados con 360 mg/kg (1.2 mL/kg) de EAE al inicio de la reperfusion con 2 h previas de oclusion de la arteria cerebral media (OACM). Por inmunofluorescencia se determinó el nivel de GLUT-1 en la corteza y estriado cerebral de los hemisferios ipsilateral (IP) y contralateral (CL) (Paneles A y C). Las marcas fluorescente de GLUT-1 en rojo, GFAP (verde) y el marcador nuclear (DAPI) en azul. Paneles B y D representación gráfica de las imágenes (n = 6). Anova, Tukey ***p<0.001, **p<0.05. Escala de la barra= 10 µm.

6. DISCUSIÓN

LA ISQUEMIA CEREBRAL DISMINUYE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GLUT-1 EN NEURONAS Y ASTROCITOS

Más que cualquier otro órgano, el cerebro es totalmente dependiente de un suministro continuo de glucosa en circulación para cubrir su alto metabolismo energético (Duelli y Kuschinsky, 2001). Alrededor del 85% del gasto energético a nivel cerebral ocurre en neuronas (Attwell y Laughlin, 2001), tipo celular que expresa principalmente al transportador de glucosa de alta afinidad GLUT-3. Sin embargo, se ha reportado que las neuronas del hipocampo incrementan la expresión de GLUT-1 en respuesta al daño ocasionado por la IC, por lo que puede representar una respuesta a estrés (Dwyer et al., 2002). La expresión de este transportador también se encuentra incrementada en respuesta a una variedad de estímulos como son: factores de crecimiento, activación oncogénica, hipoglicemia e hiperglicemia (Murakami et al., 1992, Klip et al., 1994, Estrada et al., 1994, Massa y Swanson, 1996). Este aumento en la expresión de GLUT-1 puede representar una estrategia defensiva destinada a la reposición de las reservas energéticas del cerebro y consecuentemente a la estabilización del potencial de membrana y de otras funciones neuronales primordiales (Lee y Bondy, 1993). Por esta razón, en el presente estudio decidimos evaluar el efecto de la IC y el tratamiento con el EAE en la inmunoreactividad de GLUT-1 en neuronas y astrocitos.

Observamos que 2I/2R disminuyen el nivel de la proteína GLUT-1 en la CZ y el ES del hemisferio IP a la lesión. De manera similar, se ha observado que en células de retina la vida media de la proteína GLUT-1 (7 h) disminuye en un 50% en la membrana plasmática cuando existe una sobre exposición (4 h) a estrés oxidativo. Esta disminución está asociada a un aumento en la internalización de GLUT-1 seguida de su degradación vía proteosoma (Fernandes et al., 2011). Se sabe que las ERO (las cuales se producen en gran cantidad durante un evento isquémico) inician una cascada de oxidación especialmente de fosfolípidos, afectando la membrana celular y numerosas estructuras intracelulares, lo que puede estar alterando la

estabilidad de proteínas de membrana (*e. g.* el transportador de glucosa) (Martínez-Orgado et al., 1999, du Plessis and Johnston, 1997).

En astrocitos observamos que 2I/2R inducen una reducción significativa en el nivel de la proteína GLUT-1 mayor que el observado en neuronas. Este evento podría explicarse considerando que GLUT-1 es el principal transportador en astrocitos. A nivel neuronal observamos que el nivel de la proteína GLUT-1 disminuye significativamente después de 2I/2R. Las neuronas son las células cerebrales más susceptibles al déficit energético, ya que no cuentan con fuentes secundarias de energía como los astrocitos (Wiesinger et al., 1990, Bergbauer et al., 1996). La excitotoxicidad por glutamato puede ser un factor asociado a la disminución de la expresión de GLUT-1. La prolongada sobre activación de los receptores a glutamato resulta en un aumento en la entrada de Ca^{2+} alterando la bioenergética mitocondrial, la homeostasis iónica y la integridad celular (Choi, 1987, Tymianski et al., 1993, Budd y Nicholls, 1996, Atlante et al., 1996). Estos eventos a su vez incrementan la formación de ERO (Atlante et al., 1996) y dañan las estructuras celulares incluyendo la membrana plasmática.

Por otra parte, se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por la disminución en el nivel de glucosa, puede alterar vías de señalización que conducen al incremento en la expresión de los GLUTs (Lee et al., 1998, Blackburn et al., 1999). Se ha demostrado la activación de la vía de las MAPK y consecuentemente de factores de transcripción como AP-1 (Spitz et al., 2000) y HIF-1 α (Alfranca et al., 2002). HIF-1 α es fundamental en la respuesta adaptativa en situaciones de isquemia/hipoxia (Semenza, 1998, Sharp et al., 2004), incrementando la expresión de genes entre los que se encuentra GLUT-1 (Baranova et al., 2007, Mobasher et al., 2005).

En el trabajo realizado por *Gómez-Martínez (2009)* demostró que la IC induce un incremento significativo en el nivel de expresión del mRNA de GLUT-1 después de 2 h de isquemia y 12 h de reperfusión, posiblemente como un mecanismo de respuesta a la IC asociado con la estabilización y activación de HIF-1 α . Este trabajo está apoyado por otros en donde se demuestra que la proteína de GLUT-1 se expresa después de tiempos prolongados de reperfusión, a los cuales

HIF-1 α se estabiliza. Estos datos apoyan que 2I/2R no son suficientes para inducir un aumento en el nivel de expresión de la proteína GLUT-1.

Nuestros resultados mostraron una disminución de la marca neuronal con NeuN, lo que indica una disminución en la viabilidad neuronal en la región IP. Previamente se ha demostrado que la inmunoreactividad de NeuN disminuye principalmente en corteza fronto-parietal (Fudong et al., 2009); sin embargo, en el presente trabajo el análisis abarco solo parte de la corteza fronto-parietal y se incluyó parte del estriado; esto podría explicar que la señal no disminuya considerablemente como se ha observado en otros trabajos.

El metabolismo de la glucosa es regulado por diversas vías de señalización, entre estas destaca la vía PI3K/Akt, que regula la captura de glucosa a través de la regulación de la transcripción (Barthel et al., 1999) y el tráfico de GLUT-1 (Kan et al., 1994, Edinger y Thompson, 2002, Rathmell et al., 2003, Wieman, 2007). Además, esta vía se encuentra afectada bajo condiciones de I/R cerebral (Edinger y Thompson, 2002). Se ha observado que el estrés oxidativo puede inactivar a Akt, incrementando así el grado de internalización de GLUT-1 (Fernandes et al., 2011). La disminución que observamos de la proteína GLUT-1 en neuronas y astrocitos después de 2I/2R puede estar asociada a la inhibición de la vía PI3K/Akt, crítica en el transporte óptimo de glucosa (Chang et al., 2009).

EL EAE INCREMENTA EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GLUT-1 EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Se ha demostrado que el EAE tiene propiedades terapéuticas, asociadas principalmente al efecto antioxidante de varios de sus componentes, que tiene como resultado la disminución de las ERO producidas después de un evento de I/R (Borek, 2001, Aguilera et al., 2010); sin embargo, no se ha profundizado en los mecanismos moleculares involucrados.

En este trabajo se demostró que el EAE incrementa la inmunoreactividad de la proteína GLUT-1 en la CZ y ES del hemisferio IP a la lesión comparado con la de animales sometidos a 2I/2R. El EAE puede estar regulando la actividad de una gran variedad de moléculas y vías de señalización como la vía de Akt. Se ha comprobado

que la degradación de GLUT-1 a través del proteosoma se activa cuando Akt se encuentra inhibida como consecuencia del estrés oxidativo (Fernandes et al., 2011). Las propiedades antioxidantes de los componentes del EAE pueden atrapar ERO y consecuentemente prevenir la inhibición de Akt y la degradación de GLUT-1 o promover su tráfico hacia la membrana. De hecho, el ensayo de inmunofluorescencia muestra un incremento en la inmunoreactividad de GLUT-1 que podría estar asociado a un incremento en el tráfico vesicular.

En nuestros resultados también mostraron que el EAE evita la disminución de la marca de NeuN en la CZ apoyando el efecto protector del EAE previamente reportado por Aguilera y colaboradores (2010). La marca de GLUT-1 en neuronas fue mayor que en astrocitos, resultado importante, ya que estas células no cuentan con reservas de glucosa (Wiesinger et al., 1990, Bergbauer et al., 1996) y necesitan mayor captura de glucosa para mantener su elevado metabolismo energético.

También se observó un incremento en la expresión de GLUT-1 en astrocitos; sin embargo, en estos ensayos se observó que la mayoría de la marca de GLUT-1 no colocaliza con las marcas de GFAP. Estos resultados nos indicaron que la localización de GLUT-1 está asociada a otras estirpes celulares como células endoteliales o neuronas.

Los astrocitos son células más resistentes al daño producido por la IC ya que cuentan con reservas de glucógeno (Bergbauer et al., 1996) y son capaces de sobrevivir a periodos extensos de hipoxia solo con la producción anaeróbica de ATP (Swanson, 1992). Es posible que los astrocitos al contar con reservas de glucosa y sustratos secundarios para la síntesis anaeróbica de ATP no necesiten incrementar la captura de glucosa. Por lo tanto, es posible que el EAE no tenga un efecto tan pronunciado en estas células después de 2I/2R, quizás porque las células aún cuenten con reservas disponibles de glucosa para tolerar el daño ocasionado por la IC.

En la IC no existe una adecuada producción de ATP, lo que provoca un incremento en los niveles de AMP. Esta molécula activa vías de señalización que promueven el transporte de glucosa (Hill y Hachinski, 1998, Maiese, 1998, Weisova, 2009) como a la AMPK. La activación de AMPK puede mejorar la captura de glucosa

al inducir el tráfico vesicular e incrementar la concentración de GLUT-1 a nivel de membrana plasmática. También existen datos que demuestran que la AMPK incrementa la expresión de GLUT-1 en células de Sertoli (Galardo et al., 2007). Nuestros resultados demostraron que el EAE incrementa la expresión de GLUT-1, posiblemente asociado a una reorganización vesicular, pero será necesario realizar experimentos adicionales para demostrarlo. Asimismo, este incremento podría estar asociado al efecto protector asociado al EAE.

En este trabajo se concluyó que la isquemia disminuye el nivel de la proteína GLUT-1 en neuronas y astrocitos localizadas en la CZ y ES en el hemisferio ipsilateral a la lesión. Además se demostró que el EAE permitió la recuperación del nivel de la proteína GLUT-1 en ambas zonas (CZ y ES) del hemisferio lesionado.

8. Referencias

- ABBUD, W., HABINOWSKI, S., ZHANG, J. Z., KENDREW, J., ELKAIRI, F. S., KEMP, B. E., WITTERS, L. A. & ISMAIL-BEIGI, F. 2000. Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport. *Arch Biochem Biophys*, 380, 347-52.
- ABDUL MUNEER, P. M., ALIKUNJU, S., SZLACHETKA, A. M., MERCER, A. J. & HAORAH, J. 2011. Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 3, 48-56.
- AGUILERA, P., CHÁNEZ-CÁRDENAS, M. E., ORTIZ-PLATA, A., LEÓN-APARICIO, D., BARRERA, D., ESPINOZA, M., VILLEDA-HERNÁNDEZ, J., SANCHEZ, G. & MALDONADO, P. 2010. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine*, 17, 241-247.
- ALFRANCA, A., GUTIERREZ, M. D., VARA, A., ARAGONES, J., VIDAL, F. & LANDAZURI, M. O. 2002. c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol Cell Biol*, 22, 12-22.
- AMAGASE, H., PETESCH, B. L., MATSUURA, H., KASUGA, S. & ITAKURA, Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*, 131, 955S-62S.
- ATLANTE, A., GAGLIARDI, S., MINERVINI, G. M., MARRA, E., PASSARELLA, S. & CALISSANO, P. 1996. Rapid uncoupling of oxidative phosphorylation accompanies glutamate toxicity in rat cerebellar granule cells. *Neuroreport*, 7, 2519-23.
- ATTWELL, D. & LAUGHLIN, S. B. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 1133-45.
- BARANOVA, O., MIRANDA, L. F., PICHIOLE, P., DRAGATIS, I., JOHNSON, R. S. & CHAVEZ, J. C. 2007. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 27, 6320-32.
- BERGBAUER, K., DRINGEN, R., VERLEYSDONK, S., GEBHARDT, R., HAMPRECHT, B. & WIESINGER, H. 1996. Studies on fructose metabolism in cultured astroglial cells and control hepatocytes: lack of fructokinase activity and immunoreactivity in astrocytes. *Dev Neurosci*, 18, 371-9.
- BLACKBURN, R. V., SPITZ, D. R., LIU, X., GALOFORO, S. S., SIM, J. E., RIDNOUR, L. A., CHEN, J. C., DAVIS, B. H., CORRY, P. M. & LEE, Y. J. 1999. Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells. *Free Radic Biol Med*, 26, 419-30.
- BOREK, C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*, 131, 1010S-5S.
- BRENNAN, A. M., CONNOR, J. A. & SHUTTLEWORTH, C. W. 2006. NAD(P)H fluorescence transients after synaptic activity in brain slices: predominant role of mitochondrial function. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 1389-406.
- BUDD, S. L. & NICHOLLS, D. G. 1996. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 67, 2282-91.
- CABRERA, R., MARTÍNEZ, L., LAGUNA, G., JUÁREZ, R., ROSAS, B. & LORIA, C. 2008. Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. *Estudio multicéntrico Med Int Mex*, 24, 98-103.
- CASTREJON, V., CARBÓ, R. & MARTÍNEZ, M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB*, 26, 49-57.
- CORTON, J. M., GILLESPIE, J. G. & HARDIE, D. G. 1994. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol*, 4, 315-24.
- CULMSEE, C., BONDADA, S. & MATTSON, M. P. 2001. Hippocampal neurons of mice deficient in DNA-dependent protein kinase exhibit increased vulnerability to DNA damage, oxidative stress and excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res*, 87.

- CHANG, M., HAMILTON, J. A., SCHOLZ, G. M., MASENDYCH, P., MACAULAY, S. L. & ELSEGOOD, C. L. 2009. Phosphatidylinositol-3 kinase and phospholipase C enhance CSF-1-dependent macrophage survival by controlling glucose uptake. *Cell Signal*, 21, 1361-9.
- CHIH, C. P. & ROBERTS JR, E. L. 2003. Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 1263-81.
- CHOI, D. W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 7, 369-79.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.
- DU PLESSIS, A. J. & JOHNSTON, M. V. 1997. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol*, 24, 627-54.
- DUELLI, R. & KUSCHINSKY, W. 2001. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*, 16, 71-6.
- DWYER, D. S., VANNUCCI, S. J. & SIMPSON, I. A. 2002. Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. *Int Rev Neurobiol*, 51, 159-88.
- EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. 2002. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell*, 13, 2276-88.
- ESPINOZA-ROJO, M., ITURRALDE-RODRÍGUEZ, K. I., CHÁNEZ-CÁRDENAS, M. E., RUIZ-TACHIQUÍN, M. E. & AGUILERA, P. 2010. Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 10, 317-25.
- ESTRADA, D. E., ELLIOTT, E., ZINMAN, B., POON, I., LIU, Z., KLIP, A. & DANEMAN, D. 1994. Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals. *Metabolism*, 43, 591-8.
- FERNANDES, R., HOSOYA, K.-I. & PEREIRA, P. 2011. Reactive oxygen species downregulate glucose transport system in retinal endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 10, 1-39.
- FUDONG, L., DOROTHY, P. & M, L. D. 2009. TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 1-8.
- GALARDO, M. N., RIERA, M. F., PELLIZZARI, E. H., CIGORRAGA, S. B. & MERONI, S. B. 2007. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose nucleoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol*, 39, 279-88.
- GERHART, D. Z., LEVASSEUR, R. J., BRODERIUS, M. A. & DREWES, L. R. 1989. Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res*, 22, 464-72.
- GÓMEZ-MARTÍNEZ, D. 2009. Tesis: El extracto de ajo envejecido y la s-alil-cisteína inducen la expresión de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 y GCLC en isquemia cerebral. *Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Maestría en Ciencias Biomédicas*, 4-26.
- GUPTA, R., SINGH, M. & SHARMA, A. 2003. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res*, 48, 209-15.
- HARDIE, D. G., HAWLEY, S. A. & SCOTT, J. W. 2006. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol*, 574, 7-15.
- HILL, M. D. & HACHINSKI, V. 1998. Stroke treatment: Time is brain. *Lancet (Suppl)*, 352, 10-14.
- JONES, N. M. & BERGERON, M. 2001. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 1105-14.

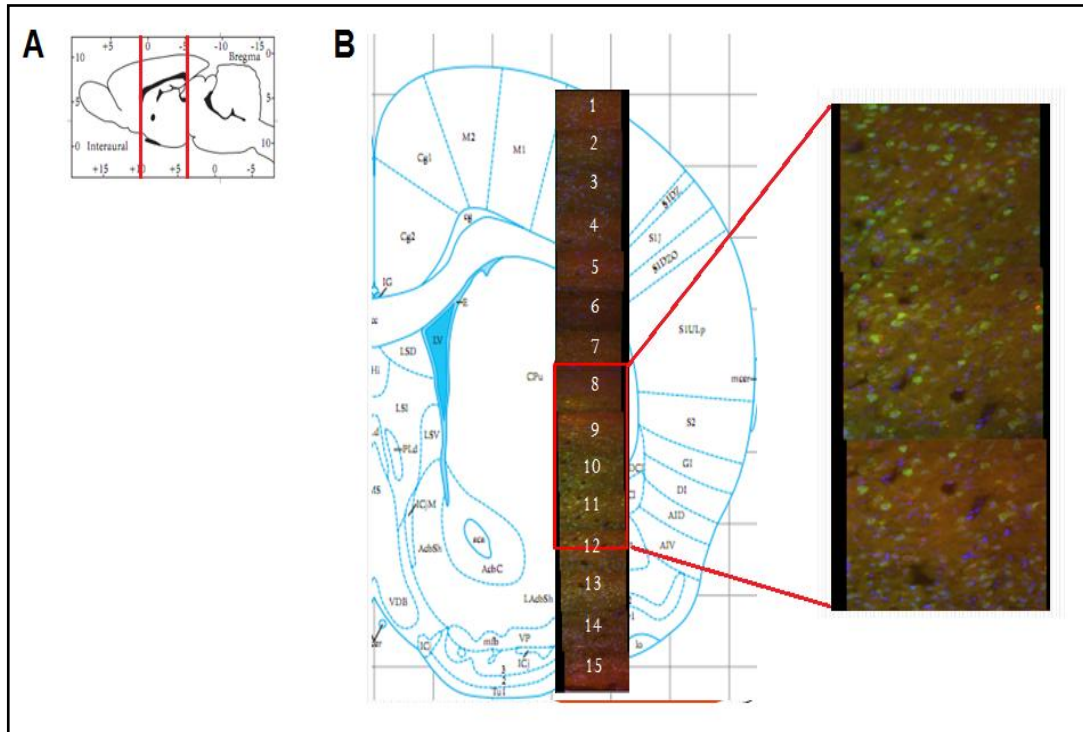
- JOOST, H. G. & THORENS, B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, 18, 247-56.
- JUURLINK, B. H. & SWEENEY, M. I. 1997. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci. and Biobeh. Rev.*, 21, 121-128.
- KAN, O., BALDWIN, S. A. & WHETTON, A. D. 1994. Apoptosis is regulated by the rate of glucose transport in an interleukin 3 dependent cell line. *J Exp Med*, 180, 917-23.
- KANN, O., SCHUCHMANN, S., BUCHHEIM, K. & HEINEMANN, U. 2003. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *Neuroscience*, 119, 87-100.
- KLIP, A., TSAKIRIDIS, T., MARETTE, A. & ORTIZ, P. A. 1994. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J*, 8, 43-53.
- LEE, J. M., ZIPFEL, G. J. & CHOI, D. W. 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 399, A7-14.
- LEE, W. H. & BONDY, C. A. 1993. Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression. *Endocrinology*, 133, 2540-4.
- LEE, Y. J., GALOFORO, S. S., BERNIS, C. M., CHEN, J. C., DAVIS, B. H., SIM, J. E., CORRY, P. M. & SPITZ, D. R. 1998. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem*, 273, 5294-9.
- LI, H., YAN, Z., ZHU, J., YANG, J. & HE, J. 2011. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology*, 60, 252-8.
- LIPTON, P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79, 1431-568.
- LONGA, E. Z., WEINSTEIN, P. R., CARLSON, S. & CUMMINS, R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20, 84-91.
- LUENGO, L. 2007. El ajo: propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM*, 26, 79-81.
- MAIESE, K. (ed.) 1998. *Hypoxic-ischemic encephalopathy*, New Jersey.
- MARTÍNEZ-ORGADO, J., RUIZ-GAYO, M., CANO, M. V., ALONSO, M. J., GONZÁLEZ, R., BONET, B. & MARÍN, J. 1999. Metabolismo neuronal en el daño hipóxico- isquémico. Isquemia y reperfusión cerebral. *Revista Latinoamericana de Neonatología (RELAN)* 1, 235-242.
- MASSA, S. M. & SWANSON, R. A. 1996. The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 8, 95-158.
- MCCULLOUGH, L. D., ZENG, Z., BLIZZARD, K. K., DEBCHOUHURY, I. & HURN, P. P. 2005. Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25.
- MENZIES, S. A., HOFF, J. T. & BETZ, A. L. 1992. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, 31, 100-6; discussion 106-7.
- MOBASHERI, A., RICHARDSON, S., MOBASHERI, R., SHAKIBAEI, M. & HOYLAND, J. A. 2005. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol*, 20, 1327-38.
- MODO, M., STROEMER, R. P., TANG, E., VEIZOVIC, T., SOWNISKI, P. & HODGES, H. 2000. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods*, 104, 99-109.
- MURAKAMI, T., NISHIYAMA, T., SHIROTANI, T., SHINOHARA, Y., KAN, M., ISHII, K., KANAI, F., NAKAZURU, S. & EBINA, Y. 1992. Identification of two enhancer elements in the gene

- encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *J Biol Chem*, 267, 9300-6.
- MURANYI, M. & LI, P. A. 2006. Hyperglycemia increases superoxide production in the CA1 pyramidal neurons after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 393, 119-21.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. 2004. The rat brain: in stereotaxic coordinates. *Elsevier*, 1-462.
- PEDRAZA, L. O. 2001. Ataque cerebrovascular isquémico agudo
- PETERS, O., BACK, T., LINDAUER, U., BUSCH, C., MEGOW, D., DREIER, J. & DIRNAGL, U. 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 196-205.
- RATHMELL, J., FOX, C., PLAS, D., HAMMERMAN, P., CINALLI, R. & THOMPSON, C. 2003. Akt directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol*, 23, 7315-28.
- RUÍZ, J., GONZALEZ, C., GARCIA, V., GUTIÉRREZ, F. & S., G. 2003. Enfermedad vascular cerebral isquémica en dos hospitales mexicanos. *Rev Mex Neurociencia.*, 4, 319-323.
- SALEEM, S., AHMAD, M., AHMAD, A. S., YOUSUF, S., ANSARI, M. A., KHAN, M. B., ISHRAT, T. & ISLAM, F. 2006. Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia. *J Med Food*, 9, 537-44.
- SEMENZA, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 588-94.
- SHARP, F. R., RAN, R., LU, A., TANG, Y., STRAUSS, K. I., GLASS, T., ARDIZZONE, T. & BERNAUDIN, M. 2004. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx*, 1, 26-35.
- SIMAO, F., MATTE, A., MATTE, C., SOARES, F. M., WYSE, A. T., NETTO, C. A. & SALBEGO, C. G. 2011. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na(+)/K(+)-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem*.
- SIMPSON, I. A., CARRUTHERS, A. & VANNUCCI, S. J. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1766-91.
- SIMPSON, I. A., DWYER, D., MALIDE, D., MOLEY, K. H., TRAVIS, A. & VANNUCCI, S. J. 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E242-53.
- SPITZ, D. R., SIM, J. E., RIDNOUR, L. A., GALOFORO, S. S. & LEE, Y. J. 2000. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci*, 899, 349-62.
- SWANSON, R. A. 1992. Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. *Neurosci Lett*, 147, 143-6.
- TEGOS, T. J., KALODIKI, E., DASKALOPOULOU, S. S. & NICOLAIDES, A. N. 2000. Stroke: epidemiology, clinical picture, and risk factors--Part I of III. *Angiology*, 51, 793-808.
- TSURUTA, R., FUJITA, M., ONO, T., KODA, Y., KOGA, Y., YAMAMOTO, T., NANBA, M., SHITARA, M., KASAOKA, S., MARUYAMA, I., YUASA, M. & MAEKAWA, T. 2010. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Res*, 1309, 155-63.
- TYMIANSKI, M., CHARLTON, M. P., CARLEN, P. L. & TATOR, C. H. 1993. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci*, 13, 2085-104.
- VANUCCI, R., YAGER, J. & VANUCCI, S. 1994. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* , 14, 279-288.
- VANUCCI, S., CLARK, R., STECK-KOELHER, E. LI, K., SMITH, D., MAHER, F. & SIMPSON, A. 1997. Glucose Transporter Expression in Brain: Relationship to Cerebral Glucose Utilization. *Energy Metabolism in Brain Function and Neuroprotection*, 20, 26-29.

- WEINBERG, D., MANIER, M., RICHARDSON, M. & HAIBACH, F. 1993. Identification and quantification of organosulfur compliance markers in a garlic extract. *J. Agric. Food Chem.*, 41.
- WEISOVA, P. C., C. G. DEVOCELLE, M. PREHN, J. H. WARD, M. W. 2009. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *J Neurosci*, 29, 2997-3008.
- WHEELER, T. J., SIMPSON, I. A., SOGIN, D. C., HINKLE, P. C. & CUSHMAN, S. W. 1982. Detection of the rat adipose cell glucose transporter with antibody against the human red cell glucose transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 105, 89-95.
- WIEMAN, H. L. W., J. A. RATHMELL, J. C. 2007. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell*, 18, 1437-46.
- WIESINGER, H., THIESS, U. & HAMPRECHT, B. 1990. Sorbitol pathway activity and utilization of polyols in astroglia-rich primary cultures. *Glia*, 3, 277-82.
- WOOD, I. S. T., P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, 89, 3-9.
- ZHAO, F. Q. & KEATING, A. F. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics*, 8, 113-28.

8. Anexos

8.1 A) Ilustración del tipo de corte coronal realizado para obtener la corteza y estriado cerebral de la rata. **B)** Región fotografiada para realizar la cuantificación de la inmunofluorescencia.



8.2. Preparación PAF al 4%

Pesar el PAF (40 g) y colocarlo en 1 L de PBS (0.1 M). Agitar con una mosca magnetizada (para disolver el PAF) aproximadamente a 70°C hasta que el PAF se torne transparente. Evitar el sobrecalentamiento (ya que el PAF puede tornarse color ámbar). Es importante sellar el vaso de precipitado con papel aluminio con la finalidad de evitar inhalar el PAF de forma directa, ya que el PAF es un potente agente fijador de tejidos. También es importante tener un lugar abierto para la preparación del PAF.

8.3. Preparación de portaobjetos con gelatina al 0.5%

Verter el agua destilada y agregar la gelatina (5 g) en 1000 mL de agua destilada y calentar hasta que se diluya la gelatina. Retirar el recipiente del calor (evitando la formación de burbujas) y retirar el exceso de espuma con una toalla de papel. Introducir los portaobjetos uno por uno con una pinza y mantenerlos sumergidos aproximadamente durante 5 segundos. Secar los portaobjetos al aire libre a temperatura ambiente (evitando el polvo). El objetivo de la gelatinización es lograr una mayor adhesión del material biológico por aumento de la tensión superficial. Para verificar la buena gelatinización, se escoge un portaobjetos seco, se agrega una gota de agua y se inclina. La gota no debe resbalarse.

Tabla 1. Conteo de células positivas a NeuN y Glut1. A) Nivel de GLUT-1/NeuN total, B) Nivel de GLUT-1/NeuN en corteza y C) Nivel de GLUT-1/NeuN en estriado. Todos los resultados obtenidos fueron normalizados con el número de núcleos (tinción con DAPI).

| A | GRUPO | CONTROL | | 2/2 IP | | 2/2 IP+EAE | |
|-------|------------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) |
| TOTAL | GLUT1 | 1075+/-8 | 49+/-0.4 | 509+/-24 | 21+/-1.1 | 822+/-11 | 35+/-0.6 |
| | NeuN | 821+/-8 | 38+/-0.3 | 325+/-10 | 13+/-0.5 | 668+/-6 | 29+/-0.4 |
| | GLUT1/NeuN | 702+/-6 | 32+/-0.3 | 249+/-10 | 10+/-0.4 | 434+/-5 | 18+/-0.2 |
| | DAPI | 2181+/-16 | 100+/-0 | 2420+/-21 | 111+/-1 | 2345+/-17 | 90+/-1 |

| B | GRUPO | CONTROL | | 2/2 IP | | 2/2 IP+EAE | |
|---------|------------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) |
| CORTEZA | GLUT1 | 707+/-3 | 32+/-0.2 | 251+/-14 | 10+/-0.6 | 434+/-8 | 19+/-0.4 |
| | NeuN | 536+/-6 | 46+/-0.4 | 163+/-7 | 13+/-0.6 | 324+/-4 | 26+/-0.4 |
| | GLUT1/NeuN | 410+/-4 | 35+/-0.4 | 130+/-5 | 10+/-0.4 | 270+/-6 | 22+/-0.7 |
| | DAPI | 1173+/-10 | 54+/-0.5 | 1270+/-7 | 53+/-0.5 | 1232+/-13 | 53+/-0.4 |

| C | GRUPO | CONTROL | | 2/2 IP | | 2/2 IP+EAE | |
|----------|------------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) |
| ESTRIADO | GLUT1 | 368+/-6 | 37+/-0.7 | 258+/-11 | 23+/-1.3 | 388+/-6 | 35+/-0.8 |
| | NeuN | 284+/-13 | 28+/-1 | 162+/-8 | 14+/-0.9 | 344+/-5 | 31+/-0.7 |
| | GLUT1/NeuN | 292+/-6 | 29+/-0.8 | 119+/-7 | 10+/-0.6 | 164+/-6 | 15+/-0.5 |
| | DAPI | 1008+/-15 | 46+/-0.5 | 1151+/-21 | 47+/-0.5 | 1113+/-13 | 47+/-0.4 |

Tabla 2. Conteo de células positivas a GFAP y Glut1. A) Nivel de GLUT-1/GFAP total, B) Nivel de GLUT-1/GFAP en corteza y C) Nivel de GLUT-1/GFAP en estriado. Todos los resultados obtenidos fueron normalizados con el número de núcleos (tinción con DAPI).

| GRUPO | CONTROL | | 2/2 IP | | 2/2 IP+EAE | | |
|-------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|----------|
| | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | |
| TOTAL | GLUT1 | 1156+/-12 | 52+/-0.6 | 419+/-9 | 19+/-0.4 | 803+/-4 | 37+/-0.3 |
| | NeuN | 713+/-3 | 32+/-0.2 | 207+/-3 | 9+/-0.1 | 527+/-7 | 28+/-0.3 |
| | GLUT1/GFAP | 550+/-7 | 25+/-0.4 | 108+/-2 | 5+/-0.1 | 236+/-6 | 11+/-0.3 |
| | DAPI | 2231+/-10 | 100+/-0 | 2224+/-10 | 96+/-0.8 | 2168+/-15 | 98+/-0.7 |

| GRUPO | CONTROL | | 2/2 IP | | 2/2 IP+EAE | | |
|---------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|----------|
| | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | |
| CORTEZA | GLUT1 | 752+/-6 | 62+/-0.6 | 290+/-7 | 25+/-0.6 | 477+/-7 | 38+/-1.3 |
| | NeuN | 426+/-7 | 35+/-0.5 | 129+/-4 | 11+/-0.4 | 274+/-2 | 21+/-0.2 |
| | GLUT1/GFAP | 355+/-4 | 29+/-0.4 | 67+/-2 | 6+/-0.2 | 126+/-3 | 10+/-0.1 |
| | DAPI | 1208+/-10 | 54+/-0.5 | 1157+/-9 | 52+/-0.3 | 1340+/-40 | 60+/-1.7 |

| GRUPO | CONTROL | | 2/2 IP | | 2/2 IP+EAE | | |
|----------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|----------|
| | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | No. De células positivas | % (valor normalizado con el número de núcleos) | |
| ESTRIADO | GLUT1 | 404+/-17 | 39+/-1.7 | 129+/-6 | 12+/-0.6 | 326+/-8 | 43+/-3.9 |
| | NeuN | 286+/-8 | 28+/-0.7 | 79+/-3 | 7+/-0.3 | 253+/-2 | 32+/-2.1 |
| | GLUT1/GFAP | 195+/-8 | 19+/-0.9 | 41+/-2 | 4+/-0.2 | 110+/-3 | 15+/-1.6 |
| | DAPI | 1023+/-13 | 46+/-0.5 | 1067+/-7 | 48+/-0.3 | 864+/-37 | 40+/-1.7 |