



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de
los transportadores de glucosa (GLUT) en isquemia
cerebral in vivo”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ANAHÍ TORNES REYES

DIRECTORA DE TESIS: Dra. MÓNICA ESPINOZA ROJO
CO-DIRECTORA DE TESIS: Dra. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ



Chilpancingo, Gro., Enero 2014

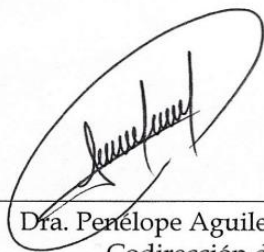


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

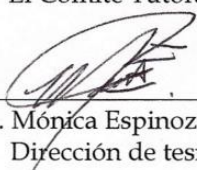
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de junio de dos mil trece, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa (GLUT) en isquemia cerebral *in vivo*", presentada por la alumna Anahí Tornes Reyes, 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. Penélope Aguilera Hernández
Codirección de tesis



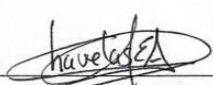
Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis




Dr. Eduardo Castañeda Saucedo



Dr. Alejandro Millán Vega




Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame



Vo. Bo

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



Vo. Bo

Dra. Eugenia Flores Alfaro
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en 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 Co-dirección de la
Dra. Penélope Aguilera Hernández

La asesoría de

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Dr. Alejandro Millán Vega

Durante el periodo en que la C. Anahí Tornos Reyes cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca de CONACyT con número de becario: 260552. Además, recibió el apoyo del Banco Santander al otorgarle la beca de Movilidad Nacional Santander durante el periodo de Agosto-Diciembre del 2013.

AGRADECIMIENTOS

“Dale un pescado a un hombre, y comerá un día. Enséñale a pescar, y comerá toda su vida”.

Dra. Mónica Espinoza Rojo, le agradezco la oportunidad que me dio al brindarme su confianza para llevar a cabo este proyecto. Gracias por ser una excelente maestra, por siempre tener una palabra de aliento, por impulsarme a seguir, por creer en mí y además de todo por ser confidente y amiga.

Dra. Penélope Aguilera Hernández, gracias por la paciencia, la comprensión, el tiempo dedicado y su disposición para enseñarme. Además le agradezco los consejos, las conversaciones y su amistad.

Gracias a ambas por motivarme con su ejemplo.....

“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”

A mi comité tutorial (**Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame y Dr. Alejandro Millán Vega**), gracias por sus aportaciones y constantes sugerencias para hacer de este un buen proyecto final.

A la **Dra. Alma Ortíz Plata** y al **Dr. José Pedraza Chaverri**, gracias a ambos por su valiosa colaboración.

Gracias a cada uno de mis compañeros de generación, por acompañarme a lo largo de este viaje, por hacer amenas las clases y sobre todo por su apoyo y amistad. Los voy a extrañar.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral (INNN) por tenderme la mano, por hacerme sentir parte de su equipo y brindarme su amistad.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

“Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa (GLUT) en isquemia cerebral in vivo”

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSIÓN	22
7. REFERENCIAS	30
8. ANEXOS.....	36

1. RESUMEN

La isquemia cerebral es el resultado de la oclusión de una arteria cerebral importante, e implica una cascada de eventos metabólicos que comienzan durante el insulto y prosiguen en el período de recuperación del flujo sanguíneo, etapa conocida como reperfusión (R). El deterioro del flujo sanguíneo cerebral restringe el suministro de oxígeno, disminuye el metabolismo de la glucosa e induce excitotoxicidad por glutamato. Los antioxidantes como el resveratrol (RSV) previenen el daño isquémico aumentando la función mitocondrial a través de mecanismos estrechamente asociados con el metabolismo de la glucosa. La captación de glucosa en el sistema nervioso de los mamíferos está mediada por la familia de proteínas facilitadoras en el transporte de glucosa (GLUT's). Su regulación es importante sobre todo durante R, ya que la entrada de glucosa a la célula genera la producción de ERO's, en un ambiente en donde la actividad antioxidante endógena se encuentra disminuida. Por lo tanto el **objetivo** del presente estudio fue: investigar si el RSV regula la expresión del mRNA de GLUT1, GLUT3 y GLUT4 después de isquemia/reperfusión. **Métodos:** Ratas Wistar macho (250-350 g) se dividieron en: 1. Ratas control (CT); 2. Ratas control tratadas con etanol al 50% como vehículo (CT+ VH); 3. Ratas control tratadas con RSV (CT+RSV); 4. Ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2, 4, y 24 horas de R (2h/2hR, 2h/4hR, 2h/24hR, respectivamente); 5. Ratas sometidas a 2 horas de isquemia, 2, 4, y 24 horas de R y tratadas con EtOH al 50% como vehículo (2h/2hR+ VH, 2h/4hR+ VH, 2h/24hR+ VH); 6. Ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2, 4, y 24 horas de R y tratadas con RSV (2h/2hR+RSV, 2h/4hR+RSV, 2h/24hR+RSV); 7. Ratas con operación simulada, sin OACM (Sham). **Resultados:** A **2h/2hR** aumentó la expresión de GLUT1 (1.7 veces en relación al CT). La I/R no alteró significativamente el nivel del mRNA de GLUT3 (1.17 ± 1.17) y GLUT4 (0.98 ± 0.97); sin embargo, se observa una tendencia en el aumento de la expresión de estos mensajeros. El VH y el RSV disminuyeron el mRNA de los tres GLUT's tanto en el grupo CT como en I/R. A **2h/4hR** disminuyó la expresión de GLUT1 (0.23 ± 0.01), GLUT3 (0.45 ± 0.04) y GLUT4 (0.07 ± 0.03). La administración del RSV administrado, previno la disminución de la expresión inducida por la I/R en los tres transportadores. A **2h/24hR**, disminuyó la expresión de GLUT1 (89%), GLUT3 (83%) y GLUT4 (96%) comparado con el CT (~1). Después del daño ocasionado por I/R, el RSV no evitó la disminución del mRNA de GLUT1 (0.19 ± 0.10), GLUT3 (0.04 ± 0.00) y GLUT4 (0.01 ± 0.01). **Conclusión:** La isquemia aumenta los niveles de mRNA de los GLUT's a 2h/2hR, mientras que a 4 y 24 horas de R la disminuye. La administración aguda del RSV al inicio de la R fue capaz de modificar la expresión del mRNA de los GLUT's, después de un evento isquémico por OACM, el efecto más evidente del RSV fue a 2h/4hR ya que regula la expresión de los mensajeros de los GLUT's, hasta niveles normales. A 2h/24hR, el tratamiento con RSV ya no tiene efecto.

2. ABSTRACT

Ischemic stroke results from occlusion of a major cerebral artery and involves a cascade of metabolic events that begin during insult and proceed well into the blood flow recovery period [reperfusion (R)]. Impairment of cerebral blood flow restricts the delivery of substrates, predominantly oxygen and glucose with the consequent decline in the metabolism of energy and induction of glutamate excitotoxicity. Antioxidants [e.g. resveratrol (RSV)] prevent the ischemic-induced damage by increasing mitochondrial function through mechanisms closely associated with glucose metabolism. Glucose uptake into the mammalian nervous system is mediated by the family of facilitative glucose transporter proteins (GLUT's). Its regulation is especially important for R, since the entry of glucose into the cell generates ROS production's, in an environment where the endogenous antioxidant activity is decreased. Therefore the **objective** of this study was to: investigate whether RSV regulates mRNA expression of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 after ischemia / reperfusion. **Methods:** Male Wistar rats (250-350 g) were divided in: 1. Rats control, (CT); 2. Rats control treated with ethanol as a vehicle 50% (CT+VH); 3. Rats control treated with RSV (CT+RSV); 4. Rats subjected to 2 hours of ischemia and 2, 4, and 24 hours of reperfusion (2hI/2hR, 2hI/4hR, 2hI/24hR respectively); 5. Rats subjected to 2 hours of ischemia, 2, 4, and 24 hours of reperfusion, and treated with ethanol as a vehicle 50% (2hI/2hR+VH, 2hI/4hR+VH, 2hI/24hR+VH); 6. Rats subjected to 2 hours of ischemia and 2, 4, and 24 hours of reperfusion and treated with RSV (2hI/2hR+RSV, 2hI/4hR+RSV, 2hI/24hR+RSV); 7. sham-operated rats without MCAO (Sham). **Results:** A **2hI/2hR** caused an increase in the expression of GLUT1 (1.7 times relative compared to CT(~1)). The I/R did not significantly alter the level of mRNA GLUT3 (1.17 ± 1.17) and GLUT4 (0.98 ± 0.97), but there is a trend in increasing mRNA expression. The VH and RSV decreased mRNA in both the CT and I/R. A **2hI/4hR** the I/R decreased the expression of GLUT1 (0.23 ± 0.01), GLUT3 (0.45 ± 0.04) and GLUT4 (0.07 ± 0.03). RSV administered to rats in the experimental group, prevented the reduction of induced expression I/R. A **2hI/24hR** expression decreased of GLUT1 (89%), GLUT3 (83%) and GLUT4 (96%) compared with CT (~1). After the damage caused by I/R did not prevent RSV decreased GLUT1 mRNA (0.19 ± 0.10), GLUT3 (0.04 ± 0.00) and GLUT4 (0.01 ± 0.01). **Conclusion:** Ischemia increases 2hR/2hI mRNA levels, while at 4 and 24 hours of reperfusion decreases. RSV acute administration at the beginning of reperfusion was able to modify the expression of mRNA of GLUT's, after an ischemic event for MCAO. The most obvious effect of RSV was a 2hI/4hR because it regulates the expression of GLUT's messengers, to normal levels. A 2hI/24hR, RSV treatment and has no effect.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares constituyen uno de los principales problemas de salud pública en países industrializados con un total de 780,000 defunciones y 4.61 millones de muertes en países en vías de desarrollo; representando la segunda causa de muerte alrededor del mundo (Lopez et al. 2006). En México la prevalencia del accidente cerebrovascular (**ACV**) es del 11.5% (Cabrera et al. 2008) y se encuentra entre las 7 principales causas de muerte, ocupando el 3° lugar dentro de esta lista (INEGI 2010). Según su etiología el ACV se clasifica en hemorrágico e isquémico, siendo este último el responsables de más del 80% de los casos (Díez-Tejedor et al. 2001; Cabrera et al. 2008). La isquemia cerebral (**IC**) es una condición donde el cerebro o partes de éste no reciben flujo sanguíneo (**FS**), debido a la formación de un émbolo o trombo en una arteria cerebral importante (Díez-Tejedor et al. 2001); 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 fisiológicamente importantes: 1) el núcleo isquémico o área de infarto, región directamente irrigada por la arteria ocluida (con una reducción del flujo sanguíneo menor al 15%), en donde se observa la muerte neuronal por necrosis; 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 (con una reducción del flujo sanguíneo menor al 45%) (Dirnagl et al. 1999; Lipton 1999; Moustafa & Baron 2008). En la penumbra, el daño evoluciona lentamente ya que pueden activarse procesos de neuroprotección, lo que permite que el tejido pueda mantenerse viable por varias horas.

El término neuroprotección hace referencia al efecto de cualquier sustancia o molécula química o biológica, con efectos protectores en el sistema nervioso que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de enfermedades o lesiones cerebrales. Sin embargo, las células de esta región morirán si el flujo sanguíneo no se reestablece. La Reperusión (**R**), término utilizado para referirse al restablecimiento del flujo sanguíneo, garantiza el aporte de oxígeno y

glucosa necesarios para restaurar la actividad metabólica normal; pero a su vez es el factor desencadenante de vías de daño celular, ya que la llegada excesiva del oxígeno, después de un periodo de ausencia, favorece la producción de radicales libres (Lipton 1999; Kamat et al. 2009).

El tratamiento de elección para IC está basado en fármacos con actividad trombolítica, como el activador de plasminógeno tisular recombinante (**rtPA**). Estos fármacos tienen la función de restaurar el flujo sanguíneo estimulando la disgregación del coágulo. Si la isquemia es prolongada, el tratamiento trombolítico no sólo no resulta efectivo, sino que exacerba el daño por R debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (**ERO's**) (Peters et al. 1998; Röther et al. 2013). Cuando son producidas en exceso las ERO's reaccionan irreversiblemente con varios constituyentes celulares tales como proteínas, enlaces dobles de fosfolípidos y el ADN nuclear. De esta manera, las ERO's promueven la peroxidación lipídica y daño a prácticamente cualquier componente celular, además de provocar , la desregulación de los procesos celulares (e. g. homeostasis de iones, la señalización celular y la expresión génica), y mutaciones en el genoma (Thompson et al. 2012; Durukan & Tatlisumak 2007; Li 2006). Sin embargo, las ERO's en concentraciones moderadas pueden modular la respuesta celular ante la isquemia activando vías de supervivencia (e. g. activación de la proteína quinasa C épsilon (**PKCε**), Sirtuina 1 (**SIRT1**), Factor Inducible por Hipoxia 1 (**HIF-1**) y factor de transcripción Nrf2) (Thompson et al. 2012).

Con base en lo anterior surge la necesidad de combinar estrategias terapéuticas, de manera que se puedan minimizar los daños ocasionados por el estrés oxidativo celular asociado a la IC y la R. Estudios recientes han revelado que el uso de una mezcla de antioxidantes resulta efectivo para minimizar los daños ocasionados por la trombólisis seguida de un infarto de miocardio, demostrando la utilidad de los antioxidantes en la aplicación clínica como tratamiento (Hicks et al. 2007). Adicionalmente, hemos demostrado que la administración del extracto de ajo envejecido y el resveratrol (**RSV**) al inicio de la R previenen el daño ocasionado por

la oclusión de la arteria cerebral media (**OACM**) en el modelo experimental en rata (Cervantes et al. 2013; Trejo-Quiñones 2013).

Diferentes productos de origen natural han sido propuestos como tratamiento contra el daño inducido por las ERO's producidas durante la isquemia/reperfusión (I/R) cerebral (Kamat et al. 2009). Entre ellos destaca el RSV, por su potente actividad antioxidante y su capacidad para recuperar el metabolismo energético. El RSV es un polifenol, sintetizado por plantas (eucalipto), semillas (girasol), legumbres (garbanzos) y frutas (uvas, nueces, cacahuates) en respuesta a situaciones estresantes como la radiación ultravioleta e infecciones (Scahill 2012). Su propiedad como antioxidante, proviene de su gran reactividad como donante de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado (Kovacic & Somanathan 2010). Además, se le ha atribuido un efecto neuroprotector contra la lesión provocada por la I/R al restaurar significativamente la actividad del complejo respiratorio mitocondrial (Yousuf et al. 2008), recuperar el contenido de ATP (Li et al., 2010b) y restablecer la actividad ATPasa Na⁺/K⁺ (Simao et al., 2011). Lo anterior, nos permite inferir que el efecto del antioxidante puede relacionarse con el aumento y/o regulación en la captación de glucosa, derivado posiblemente de la regulación de la expresión de sus proteínas transportadoras de glucosa (GLUT's).

En IC la sobre estimulación de los receptores de glutamato tipo NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) provoca la entrada masiva de iones Ca²⁺ (Dirnagl et al. 1999). En condiciones normales, la mitocondria se encarga de mantener la homeostasis de Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, en un proceso isquémico, la sobrecarga con este ion provoca la pérdida de su potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), afectando procesos como la síntesis de ATP, la generación de ERO's y la reducción de NAD(P)H (Nicholls & Ward 2000). Las despolarizaciones asociadas a la activación del receptor NMDA se propagan desde el área de infarto hasta el tejido sano, siguiendo el gradiente de estrés metabólico, por lo que la repolarización ocurre relativamente rápido donde las fuentes de energía no están comprometidas.

La sobreexcitación de los receptores NMDA altera el metabolismo energético neuronal, disminuyendo su función pero manteniéndolas viables mientras logran mantener su $\Delta\psi_m$ (Ward et al., 2007). En cultivos, se ha visto que la supervivencia se observa en aquellas neuronas que incrementan la entrada de glucosa mediado por el transporte de ésta molécula (Weisová et al. 2009; Espinoza-Rojo et al. 2010). Estos datos sugieren que los GLUT's podrían estar involucrados en conferir una mayor captación de glucosa que permita el mantenimiento del $\Delta\psi_m$ y por lo tanto neuroprotección.

En el cerebro la captación y la utilización de glucosa es mediado principalmente por los transportadores de glucosa GLUT1 y 3 (Maurer et al., 2006). En una lesión cerebral difusa la expresión de la proteína GLUT1 y 3 se eleva al menos en un 300% a las 4 horas después del daño en comparación al control; este incremento en la expresión después de un trauma se mantiene hasta por 48 horas y es parte de una respuesta de estrés neuronal para restablecer la energía requerida y activar procesos de reparación (Hamlin et al. 2001). Por otra parte, se ha reportado la expresión de GLUT4 en cerebro, aunque este transportador es dependiente de insulina, existen estudios que confirman su expresión en hipocampo (Grillo et al. 2009), cerebelo (Bakirtzi et al. 2009) y corteza cerebral (Gómez et al. 2010), pero no se ha definido de manera precisa su participación durante un proceso isquémico.

Debido a que la I/R provoca alteraciones en la expresión de los transportadores de glucosa en cerebro en un proceso dependiente del estado redox, en el presente estudio se evaluó el efecto del RSV sobre la regulación de mRNA de GLUT1, GLUT3 y GLUT4.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS

Para la extracción de RNA total se utilizó TRIzol® Reagent (No. Catálogo 15596-018; INVITROGEN, USA). Para la síntesis de cDNA se utilizaron los siguientes reactivos: Deoxynucleoside triphosphate set (No. Catálogo 1 969 064; Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis USA); M-MLV Reverse Transcriptase (No. Catálogo M1701; Promega Corporation, Madison, USA); RNasin® Ribonuclease Inhibitor (No. Catálogo N2115; Promega Corporation, Madison, USA); Random Hexamers (No. Catálogo N8080127, Applied Biosystems, New Jersey USA). En los ensayos de expresión génica se utilizaron: Ribosomal RNA Control Reagents (VIC Probe) (No. Catálogo 4308329, Applied Biosystem, California USA) y sondas TaqMan®VIC (SLC2A1 (Rn1417099_m1), SLC2A3 (Rn01492963_m1) y SLC2A4 (Rn1752377_m1); Applied Biosystem, California USA). Para los ensayos enzimáticos se emplearon: AAPH (No. Catálogo 440914; Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA); Fluoresceína (No. Catálogo F6377; Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA); Trolox (No. Catálogo 648471; Calbiochem-Millipore; Beston, Inglaterra); Xantina oxidasa (No. Catálogo X4376; Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA); Xantina (No. Catálogo X0626; Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA); NBT (No. Catálogo N6876; Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA). Para el tratamiento que se aplicó a los animales de experimentación, se utilizó Resveratrol (No. Catálogo R5010; SIGMA®, Saint Louis Missouri, USA).

4.2. MODELO ANIMAL

Se emplearon ratas machos adultas de la cepa Wistar de 250-320 g de peso corporal (aproximadamente 16 semanas de edad) procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. Durante el estudio, las ratas fueron mantenidas en jaulas de acrílico, bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 horas luz/oscuridad). Se les

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

4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para determinar el efecto del RSV en la expresión del mRNA de GLUT1, GLUT3 y GLUT4. La administración del RSV y el vehículo (VH) se realizó al inicio de la R. Se obtuvo la corteza frontoparietal de cerebros de ratas (n = 8), las cuales fueron divididas de manera aleatoria en los siguientes grupos experimentales: 1. Ratas control (**CT**); 2. Ratas control tratadas con etanol al 50% como vehículo (**CT+ VH**); 3. Ratas control tratadas con RSV (**CT+RSV**) 4. Ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2, 4, y 24 horas de R (**2h/2hR, 2h/4hR, 2h/24hR**, respectivamente); 5. Ratas sometidas a 2 horas de isquemia, 2, 4, y 24 horas de R y tratadas con EtOH al 50% como vehículo (**2h/2hR+ VH, 2h/4hR+ VH, 2h/24hR+ VH**); 6. Ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 2, 4, y 24 horas de R y tratadas con RSV (**2h/2hR+RSV, 2h/4hR+RSV, 2h/24hR+RSV**); 7. Ratas con operación simulada, sin OACM (**Sham**). El déficit neurológico se evaluó a través de pruebas de conducta en ratas sometidas a I/R y se sacrificaron al término de los diferentes tiempos de R (2, 4, y 24 horas); Todos los grupos fueron sacrificadas al mismo tiempo.

4.4. TRATAMIENTOS

Se empleó RSV (trans-3,4',-5-trihydroxystilbene) a una dosis de 1mg/Kg de peso. El RSV es un polvo blanco con tintes amarillos con un peso molecular de 228.2 g/mol; es sensible a la luz y soluble en EtOH a 50 mg/mL, en dimetilsulfóxido (DMSO) a 16 mg/mL y muy poco soluble en agua (3 mg/mL). Para usos prácticos de los experimentos se utilizó una solución de RSV a una concentración de 5 mM en EtOH al 96%, la cual es estable por 12 semanas a 4°C. Se aplicó una dosis única de 1 mg/Kg de peso corporal en un volumen final de 100 µL por vía intravenosa (venas coccígeas, situadas a ambos lados de la cola en su punto central) al término de las 2 horas de la OACM (inicio de la R).

4.5. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral transitoria se indujo mediante 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 ACM. Después de 2 horas de obstrucción, se administró el tratamiento (RSV) o el vehículo (EtOH 50%) administrado vía intravenosa en la vena caudal de la rata. Posteriormente el filamento fue retirado cuidadosamente; los animales en esta etapa fueron anestesiados y suturados nuevamente con la finalidad de permitir la restauración del FSC (R) (Longa et al., 1989). La cirugía fue realizada por la Dra. Alma Ortiz Plata (Investigadora del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”).

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

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

4.7. RT-PCR EN TIEMPO REAL

4.7.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Se extrajo RNA total a partir de corteza frontoparietal empleando Trizol y siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada 50-100 mg de tejido se adicionó 1 ml de Trizol y se homogenizaron las muestras individualmente. En seguida se realizaron una serie de centrifugaciones a 4°C con el objetivo de eliminar las proteínas y lípidos del homogenizado presente en la interfase y fase con cloroformo, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y finalmente el RNA se precipitó con isopropanol. Por último, se hicieron lavados con EtOH al 75% para eliminar impurezas. Posteriormente, el RNA fue cuantificado a 260 nm. Para la síntesis de

cDNA se utilizó una concentración de 5 µg de RNA total, 1 µL de hexámeros (2.5µM/50ng) y H₂O-DEPC en un volumen final de 11.5 µL, la mezcla se incubó durante 5 min a 60°C. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó la mezcla de reacción (Buffer RT 1x, dNTPs 500µM, RNAsin 20 U, M-MLV-RT 200 U y DTT 0.1 M) para un volumen final de 20 µL por reacción y se incubó 1h a 37°C.

4.7.2 PCR en tiempo real

El ensayo de PCR en tiempo real se realizó a partir de una mezcla que contenía oligonucleótidos sentido y antisentido en concentraciones no limitantes y una sonda TaqMan® MGB 6-FAM para los genes blanco GLUT1, GLUT3 y GLUT4 usando como control interno del ensayo la expresión del RNA ribosomal de la subunidad 18S. Las reacciones se realizaron por duplicado y se amplificaron bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Se empleó un detector de PCR en tiempo real ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems).

4.7.2.1. Curva de validación.

El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Livak & Schmittgen 2001). Para validar el método de RT-PCR en tiempo real se realizó una curva de validación para cada gen blanco (GLUT1, GLUT3 y GLUT4) y para el gen endógeno 18S. Para determinar la eficiencia de amplificación (<92%) de los genes, se hicieron diluciones 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:100 del cDNA de ratas del grupo CT para los genes blanco y endógeno. Se realizó el PCR en tiempo real y se obtuvieron los valores de CT de los amplificados, se calcularon las $\Delta\Delta Ct$ y mediante la fórmula de la recta se calculó la pendiente ($m = -1.269$). Una máxima eficiencia se logra cuando el resultado de la pendiente (m) es menor o igual a 0.1. Con estos resultados se validó el uso de nuestras sondas (Ver anexos 2, 3 y 4).

4.8. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

4.8.1 Ensayo de atrapamiento de radical peroxilo (ROO·)

El ensayo para medir el porcentaje de atrapamiento del radical peroxilo, se realizó a partir de una mezcla que contenía compuestos azoderivados de AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro], para generar radicales peroxilos (ROO). Se utilizaron 25 µl de la muestra (diluciones de etanol en concentraciones decrecientes 96, 48, 31.9, 19.2 y 12.7%), y se mezcló con 150 µl de fluoresceína (30 nM) y 25 µl de APPH (38.5 nM.) La intensidad de fluorescencia disminuye a medida que avanza la degeneración oxidativa, la descomposición de la fluoresceína se mide en función del retardo en el decaimiento de fluorescencia, respecto a la presencia o ausencia del antioxidante. Las curvas de la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo se registran, y el área entre las dos curvas (con o sin antioxidante) se calcula. Posteriormente, el grado de protección antioxidante se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar (un análogo de la vitamina E). Diferentes concentraciones (0-2.5 µg/mL) de Trolox se utilizan para hacer una curva estándar, y las muestras de ensayo se comparan con esto. Los resultados de las muestras de ensayo se publican como "equivalentes de Trolox" (Huang et al. 2002). Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. José Pedraza Chaverri (Investigador de la Facultad de Química, UNAM).

4.8.2. Ensayo de atrapamiento de anión superóxido (O₂⁻)

El sistema xantina oxidasa fue usado para determinar la capacidad antioxidante del etanol (Bielski et al. 1980; Owen & Johns 1999). La generación de O₂⁻ y la actividad de la xantina oxidasa fueron medidas como el grado de reducción del NTB y la producción de ácido úrico, usando un espectrofotómetro (Du-640 serie Beckman). Un compuesto con capacidad de atrapamiento de O₂⁻ puede impedir la reducción del NTB sin interferir con la xantina oxidasa. A 200 µl de mezcla de reacción (90 µM xantina, 16 µM Na₂ CO₃, 22.8 µM NBT y 18 nM de buffer de fosfato, pH 7.0) se le adicionó 25 µl de buffer de fosfato (50 mM; pH 7.0) al tubo control y 25 µl de la muestra: 1) etanol concentrado y 2) etanol diluido 1:2 (48%), 1:3 (31.9%) y

1:5 (19.2 %). Después de mezclar, la reacción fue iniciada por la adición de 10 μl de xantina oxidasa (168 U/L). La densidad óptica fue registrada a 295 nm (producción de ácido úrico) y 560 nm (producción de O_2^-). Las reacciones se realizaron por triplicado. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. José Pedraza Chaverrí (Investigador de la Facultad de Química, UNAM).

5. RESULTADOS

5.1 Expresión del mRNA de los GLUT's a 2hI/2hR en corteza cerebral.

Recientes datos sobre la biodisponibilidad del RSV indican que este alcanza su pico máximo en plasma durante la primer hora después de su administración vía intravenosa (Walle et al. 2004). Por lo que decidimos evaluar si el RSV está ejerciendo efecto sobre el nivel de expresión de los GLUT's a nivel cerebral, a tiempos cortos de R. Para ello, los animales fueron sometidos a 2hI/2hR y la expresión de los transportadores se analizó por RT-PCR en tiempo real.

La expresión de los GLUT's en el grupo control fue considerada con un valor de 1, para realizar las respectivas comparaciones. Los resultados obtenidos muestran que la I/R produjo una elevación estadísticamente significativa de la expresión del mRNA principalmente de GLUT1 (2.7 ± 1.5) (**Figura 1A**), mientras que la expresión de GLUT3 (1.17 ± 1.17) (**Figura 1B**) y GLUT4 (0.98 ± 0.97) (**Figura 1C**) se mantuvieron a nivel basal.

Observamos que la administración del VH y el RSV disminuyeron el nivel de expresión del mRNA de los 3 genes tanto en el grupo CT como en el I/R. La disminución en la expresión del mRNA fue por debajo del nivel basal; con la excepción en la expresión del mRNA de GLUT3 en el grupo I/R+VH (1.2 ± 0.28) en donde el nivel de expresión fue similar al grupo I/R.

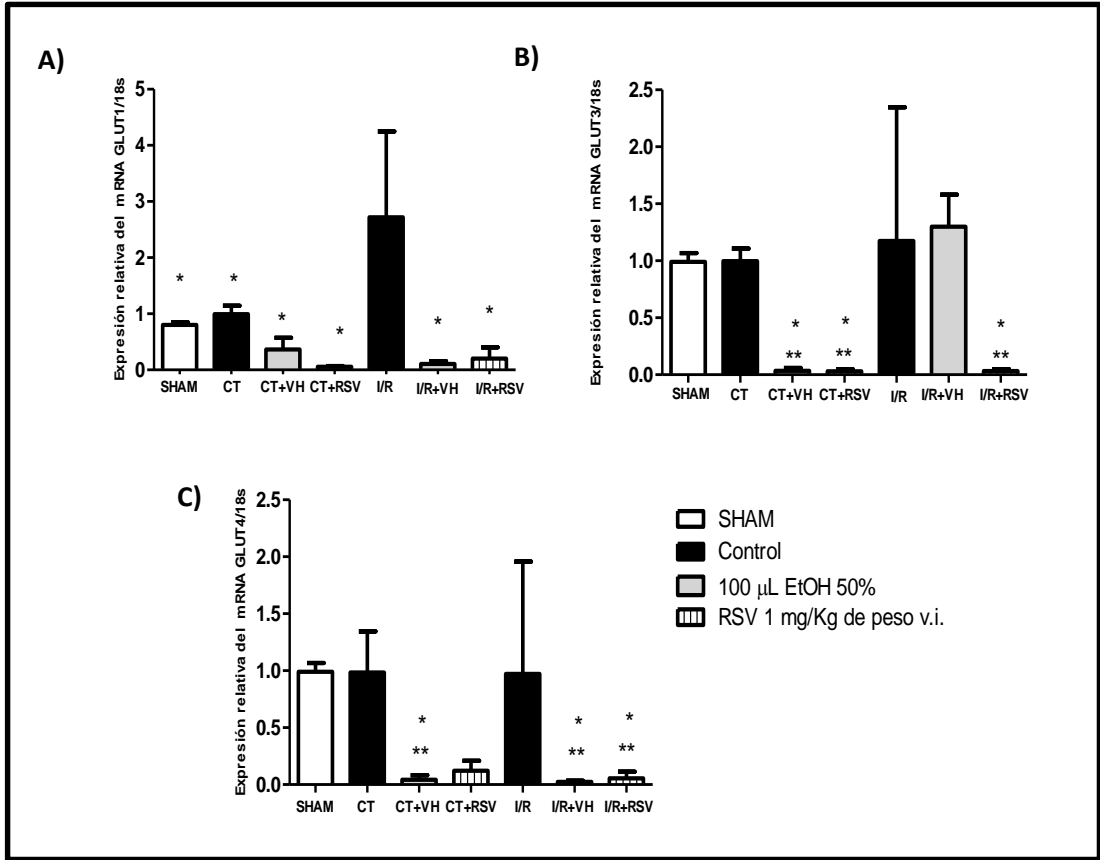


Figura 1. Efecto de la administración de RSV en la expresión relativa de los GLUT's a 2h/2hR. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar agrupados en dos categorías 1) Control: animales con cirugía pero sin oclusión de la arteria cerebral (SHAM), animales sin ningún tipo de tratamiento (CT), animales control tratados con etanol utilizado como vehículo (CT+VH), control tratados con RSV (CT+RSV); 2) Experimental, animales sometidos a 2 horas de isquemia y 2 horas de reperusión (2h/2hR) por oclusión de la arteria cerebral media, sin ningún tratamiento (I/R), animales con I/R tratados con vehículo (I/R+VH) y con tratamiento con RSV (I/R+RSV). El nivel de expresión relativa de mRNA en la corteza frontoparietal en el hemisferio ipsilateral (IP) se determinó por RT-PCR en tiempo real. Se realizó un análisis de varianza Anova de una vía Tukey A) **GLUT1**: * $P < 0.05$ vs I/R B) **GLUT3**: * $P < 0.05$ vs. I/R ; ** vs I/R+ VH; ** vs CT RSV; C) **GLUT4** * $P < 0.05$ vs. CT; ** vs I/R .

5.2 Expresión del mRNA de los GLUT's a 2hI/4hR en corteza cerebral.

Existen reportes que muestran que la proteína de los GLUT's en corteza cerebral tienden a aumentar a 4 horas después del trauma isquémico, principalmente GLUT3. Este aumento de la expresión después de un trauma es parte de una respuesta de estrés neuronal, que pueden implicar el aumento de la glucólisis neuronal y metabolismo de la energía asociada al proceso de reparación (Hamlin et al. 2001). Por lo tanto, decidimos evaluar si la isquemia activa una respuesta similar en la expresión de los GLUT's 1, 3 y 4 en ratas sometidas a 2hI/2hR, y posteriormente determinar el efecto del RSV.

En el grupo control, observamos que la administración del RSV indujo un aumento en la expresión del mRNA de GLUT1 en un 83% (1.8 ± 0.51), GLUT3 en un 117% (2.17 ± 0.18), mientras que GLUT4 se mantuvo en niveles basales (1.0 ± 0.04).

Por otro lado, la I/R disminuyó la expresión de GLUT1 (0.23 ± 0.01), GLUT3 (0.45 ± 0.04) y GLUT4 (0.07 ± 0.03). Esta disminución se previno en el grupo I/R+RSV tras la administración del RSV, observándose una expresión de 1.15 ± 0.37 para GLUT4, 2.41 ± 0.17 para GLUT1 y 2.97 ± 0.19 para GLUT3 (Tukey $P > 0.05$, **2hI/4hR vs IR+RSV**).

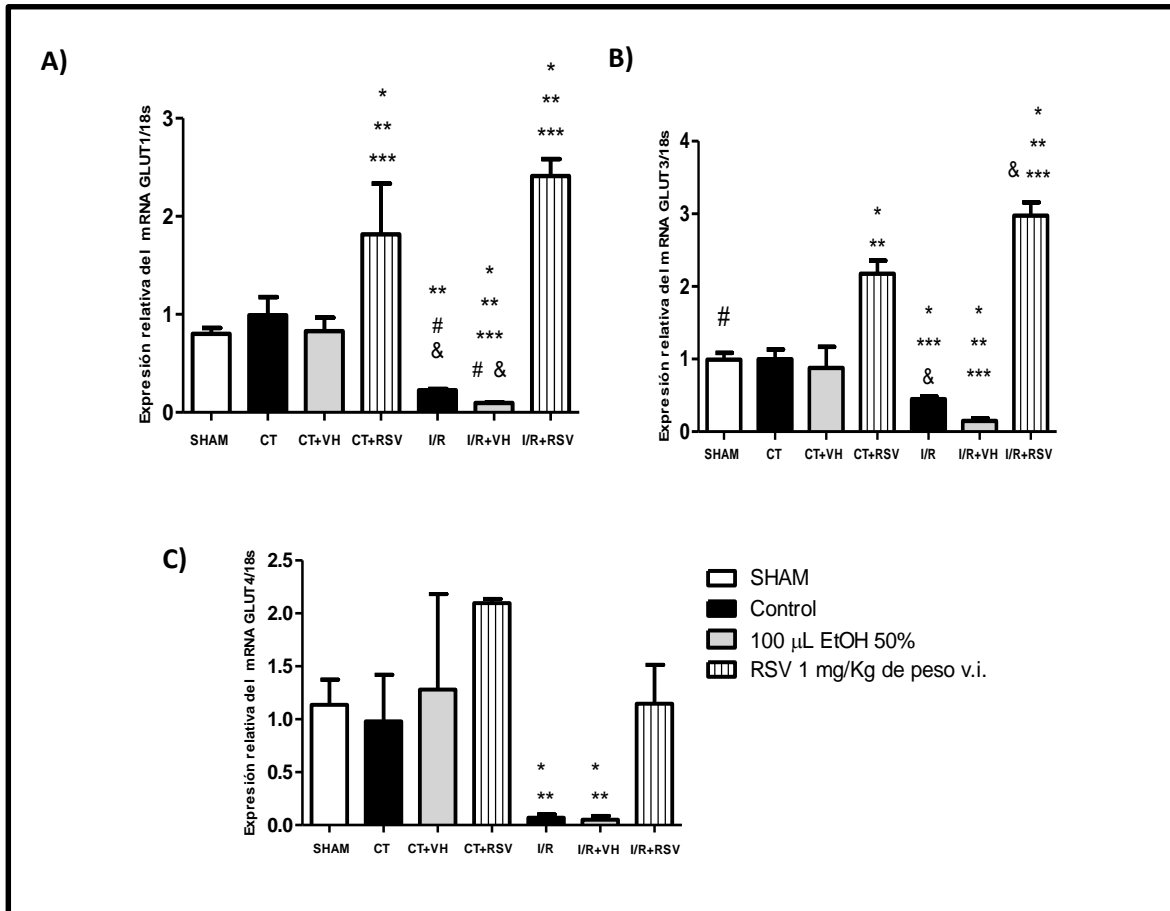


Figura 2. Efecto de la administración de RSV en la expresión relativa de los GLUT's a 2h/4hR. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar agrupados en dos categorías 1) Control: animales con cirugía pero sin oclusión de la arteria cerebral (SHAM), animales sin ningún tipo de tratamiento (CT), animales control tratados con etanol utilizado como vehículo (CT+VH), control tratados con RSV (CT+RSV); 2) Experimental, animales sometidos a 2 horas de isquemia y 4 horas de reperfusión (2h/4hR) por oclusión de la arteria cerebral media, sin ningún tratamiento (I/R), , animales con I/R tratados con vehículo (I/R+VH) y con tratamiento con RSV (I/R+RSV). El nivel de expresión relativa de mRNA en la corteza frontoparietal en el hemisferio ipsilateral (IP) se determinó por RT-PCR en tiempo real. Se realizó un análisis de varianza Anova de una vía Tukey A) **GLUT1** *P < 0.05 vs SHAM, ** vs CT, *** vs CT+VH, # vs CT+RSV, & vs I/R+ RSV. B) **GLUT3** #P < 0.05 vs SHAM, ** vs CT, ** vs CT+VH, *** vs CT+RSV, & vs I/R+ RSV. C) **GLUT4** *P < 0.05 vs I/R, ** vs CT+RSV.

5.3 Expresión del mRNA de los GLUT's a 2h/24hR en corteza cerebral

Se ha reportado que el RSV presenta efecto neuroprotector al reducir el área de infarto después de un tiempo de R prolongado (i. e. 24 horas) (Li et al. 2011; Li et al. 2010). Por lo tanto decidimos determinar si la administración de RSV al inicio de la R tiene un efecto sobre la expresión de los GLUT's después de 24 horas de R.

Observamos que en el grupo sometido a I/R, la expresión de los 3 transportadores se mantuvo por debajo de los niveles basales. La expresión de GLUT1 (1.10 ± 0.13) un 89%, GLUT3 (1.16 ± 0.22) un 83% y GLUT4 (0.03 ± 0.03) un 96% comparado con el CT. Por otro parte, la administración del RSV exacerbó la disminución causada por la I/R en la expresión del mRNA de GLUT1, GLUT3 y GLUT4. Este mismo efecto, es decir la inducción de una disminución en la expresión de los GLUT's, se observó en los grupos CT tratados con el VH [GLUT1 (0.02 ± 0.00), GLUT3 (0.08 ± 0.11) y GLUT4 (0.04 ± 0.05)] y el RSV [GLUT1 (0.21 ± 0.35), GLUT3 (0.16 ± 0.27) y GLUT4 (0.07 ± 0.10)].

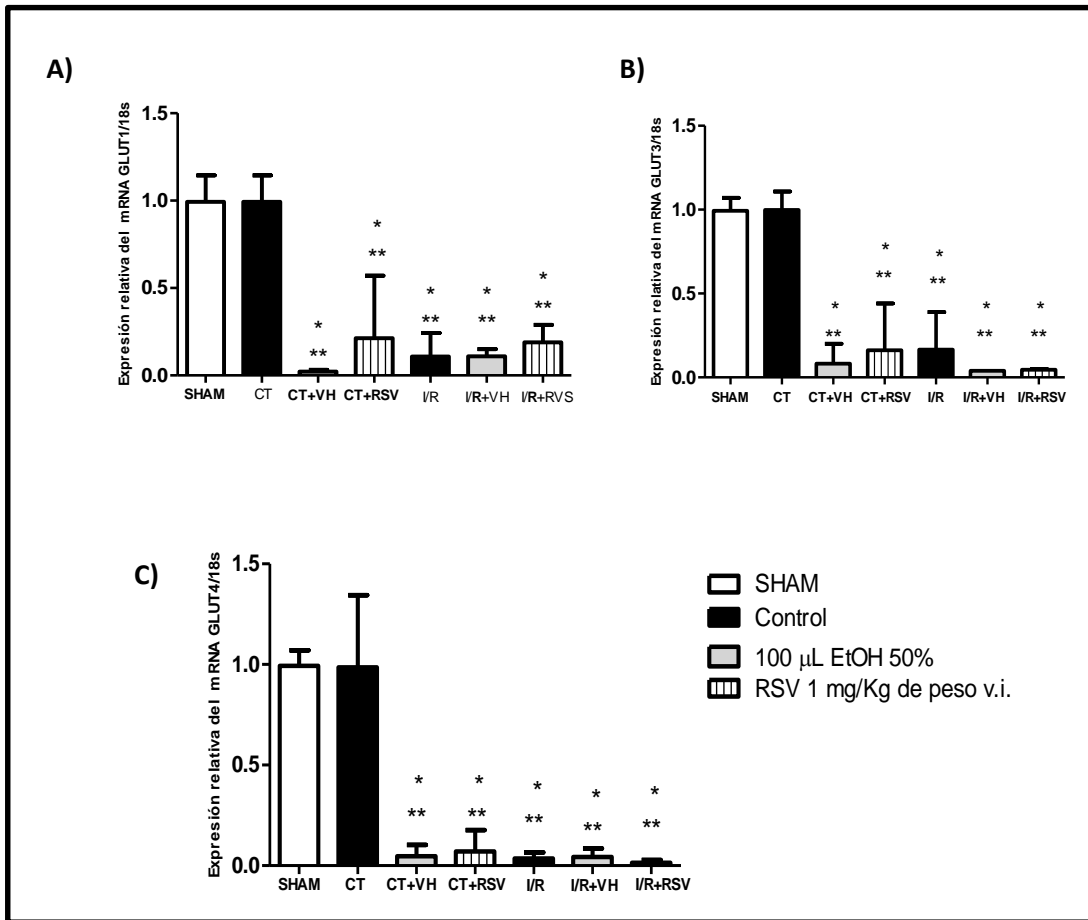


Figura 3. Efecto de la administración de RSV en la expresión relativa de los GLUT a 2h/24hR. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar agrupadas en dos categorías 1) Control: animales con cirugía pero sin oclusión de la arteria cerebral (SHAM), animales sin ningún tipo de tratamiento (CT), animales control tratados con etanol utilizado como vehículo (CT+VH), control tratados con RSV (CT+RSV); 2) Experimental, animales sometidos a 2 horas de isquemia y 24 horas de R (2h/24hR) por oclusión de la arteria cerebral media, sin ningún tratamiento (I/R), animales con I/R tratados con vehículo (I/R+VH) y con tratamiento con RSV (I/R+RSV). El nivel de expresión relativa de mRNA en la corteza frontoparietal en el hemisferio ipsilateral (IP) se determinó por RT-PCR en tiempo real. Se realizó un análisis de varianza Anova de una vía Tukey A) **GLUT1** *P < 0.05 vs SHAM, ** vs CT. B) **GLUT3** *P < 0.05 vs SHAM, ** vs CT. C) **GLUT4** *P < 0.05 vs SHAM, ** vs CT.

5.4 Capacidad antioxidante del etanol

Para determinar si el efecto del EtOH en la regulación de la expresión de los GLUT's pudiera estar relacionada con su actividad antioxidante; realizamos ensayos enzimáticos para medir su capacidad de atrapamiento de radical peroxilo y anión superóxido empleando el método ORAC (Oxigen Radical Absorbance Capacity) y el método xantina oxidasa respectivamente. Se utilizaron diluciones en concentraciones decrecientes de EtOH del 100 al 4.2% (16-2.1 mMol).

El etanol fue capaz de captar radical peroxilo (Figura 4) y anión superóxido (Figura 5) El mayor efecto se observó a una concentración de 16 mMol y por debajo de 2.1 mMol se perdió su capacidad para atrapar radicales. El efecto fue evidentemente dosis-dependiente, entre más concentrado se encuentre el etanol, mayor será su capacidad para atrapar ERO's.

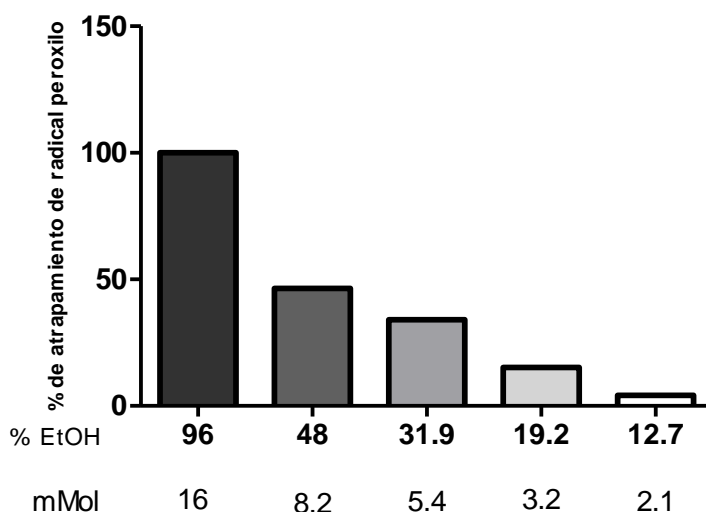


Figura 4. Porcentaje de atrapamiento de radical peroxilo. Se realizó el método ORAC a partir de diluciones en concentraciones decrecientes para determinar la capacidad antioxidante del etanol.

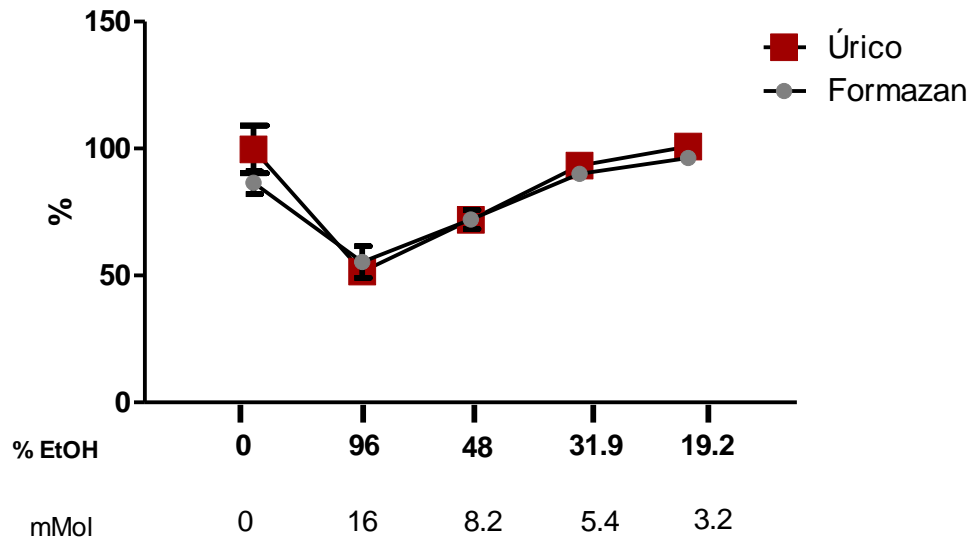


Figura 5. Porcentaje de atrapamiento de anión superóxido. Se utilizó el sistema Xantina Oxidasa para determinar la capacidad antioxidante del etanol a través del porcentaje de formación de úrico y formazán, a partir de soluciones en concentraciones decrecientes de etanol.

6. DISCUSIÓN

La I/R afecta la expresión del mRNA de los GLUT's en corteza frontoparietal

Nuestros resultados mostraron que la I/R provoca alteraciones en el nivel de expresión del mRNA de los GLUT's, en la corteza frontoparietal ipsilateral a la lesión. Este resultado podría estar asociado con las alteraciones observadas en la utilización de glucosa en el cerebro y en el metabolismo energético durante la isquemia.

En nuestro estudio, la expresión de GLUT1 a **2hI/2hR**, aumentó **hasta 1.78 veces** en relación al grupo CT, pero no la expresión de GLUT3 y GLUT4; esto puede deberse a la tasa de recambio de los transportadores, ya que GLUT1 presenta una tasa de recambio mayor requiriendo por lo tanto una mayor síntesis de *novo*. Según lo observado en células musculares sometidas a una demanda energética prolongada de 18 horas, cuando las células se exponen continuamente a 2,4-dinitrofenol (**DNP**), un desacoplante de la fosforilación oxidativa, aumenta el nivel de mRNA GLUT1, pero no de GLUT3 (Khayat et al. 1998).

Nuestros resultados muestran que tanto GLUT3 como GLUT4 son sensibles a I/R ya que tienden a aumentar su nivel de expresión en ratas pertenecientes al grupo 2hI/2hR; sin embargo muestran una respuesta tardía o una menor sensibilidad a la isquemia. Es probable que la respuesta de GLUT3 y GLUT4 esté condicionada por la respuesta de GLUT1, es decir; que para que GLUT3y 4 se activen necesitan la glucosa que GLUT1 es capaz de atrapar, ya que. es el principal transportador en la barrera hematoencefálica, y participa en la captura de glucosa desde la sangre y la transporta hacia las neuronas (Takahashi et al. 2013).

El aumento en la expresión de los GLUT's a tiempos cortos de R (2hI/2hR) se interpreta mejor en el contexto de las alteraciones e interacciones moleculares que ocurren dentro de la célula debido a la falta de oxígeno. Por ejemplo, el cambio en el nivel de expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 puede estar influenciado por el Factor inducible por Hipoxia (**HIF-I**). Este factor es capaz de regular de la expresión de los GLUT's en condiciones de hipoxia/isquemia (Chavez & Lamanna 2002; Agrawal et al. 2007). Se ha demostrado que HIF-1 α se acumula en la primera hora de

recuperación después de isquemia global transitoria inducida en corteza cerebral (Chavez & Lamanna 2002) y que el mRNA de HIF-1 α se induce en la corteza adyacente al núcleo isquémico después de un infarto (Sharp et al. 2000). Entonces el incremento que observamos en la expresión de los GLUT's puede considerarse como una respuesta aguda a la falta o disminución en la concentración de oxígeno que ocurre durante la isquemia. Por otro lado se ha propuesto que el cambio en la expresión del mRNA puede estar asociado con el aumento en los requerimientos de energía necesarios para restablecer gradientes iónicos de membrana e iniciar mecanismos de reparación celular. Por ejemplo, en la región de penumbra las neuronas son capaces de repolarizarse solo a expensas de un mayor consumo de energía (Dirnagl et al. 1999). Según Hamlin et al. (2001). La proteína GLUT3 aumenta al menos 3 veces en corteza cerebral 4 horas después del trauma isquémico, lo que podría representar un incremento en la proteína de los GLUT's a estos tiempos en nuestro modelo.

Nuestro estudio mostró que a **4 horas de R** el nivel del mRNA de los tres GLUT's disminuye dramáticamente por debajo del nivel basal. En la literatura se reporta que el nivel del mRNA de GLUT3 aumentan 3 veces en la corteza cerebral, 4 horas después de R inducida por isquemia hipóxica cerebral en un modelo de conejo (Devaskar et al. 1999); en el mismo estudio evaluaron la similitud de la secuencia de GLUT3 de pulmón de ratón con especies como ratón, rata y humano encontrando que la secuencia del péptido GLUT3 de conejo exhibe una homología del 82-84% con otras especies en la región codificante con un 62-89% de identidad en la región 3' no codificante; lo que podría conferirle mayor susceptibilidad a isquemia. Sin embargo, nosotros proponemos que la disminución crítica en el nivel de mRNA de los GLUT's a 2h/4hR es ocasionada por el restablecimiento del flujo sanguíneo ya que bajo condiciones de normoxia (concentraciones de O₂ ~20-50 mM) HIF-1 reduce su vida media a 5 min y es degradado vía proteosoma (Semenza 2000) impidiendo que el complejo proteínico HIF-1 se pegue al promotor y se expresen los GLUT's. Por otro lado, se ha demostrado que el mRNA tanto de GLUT1 como de GLUT3 disminuyen con el aumento de los niveles de glucosa en sangre (Wei-kai et al. 2007).

El mismo comportamiento se observó para el mRNA de GLUT4, el cual disminuyó desde las 4 horas de R y se encontró en niveles por debajo del nivel basal aún después de 24 horas. A diferencia de GLUT1 y 3, no existen reportes que indiquen que GLUT4 es regulado por HIF; sin embargo esta disminución en el nivel de GLUT4 se puede deber a la oxidación de proteínas nucleares y su capacidad reducida de unión al DNA específicamente a la secuencia IRE en el promotor del gen SLC2A4; en relación a esto podemos sugerir que la disminución de GLUT1 y 3 también se puede ver afectado por este proceso que no específico para GLUT4. Pessler et al. (2001) describieron que tras la exposición de adipositos a H₂O₂ durante 4 horas se observa la disminución del mRNA de GLUT4, Por ello sugerimos que el estrés oxidante provocado por la I/R provoca la oxidación de diversas moléculas (e. g. factores de transcripción) impidiendo que lleven a cabo su función y por lo tanto se vea afectada la transcripción.

En resumen, la I/R afecta la expresión del mRNA de los GLUT's. La magnitud de estos cambios difiere dependiendo del tipo de transportador y del tiempo de R. Se sugiere que el aumento en la expresión de GLUT1 a horas tempranas de R se debe a que es el parte clave en la captura de glucosa en el cerebro por encontrarse en la barrera hematoencefálica, además de su presencia en la membrana de astrocitos, en donde se favorece la formación de lactato el cual es internalizado por la neuronas y utilizado como sustrato energético (Takahashi et al. 2013). Por otro lado, GLUT3 está involucrado directamente en la entrada de glucosa en las células neuronales. Los estudios realizados han demostrado que GLUT4 se expresa en cerebro; sin embargo el presente estudio muestra que también es afectado por la I/R, probablemente en un proceso dependiente de estrés oxidativo.

Estudios realizados en células madre neuronales demostraron que el estrés inducido por 24 horas de hipoxia promueve el incremento en la expresión de los transportadores de glucosa cerebral GLUT1 (hasta 1.4 veces) y GLUT3 (hasta 10 veces) (Maurer et al. 2006), este proceso es denominando "sobre regulación compensatoria".

Efecto del RSV sobre expresión del mRNA de los GLUT's en corteza frontoparietal

Con objetivo de limitar el daño cerebral, el uso de estrategias terapéuticas intenta interferir en las múltiples alteraciones bioquímicas y moleculares secundarias a la isquemia. Varios mecanismos de daño neuronal se han propuesto, incluyendo excitotoxicidad, estrés oxidante e inflamación. Tras la isquemia y especialmente tras la R, la producción de radicales libres y ERO's sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes endógenos (Peters et al. 1998). Es por ello que en los últimos años se ha centrado la atención en el uso de los compuestos antioxidantes, tales como el RSV, como potencial para el tratamiento del daño por I/R (Li et al. 2011; Shin et al. 2010). Los antioxidantes además de disminuir el daño inducido por las ERO's, podrían estar participando en la regulación de vías de supervivencia al disminuir la concentración de los ERO's (Xu et al. 2012).

Nuestros resultados muestran que **2hI/2hR** provocan un aumento principalmente en la expresión de GLUT1; este aumento es regulado por la administración del RSV en el grupo isquémico. Nosotros proponemos que la expresión de GLUT1 podría deberse al efecto antioxidante de RSV el cual disminuye el nivel de ERO's propiciando la regulación de la actividad de factores de transcripción sensibles a estrés oxidante. Tal es el caso del Sp3, el cual es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que contiene secuencias ricas en G-C en su promotor (e. g. GLUT's y el receptor NMDA) a través de mecanismos mediados por estrés oxidante (Li et al. 2004; Zhao & Keating 2007). Al prevenir la degradación de Sp3, el RSV favorece su unión al DNA lo que inhibe la transcripción de los GLUT's. de manera similar a lo reportado por Ryu et al. (2003). Ellos demostraron que el estrés oxidativo induce la unión de Sp1 y Sp3 al DNA de neuronas corticales promoviendo su supervivencia, y que la adición de un antioxidante anula esta acción. Esto también coincide con lo reportado por Hota et al. (2010), quien mostró que el estrés oxidativo inducido por hipoxia manda a degradación a Sp3 vía proteasoma; de manera que Sp1 se une al DNA provocando la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA. Entonces la disminución del

mRNA de GLUT1 propiciada por el RSV a 2hI/2hR puede traducirse en neuroprotección en nuestro modelo, ya que la entrada de glucosa al inicio de la R propicia la producción de ERO's. Al modular la expresión del mRNA de los GLUT's de manera indirecta también se modula la entrada de glucosa a las neuronas.

Un mecanismo alternativo, aún no descrito pero que está relacionado con la disponibilidad de glucosa en el cerebro sugiere que la concentración de glucosa es capaz de disminuir el nivel de expresión de los GLUT's. Esta afirmación es respaldada por un estudio realizado en ratas diabéticas (inducida por la administración durante tres meses con estreptozotocina) en donde se observó que el mRNA de GLUT1 y GLUT3 de cerebro disminuye sobre todo en aquellas ratas con los niveles más altos de glucosa en sangre (16.7 mmol/L)(Wei-kai et al. 2007). Este efecto se podría simular durante la R, en donde la concentración de glucosa aumenta (Kiewert et al. 2010). Nosotros proponemos que a **2hI/2hR**, el organismo intenta responder al insulto isquémico aumentando la expresión de los GLUT's para asegurar el suministro de glucosa a las células (mediada por HIF-1 α); sin embargo la entrada excesiva de glucosa durante la R resulta nociva debido a la producción de ácido láctico por el metabolismo de la glucosa (Schurr 2002). Por lo tanto, el RSV es una alternativa para controlar la entrada de glucosa a las neuronas.

El VH (EtOH al 50%) provocó una disminución similar a la del RSV en el nivel de expresión del mRNA de los GLUT's en el grupo isquémico. Nosotros planteamos que la disminución en el mRNA de los GLUT's se debe al efecto del EtOH sobre la elongación de polipéptidos y/o modificaciones postranscripcionales de la proteína como lo sugiere Handa et al. (2000). En su estudio realizado en ratas tratadas con EtOH (3 mg/Kg de peso) vía IP sacrificadas 4 horas después de su administración, mostró que la inyección aguda del EtOH disminuye el contenido de las proteínas GLUT1 y GLUT3 en corteza cerebral. La disminución del mRNA de los GLUT's por el EtOH podría traducirse en protección, ya que el EtOH solo o como diluyente de algunas drogas tiene la capacidad de aumentar la tolerancia hipóxica en cerebro de ratones hasta un 325%. Se demostró que el EtOH al cambiar el metabolismo de los

sustratos de producción de energía hacia la utilización de la acetona minimiza la acumulación nociva de ácido láctico durante la hipoxia cerebral (Moursi et al. 1983).

Debido a que el VH mostró el mismo efecto que el RSV, decidimos determinar la capacidad antioxidante del EtOH para averiguar si el EtOH podría utilizar el mismo mecanismo que el RSV para regular la expresión de los GLUT's. Los resultados mostraron que el etanol es capaz de atrapar radical peroxilo y anión superóxido. Además, su efecto antioxidante es dosis dependiente, a mayor concentración de EtOH (96-19.2%), mayor atrapamiento de ERO's. Existen reportes que muestran que el EtOH es capaz de actuar de manera semejante al RSV al modular factores proinflamatorios en macrófagos murinos activados por endotoxinas (Yong-hong et al. 2002; Chan et al. 2000). Lo que sugiere que en nuestro modelo tanto el EtOH como el RSV podrían estar modulando la expresión de los GLUT's por un mismo mecanismo a tiempos cortos de R.

La inducción de **2h/4hR** provocó disminución del mRNA en los GLUT's por debajo del nivel basal; entretanto la administración del RSV en ratas sometidas a I/R produjo un aumento en la expresión del mRNA de los GLUT's. A pesar de existir trabajos que ponen de manifiesto la capacidad del RSV para restaurar el nivel de ATP en las células (Li et al. 2011), no se ha descrito el mecanismo específico por el cual este antioxidante logra su efecto neuroprotector. Nosotros proponemos que un incremento en el mRNA de los GLUT's se traduce en protección de acuerdo a lo reportado por Lawrence et al. (1995). Ellos observaron que el aumento en la expresión de GLUT1 mediada por vectores generados a partir del Virus del Herpes Simple previene la muerte neuronal inducida por hipoglicemia y exposición a ácido Kinolínico en cultivo mixto de hipocampo (neuronas y glia / 50:50), al aumentar la captación de glucosa. Recordemos que el metabolismo de la glucosa provee precursores para la síntesis de nucleosidos, lípidos y neurotransmisores, también permite la formación de NADH y FADH₂, necesarias para la síntesis de ATP a partir de la fosforilación oxidativa.

A diferencia de los resultados a **2h/4hR**, donde se observa que el RSV es capaz de prevenir la disminución en la expresión del mRNA causada de GLUT4 por

la Isquemia; así como aumentar la expresión del mRNA de GLUT1 y 3; el EtOH no mostró efecto sobre el nivel de expresión los GLUT's el cual se mantuvo por debajo del nivel basal. Entonces, esto nos lleva a pensar que mecanismo de acción sobre los GLUT's del EtOH y el RSV después de 4 horas de R son diferentes.

Debido a que la R genera una regulación negativa de los GLUT's, lo que llevaría a poca captación de glucosa y por lo tanto disminución del ATP necesario para la sobrevivencia de las neuronas. Concluimos que, la administración aguda del RSV y el EtOH al inicio de la R se traduce en neuroprotección en I/R, al aumentar la expresión de los GLUT's en un vía dependiente de la modulación del estrés oxidativo.

Por otro lado, el RSV no previno la disminución del mRNA de los GLUT's provocada por **2h/24hR**. Ensayos previos realizados en nuestro grupo de trabajo respaldan la acción protectora del RSV a 24 horas de R *in vivo* (Trejo-Quiñones 2013), el efecto protector visto a las 24 horas puede estar mediado por las alteraciones observadas en tiempos previos.

Tomando en cuenta la farmacocinética del RSV, podemos argumentar que la ausencia de efecto del RSV sobre la expresión de los GLUT's después de 24 horas de R se debe a su alta absorción y baja biodisponibilidad (Wenzel & Somoza 2005). Kapetanovic et al. (2011) realizaron un estudio en ratas a las cuales administró RSV (50 mg/kg de peso, vía oral) por 14 días, posteriormente midió los niveles de RSV en plasma. El primer pico en la concentración de RSV en plasma se observó a la primera hora después de su administración, un segundo pico fue obtenido a las 6 horas, las horas siguientes no fue posible detectar el RSV en plasma. Por su parte Walle et al. (2004) realizó un estudio similar; el RSV fue administrado vía intravenosa [0.2-mg (0.8mol)] en individuos sanos. La concentración más alta de RSV en plasma se obtuvo a la primera hora, las siguientes horas la concentración disminuyó. A las 24 horas es evidente una marcada disminución del RSV en plasma. La baja disponibilidad el RSV libre en plasma puede deberse a la interferencia de las proteínas del suero sobre el RSV. Al parecer, el RSV es atrapado por los constituyentes del plasma. Esta unión parece ocurrir particularmente con la albúmina.

Un análisis espectrofotométrico demostró la formación de complejos de resveratrol-albúmina por un aumento de la absorbancia. A la concentración inicial de 5 μ M, todo el RSV incubado se une a las proteínas después de 24 horas (Jannin et al. 2004).

De manera general, la isquemia aumenta los niveles de mRNA de los GLUT's a 2hR/2hI, mientras que a 4 y 24 horas de R se encuentra disminuida. A 2hI/4hR el RSV regula el nivel de expresión de los GLUT's, hasta dejarlas en el nivel del control sin isquemia. En conclusión la administración aguda del RSV al inicio de la R es capaz de regular la expresión de los GLUT's después de un evento isquémico por OACM.

7. REFERENCIAS

- Agrawal, A. et al., 2007. Normoxic stabilization of HIF-1 α drives glycolytic metabolism and regulates aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disk. *Am. J. Physiol. Cell physiology*, 293(2), pp.C621–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442734> [Accessed September 11, 2013].
- Bakirtzi, K. et al., 2009. Cerebellar neuron possess a vesicular compartment structurally and funcionally similar to GLUT4-storage vesicles from peripheral insulin-sensitive tissues. *J Neurosci*, 29(16), pp.5193–5201.
- Bielski, B., Shlue, G. & Bajuk, S., 1980. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂- and O₂·- radicals. *J Phys Chem.*, 84, pp.830–833.
- Cabrera, A.R. et al., 2008. Artículo original Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med Int Mex*, 24(2), pp.98–103.
- Cervantes, M. et al., 2013. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chem.*, 1(140(1-2)), pp.343–52.
- Chan, M.M. et al., 2000. Synergy between Ethanol and Grape Polyphenols , Quercetin , and Resveratrol , in the Inhibition of the Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 60(00), pp.1539–1548.
- Chavez, J.C. & Lamanna, J.C., 2002. Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in the Rat Cerebral Cortex after Transient Global Ischemia : Potential Role of Insulin-Like Growth Factor-1. *J Neurosci.*, 22(20), pp.8922–8931.
- Devaskar, S. et al., 1999. Effect of development and hypoxic-ischemia upon rabbit brain glucose transporter expression. *Brain Res.*, 27(1-2), pp.113–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effect++of++development++and++hypoxic-ischemia++upon++rabbit++brain++glucose++transporter+expression>.
- Díez-Tejedor, E. et al., 2001. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares . Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev. neuronal.*, 33(5), pp.455–464.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *Trends Neurosci.*, 22(9), pp.391–397.

- Durukan, A. & Tatlisumak, T., 2007. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.*, 87, pp.179–197.
- Espinoza-Rojo, M. et al., 2010. Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.*, 10(4), pp.317–25.
- Gómez, O. et al., 2010. Developmental regulation of glucose transporters GLUT3, GLUT4 and GLUT8 in the mouse cerebellar cortex. *J Anat.*, 217(5), pp.616–623.
- Grillo, C.A. et al., 2009. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-Kinase dependent. *Brain Res.*, 3(1296), pp.35–45.
- Hamlin, G.P. et al., 2001. Increased Expression of Neuronal Glucose Transporter 3 but Not Glial Glucose Transporter 1 Following Severe Diffuse Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of Neurotrauma*, 18(10), pp.1011–1019.
- Handa, R.K. et al., 2000. Glucose transporters and glucose utilization in rat brain after acute ethanol administration.pdf. *Metab. Brain Dis.*, 15(3), pp.211–222.
- Hicks, J.J. et al., 2007. Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation. *Front. Biosci.*, 12(1), pp.2029–2037.
- Hota, S.K. et al., 2010. Oxidative-stress-induced alterations in Sp factors mediate transcriptional regulation of the NR1 subunit in hippocampus during hypoxia. *Free radical biology & medicine*, 49(2), pp.178–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381604> [Accessed September 11, 2013].
- Huang, D. et al., 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.*, 50(16), pp.4437–4444.
- INEGI, 2010. *Mujeres y hombres en México 2010*,
- Jannin, B. et al., 2004. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol.* 2004 Sep 15;68(6):1113-8., 68(6), pp.1113–8.
- Kamat, D.C. et al., 2009. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.*, 15(3), pp.473–493.

- Khayat, Z.A., McCall, A.L. & Klip, A., 1998. Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased protein half-life. *Biochem J.*, 333, pp.713–718.
- Kiewert, C. et al., 2010. Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*, 2(1312C), pp.101–107.
- Kovacic, P. & Somanathan, R., 2010. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(2), pp.86–100. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2952093&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lawrence, M.S. et al., 1995. Herpes simplex virus vectors overexpressing the glucose transporter gene protect against seizure-induced neuron loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(16), pp.7447–7251.
- Li, C. et al., 2010. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochemistry international*, 56(3), pp.495–500. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026214> [Accessed November 19, 2012].
- Li, H. et al., 2011. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology*, 60, pp.252–258.
- Li, L. et al., 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem. Cell Biol.*, 471, pp.460–471.
- Li, L., 2006. *The role of reactive astrocytes in brain ischemia and neurotrauma* Till Farmor & Farfar Mormor & Morfar. Göteborg University. Available at: [https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/772/1/Ram Lizhen Li.pdf](https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/772/1/Ram%20Lizhen%20Li.pdf).
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, 79(4), pp.1431–568. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508238>.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> [Accessed November 1, 2012].
- Lopez, A. et al., 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*, 367(9524), pp.1747–1757.

- Maurer, M.H. et al., 2006. Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression. *FEBS letters*, 580(18), pp.4430–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854415> [Accessed September 11, 2013].
- Moursi, M.M., Luyckx, B. a. & D'Alecy, L.G., 1983. The role of ethanol in diluents of drugs that protect mice from hypoxia. *Stroke*, 14(5), pp.791–796. Available at: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.STR.14.5.791> [Accessed September 11, 2013].
- Moustafa, R.R. & Baron, J.-C., 2008. Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br. J. Pharmacol.*, 153 Suppl(August 2007), pp.S44–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 16, 2012].
- Nicholls, D.G. & Ward, M.W., 2000. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.*, 23(4), pp.166–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10717676>.
- Owen, P. & Johns, T., 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol*, 62(2), pp.149–60.
- Pessler, D., Rudich, a & Bashan, N., 2001. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. *Diabetologia*, 44(12), pp.2156–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11793016>.
- Peters, O. et al., 1998. Increased Formation of Reactive Oxygen Species After Permanent and Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *OLISM J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 18(1), pp.196–205.
- Röther, J., Ford, A. & Thijs, V.N.S., 2013. Thrombolytics in Acute Ischaemic Stroke : Historical Perspective and Future Opportunities. *Cerebrovasc. Dis.*, 35, pp.313–319.
- Ryu, H. et al., 2003. Transcription Factors in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(9), pp.3597–3606.
- Scahill, S.L., 2012. Resveratrol. *EScand. J. Prim. Health Car*, 4(4), p.345. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211629>.
- Schurr, A., 2002. Bench-to-bedside review: a possible resolution of the glucose paradox of cerebral ischemia. *Critical care (London, England)*, 6(4), pp.330–4. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=137460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Semenza, G.L., 2000. Expression of hypoxia-inducible factor I: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol*, 59, pp.47–53.
- Sharp, F.R. et al., 2000. Multiple Molecular Penumbrae After Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20, pp.1011–1032.
- Shin, J. a et al., 2010. Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke. *J. Neuroimmunol.*, 227(1-2), pp.93–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655115> [Accessed November 13, 2012].
- Takahashi, S., Seki, M. & Suzuki, N., 2013. Roles of metabolic compartmentalization by astrocytes and neurons in the pathophysiology and treatment of Parkinson's disease. *Brain Nerve.*, 65(12), pp.1497–508.
- Thompson, J.W., Narayanan, S. V & Perez-pinzon, M.A., 2012. Redox Signaling Pathways Involved in Neuronal Ischemic Preconditioning. *Curr. Neuropharmacol.*, 305, pp.354–369.
- Trejo-Quiñones, Y., 2013. *Evaluación del efecto protector del resveratrol y etanol en un modelo de isquemia cerebral en rata*. UNAM.
- Walle, T. et al., 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition*, 32(12), pp.1377–1382.
- Wei-kai, H.O.U. et al., 2007. Influence of blood glucose on the expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in the brain of diabetic rats. *Chin Med J*, 120(19), pp.1704–1709.
- Weisová, P. et al., 2009. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(9), pp.2997–3008. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261894> [Accessed November 7, 2012].
- Wenzel, E. & Somoza, V., 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular nutrition & food research*, 49(5), pp.472–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15779070> [Accessed October 17, 2013].
- Xu, Y. et al., 2012. Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 259(3), pp.395–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015446> [Accessed December 10, 2013].

- Yong-hong, F., Jian-ping, Z.O.U. & Xiao-yu, L.I., 2002. Effects of resveratrol and ethanol on production of pro-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages 1. *Acta Pharmacol Sin*, 23(11), pp.1002–1005.
- Yousuf, S. et al., 2008. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res.*, 1250, pp.242–253. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.068>.
- Zhao, F.-Q. & Keating, A.F., 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics*, 8(2), pp.113–28. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

8. ANEXOS

1. ADMINISTRACIÓN DEL RESVERATROL

Se preparó una solución Stock a una concentración de 10 mg/mL en etanol al 100%.

La dosis de RSV utilizada para las ratas fue de 1 mg/Kg.

1 mg RSV--- 1000 gr peso
X ₁ --- 350 gr peso de la rata

1.

X₁= 0.35 mg de RSV para una rata de 350 gr.

* Para preparara la solución stock se consideró el peso de la ratas a las que se va a administrar el RSV: 15 ratas de un peso aprox. De 350 g, entonces multiplicamos, 0.35 mg x 15 ratas = 5.2 mg (que se toman del frasco original) y que se diluyen en 525 µL de etanol al 100% para obtener una concentración final de 10 mg/mL. Una vez preparado, el stock permaneció a 4°C protegido de la luz hasta su uso.

El peso de las ratas utilizadas fue de aproximadamente 350 g, por lo que calculamos cuántos µL de solución stock de RSV necesitabamos para inyectar la dosis de 1 mg/Kg:

Dado que: el stock está a 10 mg/mL:

<u>10 mg de RSV--- 1 mL</u>
0.35 mg de RSV--- X ₂

2.

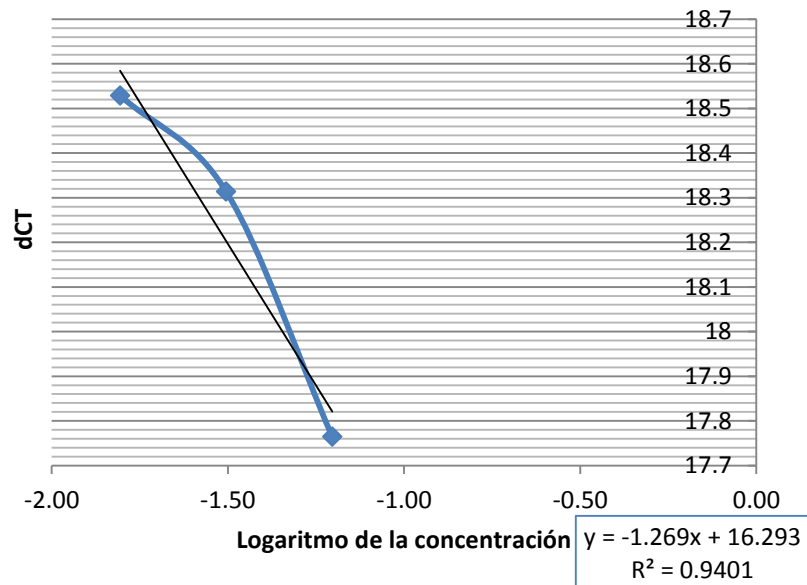
X₂= 0.035 mL del stock del stock de RSV por rata **

Los 0.035 mL del stock se encuentran en etanol al 100%, sin embargo, se deben administrar en etanol al 50%, para cumplir con esto, agregamos un volumen similar de H₂O bidestilada (H₂O-bd) (35 µL). El volumen final que inyectamos a las ratas fueron 100 µL, por lo tanto agregamos el volumen restante de etanol al 50%, (esto es 30 µL) para no alterar la concentración final de etanol. Por último, como vehículo utilizamos etanol a una concentración de 50%.

2. CURVA DE VALIDACIÓN GLUT1

Dilución	log de la concentración	CT 18S	CT GLUT1	d CT CT GLUT1- CT 18S
0,0625	-1,20	15,41	33,175	17,765
0,03125	-1,51	16,34	34,654	18,314
0,015625	-1,81	17,24	35,769	18,529

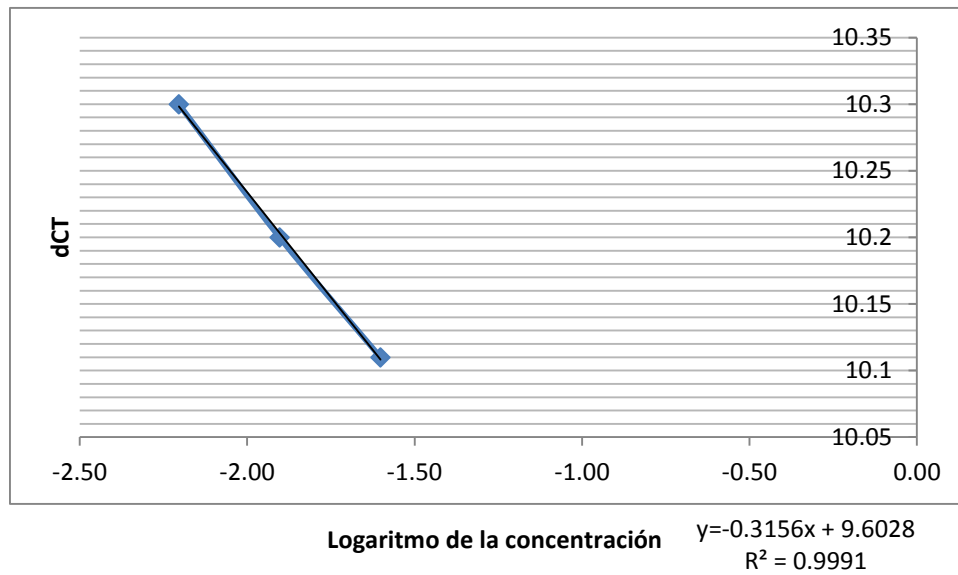
Curva de eficiencia GLUT1



3. CURVA DE VALIDACIÓN GLUT3

Dilución	log de la concentración	CT 18S	CT GLUT3	d CT CT GLUT3- CT 18S
0,025	-1,60	18.9	29.01	10.11
0,0125	-1,90	19.9	30.01	10.2
0,00625	-2,20	20.7	31.0	10.3

Curva de eficiencia GLUT3



4. CURVA DE VALIDACIÓN GLUT4

Dilución	log de la concentración	CT 18S	CT GLUT4	d CT CT GLUT4- CT 18S
0,0625	-1,20	15,41	29,81	14,4
0,03125	-1,51	16,34	30,99	14,65
0,015625	-1,81	17,24	31,94	14,7

Curva de eficiencia GLUT4

