



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“Regulación de la expresión del receptor NMDA por el  
resveratrol en isquemia cerebral *in vivo*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

**Q.B.P. Ana Lilia Cerón Silva**

**Director de Tesis:**

**Dr. Alejandro Millán Vega**

**Co-Directora:**

**Dra. Penélope Aguilera**

Chilpancingo, Gro., Octubre de 2013.

[ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS]

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Especializada en Microbiología 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 del:

Dr. Alejandro Millán Vega

La Co-dirección de la:

Dra. Penélope Aguilera Hernández

Y la asesoría de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Dr. Donaciano Flores Robles

Durante el periodo en que la C. Ana Lilia Cerón Silva cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas fue becaria del CONACyT con número de registro: 260555. Así mismo, recibió el apoyo del Banco Santander a través del programa de Becas Santander- ECOES de Movilidad Nacional durante el periodo de Enero-Mayo del 2013.

## AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Alejandro Millán Vega*, por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis. Gracias por la oportunidad que me dio para realizar este gran proyecto y por la amistad compartida. Le deseo mucho éxito en los proyectos que sigan...

A la *Dra. Penélope Aguilera*, por todo el apoyo otorgado para la realización de esta tesis. En lo personal, quiero agradecerle por todo el conocimiento compartido durante mi estancia de investigación. Su gran comprensión y paciencia me brindaron siempre la confianza para seguir adelante. Gracias por cada momento que pasamos dentro y fuera del laboratorio. Deseo que el éxito sea siempre parte de su vida...

A la *Dra. Mónica Espinoza*, por todo el apoyo otorgado para la realización de esta tesis. Personalmente le agradezco por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por el conocimiento impartido en el aula y por darme un lugar en su laboratorio. Gracias por alentarme a continuar cuando pensé que era muy difícil hacerlo. La admiro mucho y en adelante le deseo que siga sumando logros como la gran investigadora que es...

Al *Dr. Eneas Chavelas Adame*, por su asesoría durante la realización de esta tesis. También le agradezco sinceramente por la amistad que hemos compartido en todo este tiempo. Que los logros sigan llegando a su vida...

Al *Dr. Donaciano Flores Robles*, por su asesoría durante la realización de esta tesis. Gracias también por los conocimientos compartidos en el aula y por todo el apoyo otorgado desde el principio de mi maestría...

A la *Dra. Alma Ortiz Plata*, investigadora del INNN y quien realizó la cirugía a los animales de experimentación. Gracias infinitas por su disposición y apoyo durante la elaboración de esta tesis.

A a los compañeros del laboratorio de Patología Vasculare Cerebral del INNN, por hacer mi estancia de investigación muy agradable y compartir gratos momentos...

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos de la generación 2011-2013 de la maestría; a mis compañeritos de seminario: *Any, Citlalli, Daniel, Alfredo, Luis Ángel, Lupita y Gabriel*. La pasé increíble a su lado! Les deseo todo el éxito en los proyectos que sigan.

Mis dedicatorias...

-“Te doy gracias, Señor, de todo corazón y proclamaré todas tus maravillas”- David 9:2

Gracias a **Dios** por mi vida y por permitirme un logro más.

A mis padres, **Filiberto y Lilia**; Por todo su apoyo, por su inmenso amor. No sólo han sido los mejores padres, sino también los mejores abuelos. A los dos, Gracias por toda la disposición que tuvieron para viajar conmigo y cuidar a Cami. Al final del camino, sé que mi mayor recompensa la encuentro siempre al volver a casa, con ustedes, mi familia. Los amo con todo mi ser...

A quién me alentó a seguirme superando: **Aurea Jiménez**, GRACIAS por tu infinito apoyo, porque siempre me motivaste a alcanzar la meta. Gracias por cuidarme y por supuesto por cuidar de Cami, las palabras no son suficientes para expresarte todo mi agradecimiento. Éste logro es tuyo...

A mi muy amada **Ana Camila**; Gracias mi preciosa hija por ser mi compañerita de maestría. Por todos los sacrificios que realizamos y por ser la más valiente de las dos. Mi principal motivación en la vida eres tú, pequeña y agradezco a Dios por darme la oportunidad de comenzar mis días con tu maravillosa sonrisa. Te amo hasta las estrellas...

A mi esposo, **Juan Pablo**; Gracias pequeño, por tu apoyo, tu comprensión y porque siempre me dijiste que lo lograría. El camino que ambos elegimos, no es el más fácil, pero sin duda alguna, el amor de nuestra hermosa familia nos ha mantenido en pie para continuar. Te amo mi pequeño y sé que pronto estaremos celebrando los logros que vengan.

A mi hermano, **Víctor Iván**; Gracias por todo tu apoyo también en ésta etapa, eres el mejor hermano. Y en adelante si Dios quiere, seguiremos sumando logros como la gran familia que somos. Te quiero y admiro profundamente.

A mi hermanita **Daniela**; Gracias por cuidar de Cami durante mis ausencias. Estoy muy orgullosa de ti y espero poder ser un ejemplo de superación en tu vida. Te quiero mucho nena.

Con todo mi amor para mi hermano **Jorge Gabriel**; porque sé que cuando la vida nos reúna nuevamente, te sentirás muy orgulloso de mí, tanto como yo lo estoy de ti...

A **Minerva Maldonado**; Gracias por todos tus sacrificios, por apoyarnos siempre, eres una persona admirable y un gran ejemplo de superación. Te quiero mucho.

A mi compañera y amiga **Any**; Gracias hermosa, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. En adelante deseo que logres con éxito lo que te propongas y sé que así será. Te quiero mucho Anita.

Y un enorme Gracias a aquellas personas maravillosas que forman parte de mi vida y han estado conmigo, apoyándome durante este tiempo, mi hermosa cuñada **Xochitl**, mi sobrinita **Valeria**, mi **Tía Carmelita** y mi primo **José Luis**. Son la mejor familia que pude tener. Los quiero muchísimo...

Ana Lilia Cerón Silva, Octubre 2013.

## CONTENIDO.

	Pág.
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Reactivos.....	13
Animales.....	13
Diseño experimental.....	14
Modelo de isquemia cerebral <i>in vivo</i> .....	14
Pruebas conductuales para determinar el déficit neurológico.....	15
Tratamiento.....	15
Determinación del nivel de expresión de las subunidades del receptor NMDA.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS.....	33
ANEXOS.....	39

## RESUMEN.

La pérdida neuronal asociada a la isquemia cerebral puede prevenirse al modular el estado redox celular. Un posible mecanismo de acción es la regulación de la expresión de las subunidades del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) por antioxidantes, que en consecuencia disminuyen la excitotoxicidad por glutamato.

**Objetivo:** Evaluar el efecto del resveratrol (RSV) sobre la expresión del mRNA de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR3A del receptor NMDA en isquemia cerebral.

**Métodos:** Ratas macho Wistar (250 a 350g) fueron sometidas a oclusión transitoria de la arteria cerebral media (OACM) durante 2 horas. Una dosis de RSV (1 mg/kg; i.v) diluido en 50% de etanol, se administró al inicio de la reperfusion. Se extrajo la corteza frontoparietal ipsilateral a la lesión, 2, 4 y 24 h después de la recuperación del flujo sanguíneo (reperfusion). La expresión del mRNA de las subunidades del receptor NMDA se cuantificó por PCR en tiempo real.

**Resultados:** La OACM/reperfusion indujo un incremento en el mRNA de NR1 ( $6.49 \pm 5.96$ ), NR2A ( $9.28 \pm 8.14$ ) y NR2B ( $8.34 \pm 4.08$ ) tras 2 h de reperfusion. La administración del vehículo (etanol al 50 %) disminuyó la expresión de NR1 ( $0.28 \pm 0.16$ ), NR2A ( $0.48 \pm 0.26$ ) y NR2B ( $0.34 \pm 0.30$ ) después de la isquemia/reperfusion y no se observaron diferencias significativas entre los grupos CT e I/R. El RSV indujo un incremento significativo en la expresión de NR2A a 24 h de reperfusion. **Conclusiones:** El etanol y el RSV exhiben propiedades antioxidantes, las cuales pueden modular la actividad de factores de transcripción y en consecuencia podrían regular la expresión génica de las subunidades del receptor NMDA. Además, se ha reportado que un incremento en la subunidad NR2A se correlaciona con la activación de vías de supervivencia neuronal, por lo que nuestros resultados sugieren que la administración de etanol y RSV podría conferir neuroprotección en isquemia cerebral al inducir la sobreexpresión de esta subunidad.

**Palabras clave:** Isquemia cerebral, Receptor NMDA, Resveratrol, Etanol.

## ABSTRACT.

Neuronal loss during cerebral ischemia can be prevented by modulating the cellular redox state. It has been suggested that regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits by antioxidants decrease glutamate excitotoxicity. **Objective.** The aim of the present study was to evaluate the effect of resveratrol (RSV) in NR1, NR2A, NR2B and NR3A mRNA expression after cerebral ischemia. **Methods.** Male rats (250 to 350 g) were subjected to transient middle cerebral artery occlusion (MCAO). RSV was administered (1 mg/kg; i.v; diluted in 50% ethanol) 2 h post-occlusion. Frontoparietal cortex was dissected from hemisphere ipsilateral to lesion, 2, 4 and 24 h after blood flow recovery (reperfusion). Expression of NR1, NR2A, NR2B and NR3A mRNA was analyzed by quantitative real-time PCR. **Results.** MCAO/reperfusion induced an increment in mRNA expression of NR1 ( $6.49 \pm 5.96$ ), NR2A ( $9.28 \pm 8.14$ ) and NR2B ( $8.34 \pm 4.08$ ) after 2 h of reperfusion. Administration of vehicle (50% ethanol) induced a decrease in the mRNA expression of NR1 ( $0.28 \pm 0.16$ ), NR2A ( $0.48 \pm 0.26$ ) and NR2B ( $0.34 \pm 0.30$ ) after ischemia. RSV induced an increase in the mRNA expression of NR2A at 24 h of reperfusion. **Conclusions.** It has been shown that antioxidants activate transcription factors that modulate the expression of diverse genes. This could be the mechanism by which ethanol and RSV administration was able to regulate the NMDA receptor subunits expression after MCAO/reperfusion. Additionally, previous reports indicate that the increase in the NR2A subunit correlated with activation of neuronal survival pathways. This effect could also explain the protective effect observed after antioxidants administration on the cerebral ischemia model.

**Key words:** Cerebral Ischemia, NMDA receptor, Resveratrol, Etanol.



## INTRODUCCIÓN

Se conoce como enfermedad vascular cerebral (EVC) al grupo de trastornos que afectan el sistema nervioso central como resultado de un proceso patológico de los vasos sanguíneos. Actualmente, este padecimiento constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2010), y en nuestro país, se encuentra dentro de las primeras diez causas de muerte, ocupando el cuarto y séptimo lugar en mujeres y hombres respectivamente (INEGI: Estadísticas de mortalidad, 2010).

Según su naturaleza, la EVC puede presentarse como hemorragia o como isquemia cerebral (IC), siendo esta última el tipo más frecuente (Diez-Tejedor *et al.*, 2001). La IC se produce por una oclusión transitoria o permanente de una arteria en el cerebro, ya sea por un émbolo o por trombosis local (Harukuni & Bhardwaj, 2006; Arduz & Ruiz-Franco 2012). La disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) consecuente a la obstrucción vascular se acompaña de una reducción inmediata de la actividad neurológica. Tras un periodo prolongado de IC, la lesión celular (núcleo isquémico) puede progresar hacia áreas cerebrales que al inicio de la oclusión recibían un aporte sanguíneo colateral y por lo tanto preservaban su metabolismo energético (área de penumbra) (Dirnagl *et al.*, 1999). Por ello, la reperfusión (R), es decir, la restauración oportuna del FSC, es determinante en la recuperación de las funciones celulares y prevención del daño (Pan *et al.*, 2007). El uso de trombolíticos, tiene como finalidad la lisis del coágulo que ocluye la arteria cerebral y por consiguiente la inducción de la R (León *et al.*, 2003); sin embargo, tiene una ventana terapéutica limitada (3 horas) y su administración ha sido asociada a un incremento en la producción de radicales libres (RL) producto del restablecimiento del FSC (Jordán *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 1998; Aronowski *et al.*, 1997).

El estrés oxidante debido al incremento en la producción de RL como las especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs) juega un papel muy importante en el daño cerebral postisquémico (Rodrigo *et al.*, 2005). Esta condición se ve favorecida por una serie de eventos moleculares que se inician a consecuencia

de la IC. Durante esta etapa, la pérdida del gradiente iónico transmembranal debido a la falla en la bomba de sodio-potasio ATPasa y otros intercambiadores iónicos dependientes de energía, produce despolarizaciones de la membrana neuronal. En consecuencia, se observa la liberación masiva de aminoácidos excitadores, principalmente glutamato, que activa a sus diferentes receptores. La activación de los receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales son altamente permeables a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y no se desensibilizan ante un estímulo constante, confluye en un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula que no puede ser amortiguado adecuadamente y está asociado al daño celular (Dirnalg *et al.*, 1999; Neumar, 2000; Nakamichi *et al.*, 2005).

Los receptores NMDA son proteínas integrales de membrana compuestas por al menos 4 subunidades pertenecientes a 3 subtipos (NR1, NR2A-D y NR3A-B) que se ensamblan formando un canal iónico permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  con diferentes propiedades biofísicas. Generalmente se forman heterotetrámeros integrados por las subunidades NR1/NR2, donde se localizan los sitios de unión para glicina y glutamato respectivamente (Mayer 2005; Chaffey & Chazot, 2008). Su participación como mediadores principales del daño por excitotoxicidad en IC ha sido descrita en diversos estudios (Hardingham *et al.*, 2010).

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico debido a la sobreactivación de receptores NMDA, activa a diversas enzimas como la calpaína, una proteasa que degrada proteínas del citoesqueleto y es capaz de iniciar la vía intrínseca de la apoptosis mediante el procesamiento de la proteína Bid. Mientras que la activación de calcineurina desfosforila y activa a la óxido nítrico sintasa (NOS) que es responsable de la producción de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ). Además, si se sobrepasa la capacidad de la mitocondria para amortiguar  $\text{Ca}^{2+}$ , puede inducir el desacople de la cadena transportadora de electrones, el incremento en la liberación de electrones y en la producción de anión superóxido ( $\text{O}_2\cdot$ ). Esta ERO puede posteriormente reaccionar con otras moléculas y producir el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ) (MacDonald *et al.*, 2006; Starkov *et al.*, 2004). Si

durante esta etapa no existe un control adecuado de los niveles de RL, los lípidos, las proteínas y el ADN pueden ser alterados de manera irreversible.

Sin embargo, el incremento moderado en la producción de RL puede alterar vías de la transducción de señales y la expresión génica, desencadenando procesos de adaptación neuronal (Thompson *et al.*, 2012). Por lo tanto, se ha sugerido que el uso de terapias complementarias a base de antioxidantes, administradas al inicio de la R, podría disminuir el daño ocasionados por el exceso de RL producidos en esta etapa y promover la activación de vías neuroprotectoras regulando el estado redox celular (Simonyi *et al.*, 2005).

En la actualidad, numerosos antioxidantes y neutralizantes de EROs y ERNs han sido probados y muchos han mostrado efectos protectores (Nadtochiy & Redman, 2011; Hicks *et al.*, 2007). En este sentido, diversos estudios han apoyado el alto potencial terapéutico del resveratrol (RSV), un polifenol natural con gran poder antioxidante (Gambini *et al.*, 2011), en modelos de IC *in vitro* e *in vivo* (Sun *et al.*, 2011). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, se demostró que en un modelo de IC *in vivo*, inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (OAMC), una dosis única de RSV administrada al inicio de la R previene la muerte neuronal por al menos 24 horas (Trejo-Quiñones, 2013). A pesar de la amplia evidencia experimental en torno a sus beneficios, el mecanismo de acción del RSV aún se desconoce, no obstante, existen diversos antecedentes que demuestran que los antioxidantes son capaces de regular la transcripción de diversos genes (Valko *et al.*, 2007; Mohora *et al.*, 2009).

En este sentido, un estudio realizado por Matteucci *et al.* (2011) demostró que la curcumina, un compuesto con actividad antioxidante, proporciona un efector protector contra la excitotoxicidad inducida por el receptor NMDA en un modelo *in vitro*. Se observó que la curcumina aumenta la expresión de la subunidad NR2A, provocando un incremento en la actividad de receptores NR1/NR2A a nivel de

membrana plasmática, los cuales tienen una menor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto disminuyen la entrada de éste ión a la neurona al ser activada por glutamato.

También hemos observado que el tratamiento con S-alilcisteína (SAC) es capaz de disminuir la expresión de las subunidades NR1 y NR2B en corteza cerebral inducida por 2 h I/ 2 h R en isquemia *in vivo* (Rivera-Rodríguez, 2011).

Por todo lo anterior, en este trabajo nos propusimos determinar el efecto del RSV en la regulación de la expresión de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR3A del receptor NMDA en el modelo de isquemia por OACM. Observamos, que la IC/R *in vivo* inducen un incremento importante en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA a 2 h de R, mientras que la administración del vehículo (etanol 50%) fue capaz de prevenir el incremento en estas subunidades, sin que se observaran diferencias significativas entre este grupo y el tratado con RSV. La disminución de la subunidad NR1 por el etanol podría tener un impacto sobre la funcionalidad del receptor NMDA, disminuyendo su actividad, que en IC se encuentra elevada. El efecto del etanol observado en el presente estudio, podría ser atribuible a sus propiedades como antioxidante, mismas que fueron estudiadas en nuestro grupo de trabajo (Tornes-Reyes, 2013).

Otro hallazgo importante, fue el incremento inducido sólo por el RSV en la expresión de la subunidad NR2A a tiempos largos de R (i. e. 24 h), lo que implicaría el ensamble de receptores NR1/NR2A sinápticos, que se caracterizan por permitir una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona, lo cual está asociado a la activación de vías de supervivencia neuronal. En ambos resultados es necesario evaluar si la regulación en la expresión se da también a nivel de proteína, lo cual, representaría un posible mecanismo protector por parte del RSV a través de la regulación de la actividad del receptor NMDA.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### 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® (GRIN1 (Rn01436035\_m1); GRIN2A (Rn00561340\_m1); GRIN2B (Rn00680480\_m1); GRIN3A (Rn01448549\_m1) y GRIN3B (Rn01452634\_m1), Applied Biosystem, California USA). Para el tratamiento que se aplicó a los animales de experimentación, se utilizó Resveratrol SIGMA® (No. Catálogo R5010, Saint Louis Missouri, USA).

### Animales.

Se emplearon ratas macho de la cepa wistar (280-350 g) que fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Durante el estudio los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico, a temperatura ambiente, con ciclos de 12 h luz/oscuridad. Se les proporcionó agua ozonificada y alimento (LAB DIET, exclusivo para roedores de laboratorio en etapa de mantenimiento, libre de drogas, antibióticos y estrógenos sintéticos, con formulación y nutrición constante, norma de calidad ISO-9001:2000) *ad libitum*. Durante el procedimiento experimental se siguieron las reglas de uso y manejo de animales establecido por la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a los

principios éticos para las investigaciones médicas descritos por Helsinki y sus enmiendas (Asociación Médica Mundial).

#### Diseño experimental.

Los animales fueron divididos en 7 grupos experimentales (n=4): control (CT), control + vehículo (CT/VH), control + RSV (CT/RSV), sham (SHAM), isquemia/reperfusión (I/R), isquemia/reperfusión + vehículo (I/R/VH) e isquemia/reperfusión + RSV (I/R/RSV). Los animales de los grupos I/R, I/R/VH y I/R/RSV fueron sometidos a 2 horas de isquemia. Antes de inducir la reperfusión el tratamiento fue administrado. Finalmente, los animales fueron sacrificados a los tiempos específicos de R (2, 4 y 24 horas). A los grupos control, una vez que fueron anestesiados con pentobarbital *ip.*, se le administró una dosis de etanol o RSV y posteriormente fueron sacrificados a los tiempos específicos (2, 4 y 24 horas). Se obtuvo la corteza frontoparietal del hemisferio izquierdo (lado ipsilateral a la lesión) para los ensayos de RTPCR en tiempo real.

#### Modelo experimental de IC *in vivo*.

Se utilizó un modelo de IC focal transitoria en rata que reproduce experimentalmente el tipo de infarto cerebral más frecuente en humanos (Cabrera et al., 2008). La IC focal transitoria fue producida a través del método de OACM descrito por Longa et al. (1989). Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 2%. En seguida, la bifurcación de la carótida cervical fue expuesta a través de una incisión en el cuello. Posteriormente, un monofilamento de nylon fue introducido a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida para ocluir el origen de la arteria cerebral media (ACM). Después de 2 horas, el filamento fue removido y se restableció el flujo sanguíneo. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación a los tiempos específicos de R. Posteriormente, se realizó la disección del cerebro para obtener muestras de corteza frontoparietal. El grupo sham fue sometido al mismo procedimiento quirúrgico que el grupo sometido a I/R pero sin introducir el monofilamento de nylon.

### Pruebas conductuales para determinar el déficit neurológico.

El estado neurológico de cada rata fue determinado por 2 pruebas: 1) *Flexión de la pata contralateral a la lesión*, las ratas se suspenden de la cola y la postura de los miembros delanteros es observada; las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, los animales con daño doblan la pata contralateral a la lesión; y 2) *Conducta de giro*, las ratas se sostienen por la cola y se les permite moverse libremente apoyando las patas delanteras, mientras se observa la dirección del movimiento durante 30 seg.; los animales dañados realizan al menos 5 vueltas en sentido contralateral a la lesión. Las ratas con déficit neurológico invariablemente presentan un daño por I/R inducido por la OACM.

### Tratamiento.

Se administró una dosis única de RSV al término de las 2 horas de la OACM, antes de la R, por vía intravenosa (vena coccígea, localizada en la cola de la rata). Se utilizó una solución de RSV de 5 mM en 96% de etanol, el cual es estable por 12 semanas protegido de la luz. Para su administración se diluyó hasta llegar a una concentración de etanol del 50% (Ver anexo I). La dosis de RSV (1 mg/Kg de peso) fue seleccionada con base en reportes previos que demuestran un efecto neuroprotector (Yousuf et al., 2009). Los grupos tratados con vehículo recibieron una dosis de 100  $\mu$ L de etanol al 50% *i.v.*

### Determinación del nivel de expresión de las subunidades del receptor NMDA.

*Extracción de RNA.* En todo el procedimiento se utilizó material libre de RNAsas, así como material de plástico nuevo. Para el caso del material de vidrio y material de disección, éste fue tratado durante 15 minutos con agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) y posteriormente con agua tratada con dietil pirocarbonato ( $H_2O$ -DEPC; 1 mL-DEPC/Litro de agua) (Ver anexo II). Se realizó una disección del cerebro y se extrajo la corteza frontoparietal izquierda (aproximadamente 50 mg), la cual fue depositada en un tubo eppendorf dónde previamente se agregó un 1 mL de Trizol. Posteriormente, se homogenizó mecánicamente y se adicionaron 200  $\mu$ L de

cloroformo, se agitó e incubó a T.A. 2-3 minutos aproximadamente. Inmediatamente, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C con la finalidad de eliminar las proteínas y lípidos. La fase acuosa fue recuperada y se le agregaron 0.5 mL de isopropanol para precipitar el RNA. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 x g a 4°C y se recuperó el botón de RNA, el cual se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. La concentración de RNA total fue determinada por espectrofotometría a 260 nm. Posteriormente se sintetizó DNA complementario (cDNA) a partir de 5 µg de RNA total empleando 1 µL de hexámeros (2.5 µM/50 ng) al azar y H<sub>2</sub>O-DEPC en un volumen final de 11.5 µL. Dicha mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C. En seguida se agregó: amortiguador RT 5X, dNTP's (10 mM c/u), 40 U/µL de RNAsin y 200 U/ µL de reverso transcriptasa M-MLV. La reacción fue incubada durante 1 h a 37°C. El cDNA se guardó en congelación a -20 °C hasta su uso (Ver anexo III).

*RT-PCR en tiempo real.* Durante este procedimiento se utilizó un termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems. El análisis de la expresión del RNA mensajero (mRNA) de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR3A del receptor NMDA de corteza se realizó empleando ensayos prediseñados de Applied Biosystems, que contiene oligonucleótidos sentido y antisentido en concentraciones no limitantes y sondas TaqMan® específicos. Como control interno del ensayo (control endógeno) se determinó la expresión del RNA ribosomal de la subunidad 18S, utilizando una sonda TaqMan®VIC. Todas las reacciones de PCR se realizaron por duplicado. Se incluyó un control negativo sin cDNA (NTC). Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el proveedor: 1 ciclo de 10 min. a 95°C, 40 ciclos de: 15 seg. a 95°C y 1 min. a 60°C. Se empleó un detector de PCR tiempo real (Termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems). El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Se llevaron a cabo curvas de validación (Ver anexo IV).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se ha descrito que diversas funciones celulares esenciales, tales como la expresión de genes, están fuertemente influenciadas por el equilibrio redox celular (Valko *et al.*, 2007). Así mismo, estudios han demostrado que los antioxidantes, son capaces de regular la transcripción de diversos genes incrementando o disminuyendo su expresión (Mohora *et al.*, 2009).

En este contexto, en el presente trabajo nos propusimos determinar el efecto del RSV, un polifenol natural con gran poder antioxidante (Gambini *et al.*, 2011), sobre la regulación de la expresión de las subunidades del receptor NMDA durante IC. Por lo tanto, es posible que la regulación de dichas subunidades tenga un gran impacto en la transmisión sináptica y en la supervivencia neuronal durante la I/R en el área de penumbra, motivo central del desarrollo del trabajo.

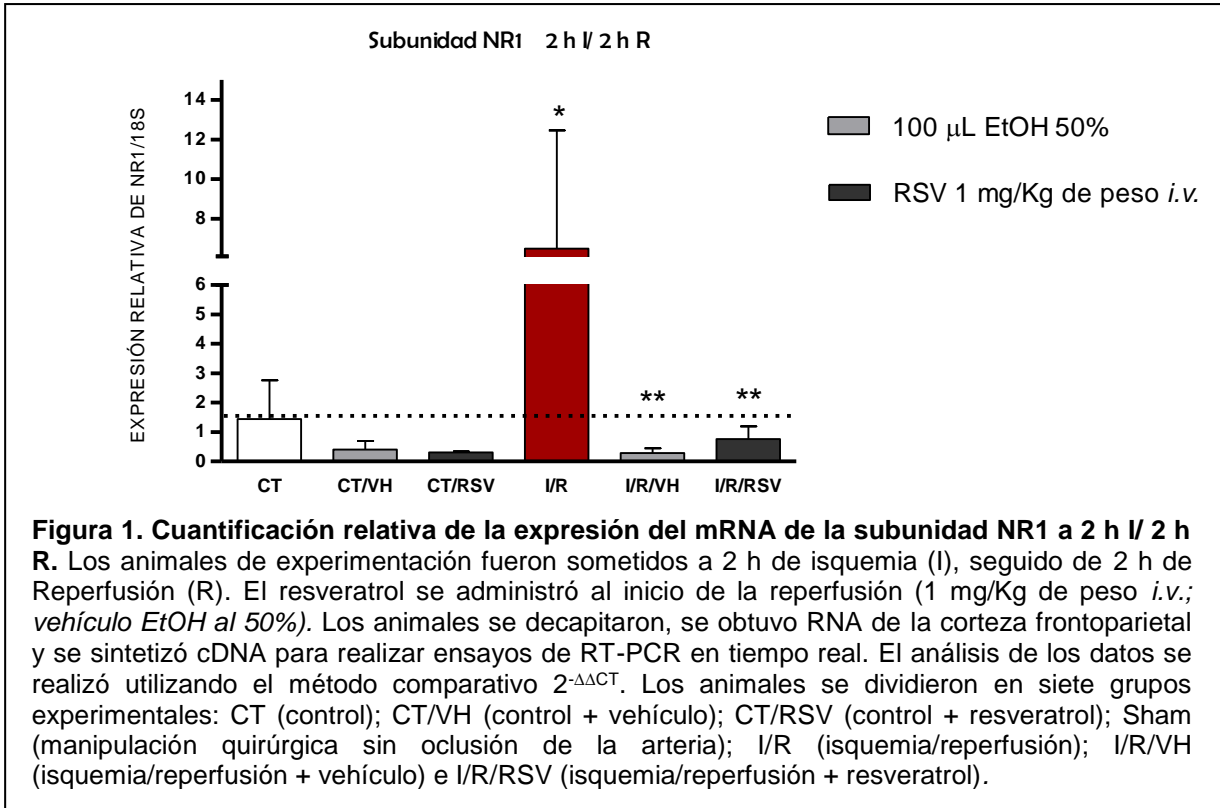
### Regulación de la subunidad NR1 por el resveratrol en IC.

Dada la importancia que tiene la subunidad NR1 en el ensamble con subunidades NR2/NR3 y el posterior transporte de receptores funcionales NMDA hacia la membrana plasmática (Wenthold *et al.*, 2003), decidimos evaluar la expresión de esta subunidad y determinar el efecto del RSV sobre la misma.

Nuestros resultados mostraron que 2 h I/ 2 h R inducen un incremento significativo en la expresión del mRNA de NR1 ( $6.49 \pm 5.96$ ) con respecto al grupo CT ( $1.44 \pm 1.32$ ) ( $P < 0.03$ , Anova Tukey). La administración de etanol y RSV indujo una disminución de la expresión de NR1 por debajo del nivel basal tanto en los grupos control [CT/VH ( $0.40 \pm 0.30$ ); CT/RSV ( $0.31 \pm 0.03$ )], como en los sometidos a I/R [I/R/VH ( $0.28 \pm 0.16$ ) e I/R/RSV ( $0.76 \pm 0.43$ )]. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ , Anova Tukey) (Fig. 1).

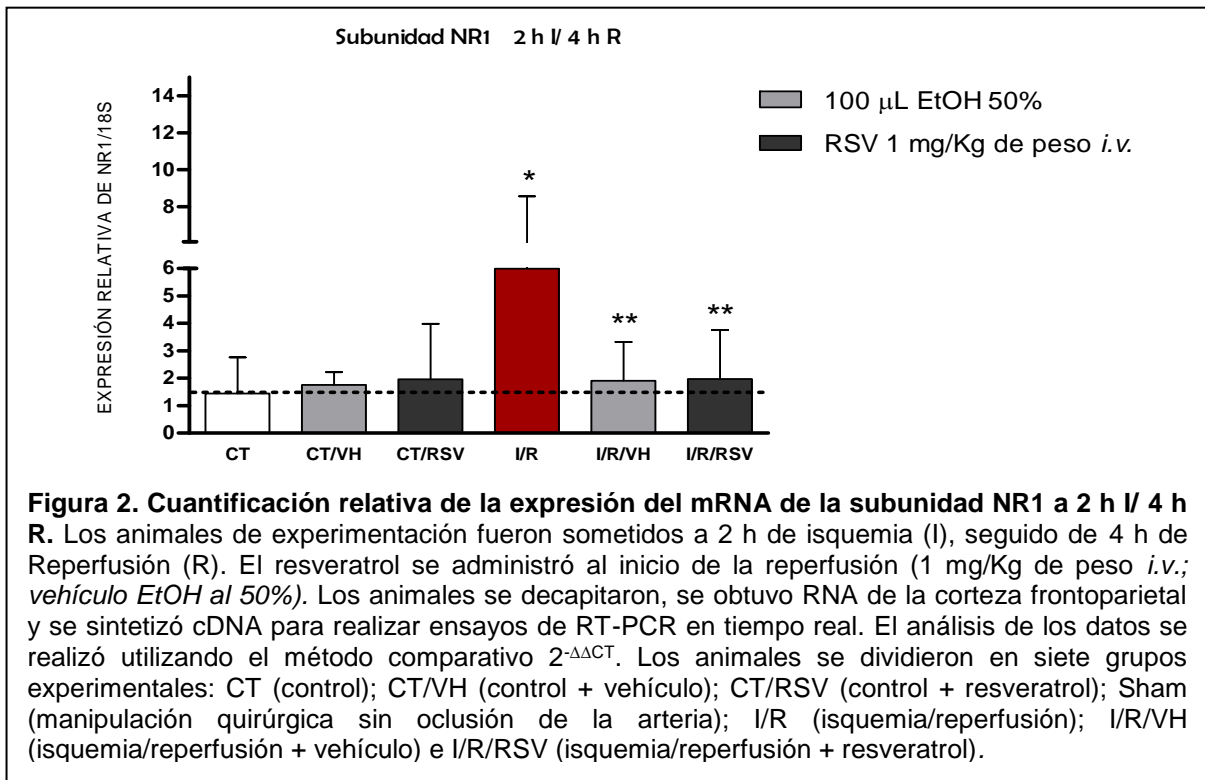
Al evaluar a 2 h I/ 4 h R, encontramos que la expresión del mRNA de la subunidad NR1 se mantiene elevada ( $6.00 \pm 2.57$ ) con respecto al grupo CT ( $1.44 \pm$

1.32) ( $P < 0.02$ , Anova Tukey). La administración de etanol y RSV disminuyó la expresión a su nivel basal tanto en los grupos control [CT/VH ( $1.8 \pm 0.5$ ); CT/RSV ( $2.0 \pm 2.0$ )], como en los sometidos a I/R [I/R/VH ( $1.91 \pm 1.41$ ); I/R/RSV ( $1.97 \pm 1.78$ )]. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con etanol y los tratados con RSV (Fig. 2).



Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con etanol y RSV disminuye la muerte neuronal a 24 h de R (Trejo Y., 2013). Por lo anterior, decidimos evaluar el efecto del tratamiento en la expresión de NR1 a 2 h I / 24 h. A diferencia de lo que observamos a tiempos cortos de R (2 y 4 h), la expresión del mRNA de NR1 regresó a su nivel basal ( $1.16 \pm 0.73$ ). A éste tiempo, la administración de etanol y RSV no produjo un cambio significativo tanto en grupos control [CT/VH ( $2.3 \pm 1.7$ ); CT/RSV ( $3.3 \pm 3.9$ )], como en los sometidos a I/R [I/R/VH ( $1.47 \pm 1.34$ ); I/R/RSV ( $2.77 \pm 1.30$ )], aunque se observa una tendencia de ambos compuestos a aumentar la expresión (Fig. 3).

En un estudio *in vitro* realizado por Gascón et al. (2005), demostraron que la exposición de neuronas corticales a concentraciones excitotóxicas de NMDA (2 h) provoca una rápida, específica e irreversible inhibición de NR1 a nivel transcripcional, la expresión del mRNA de NR1 disminuyó aproximadamente un 41%, mientras que a 4 y 8 h la disminución fue del 58 y 77% respectivamente. En el modelo de OACM realizado en el mismo estudio, se observó una disminución del mRNA de NR1 del 41 y 47 % a 2 y 4 h de R respectivamente (Gascón et al., 2005). Este estudio propone que esta disminución de la subunidad NR1 podría formar parte de una respuesta adaptativa de las neuronas para prevenir el daño por excitotoxicidad en IC. NR1 ha sido descrita como la *subunidad obligatoria* de todos los receptores NMDA, por lo tanto, cualquier disminución en su transcripción y traducción, eventualmente resultará en un número menor de receptores NMDA presente en la membrana postsináptica neuronal (Tan et al., 2009).



A diferencia de lo reportado por Gascón et al. 2005 en el estudio de IC *in vivo*, nosotros observamos que 2 y 4 h de R inducen un incremento en la expresión del

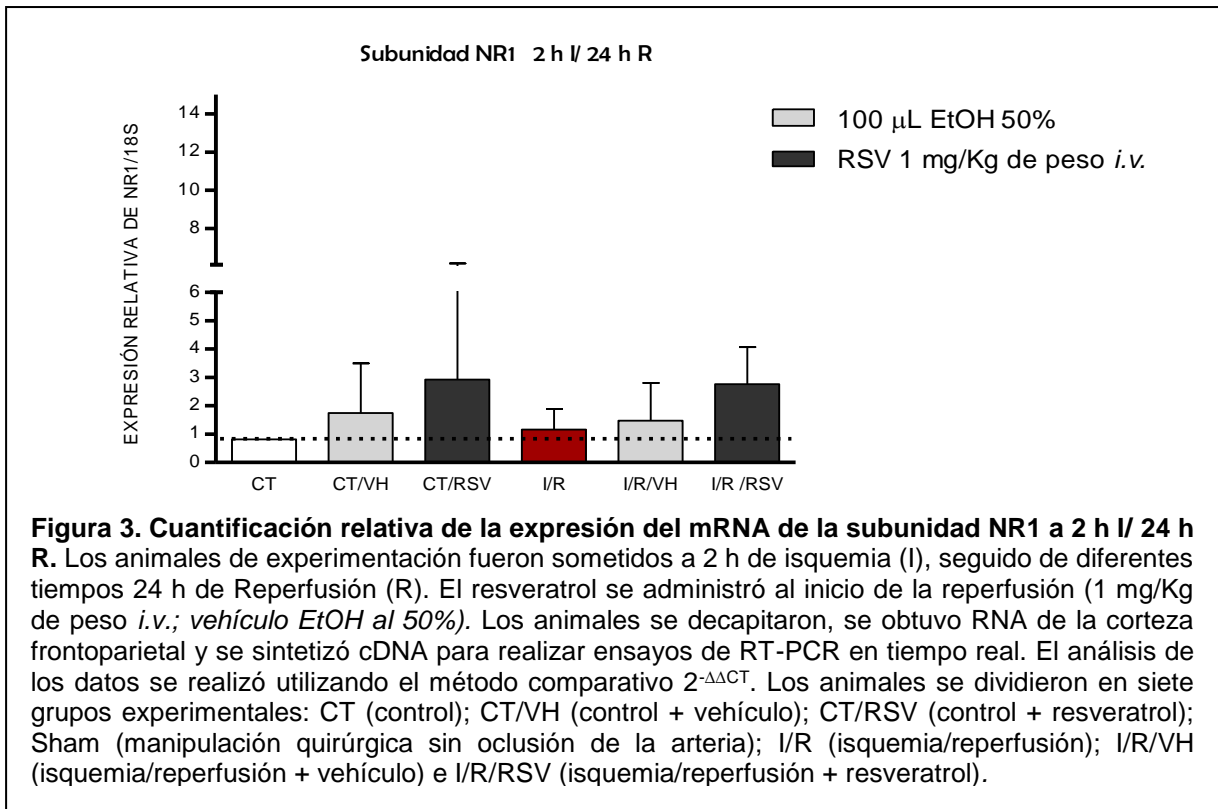
mRNA de la subunidad NR1 de entre 7 y 8 veces con respecto al grupo control. Esta diferencia de resultados, podría deberse a las condiciones experimentales empleadas, principalmente el tiempo de OACM al que fueron sometidos los animales. En nuestro estudio, inducimos la IC por 2 h, mientras que Gascón *et al.* solo utiliza 1 h, es decir empleamos un estímulo mucho más severo que probablemente impida la activación de mecanismos endógenos de protección. Cabe señalar que el tiempo tanto de IC, como de R es determinante e influye directamente en la activación de vías de señalización: mientras que estímulos moderados inducen vías de supervivencia (e.g. en el preconditionamiento isquémico), los estímulos severos activan vías de muerte (Thompson *et al.*, 2012).

El incremento en la expresión de la subunidad NR1 en respuesta a la IC podría ser uno de los mecanismos por los cuales el receptor NMDA exhibe una respuesta hiperactiva (sobreactivación) a la estimulación por glutamato en la fase aguda de la excitotoxicidad (Tan *et al.*, 2009). En nuestros resultados, el incremento de NR1 observado a tiempos cortos de R, fue revertido con la administración del etanol y el RSV.

Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición aguda a etanol es capaz de bloquear la excitotoxicidad inducida por el receptor NMDA al disminuir el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de éste (Chandler *et al.*, 1997). En nuestro estudio, las propiedades antioxidantes del etanol podrían ser la explicación del efecto observado sobre la regulación de la subunidad NR1. Respecto a lo anterior, en nuestro grupo de trabajo se demostró que el etanol es capaz de atrapar RL, entre ellos, el anión superóxido y el radical peróxilo (Tornes-Reyes A., 2013).

Con los resultados obtenidos en éste trabajo, podemos sugerir que la disminución en la expresión del mRNA de NR1 por el tratamiento con etanol, podría tener un impacto sobre la funcionalidad del receptor NMDA, disminuyendo su actividad (que en IC se encuentra elevada). Al no haber mensajero disponible para la síntesis de la proteína NR1, podría prevenirse el ensamble de receptores NMDA

funcionales (Chaffey & Chazot 2008). Sin embargo, es necesario evaluar el nivel de proteína para poder determinar el impacto fisiológico.



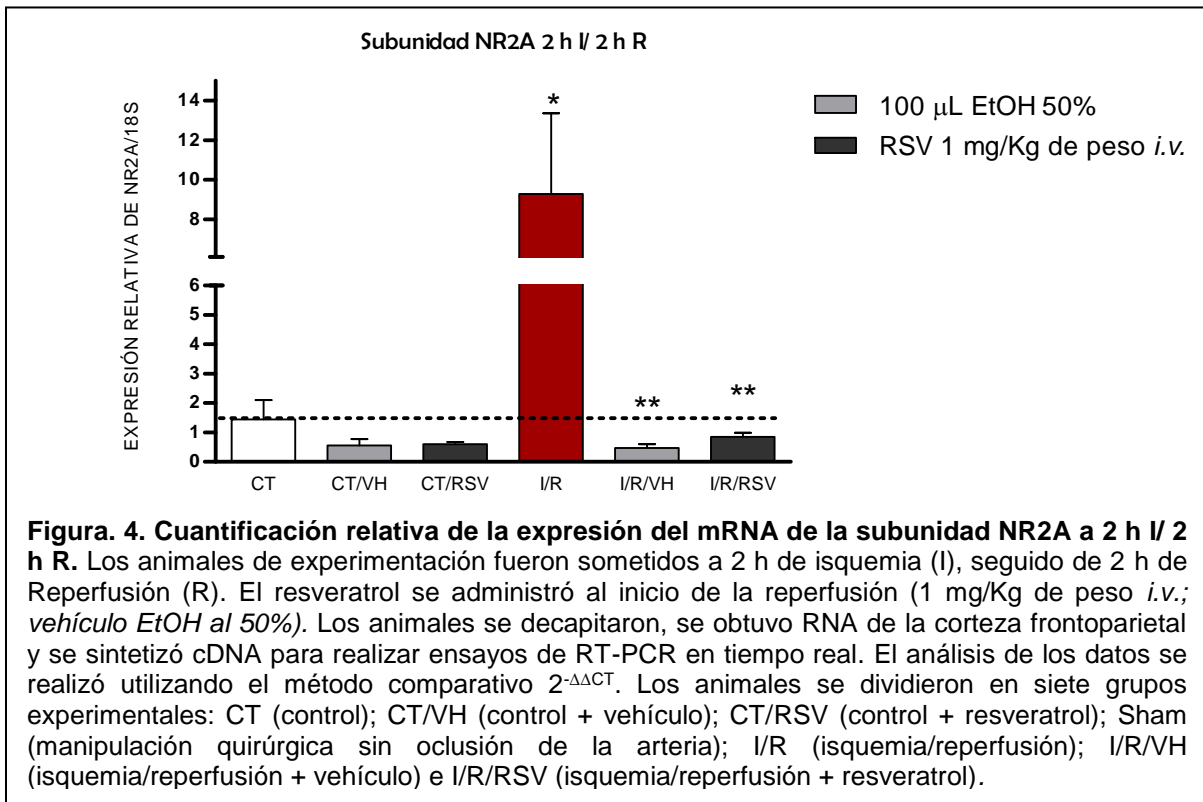
### Regulación de la subunidad NR2A por el resveratrol en IC.

El nivel en la producción de ROS/RNS es determinante en la activación de vías de señalización específicas. Se ha descrito que niveles moderados de estas moléculas, pueden inducir la expresión de genes adaptativos (Hamanaka *et al.*, 2010). En este sentido, estudios han demostrado que los antioxidantes, moléculas que neutralizan las acciones de las ROS/RNS, son capaces de regular la expresión de diversos genes, entre ellos, las subunidades del receptor NMDA (Malchiodi-Albedi *et al.*, 2011).

La subunidad NR2, es determinante en la diversidad funcional del receptor NMDA, como la sensibilidad, conductancia, cinética de desactivación y desensibilización del receptor, influyendo directamente en la duración de las corrientes postsinápticas excitadoras (Mori *et al.*, 1998; Sprengel *et al.*, 1998). Se ha propuesto

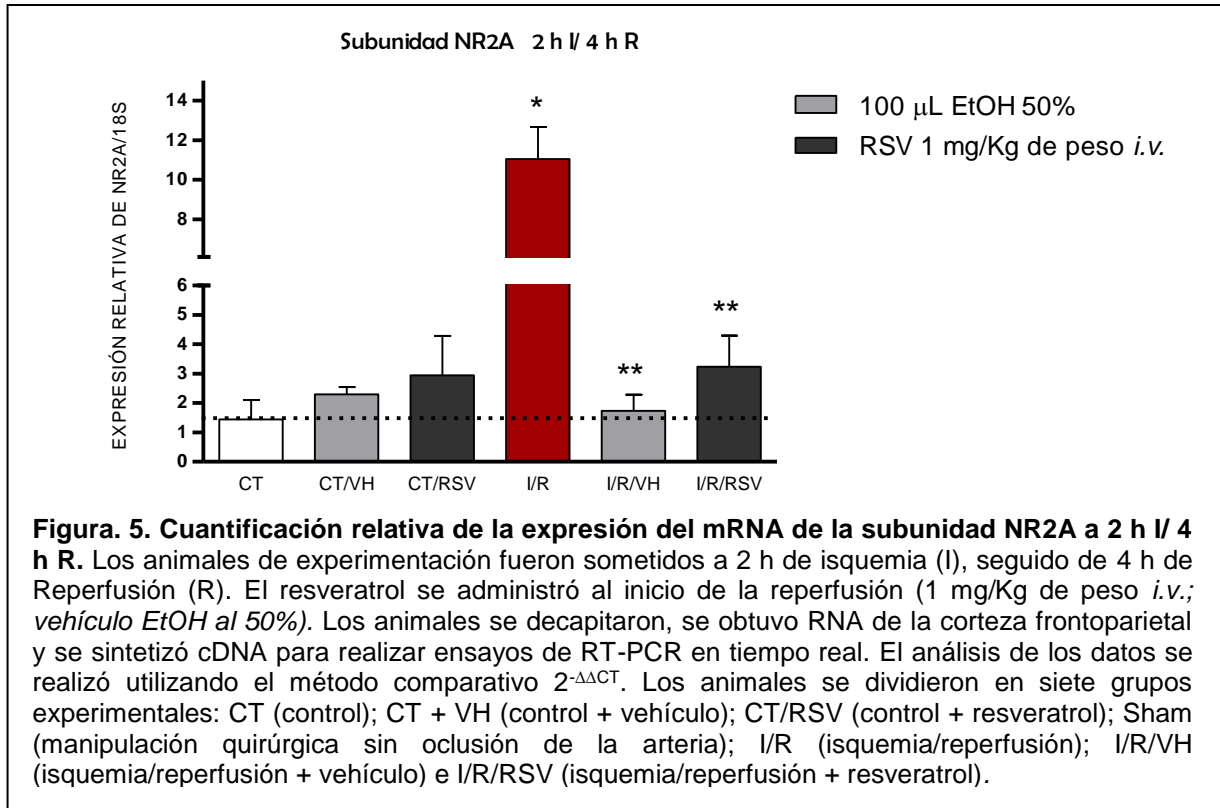
que la subunidad NR2A es capaz de activar vías de señalización que promueven supervivencia neuronal.

Por lo anterior, decidimos evaluar el efecto del RSV sobre la expresión de NR2A en ratas sometidas a 2 h de IC, seguidas de 2, 4 y 24 h de R. Encontramos que 2 h I/ 2 h R, inducen un incremento significativo en la expresión de NR2A ( $9.28 \pm 8.14$ ) con respecto al grupo CT ( $1.44 \pm 1.32$ ) ( $P < 0.01$ , Anova Tukey). La administración de etanol y RSV, disminuyó la expresión por debajo del nivel basal tanto en grupos CT [CT/VH ( $0.56 \pm 0.43$ ); CT/RSV ( $0.60 \pm 0.16$ )], como en los sometidos a I/R [I/R/VH ( $0.48 \pm 0.26$ ) e I/R/RSV ( $0.85 \pm 0.28$ )]. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 4).



A 2 h I/ 4 h R, encontramos que la expresión de la subunidad NR2A se mantiene elevada ( $11.05 \pm 3.23$ ) con respecto al grupo CT ( $1.44 \pm 1.32$ ) ( $P < 0.0001$ , Anova Tukey). El tratamiento con etanol y RSV disminuyó este incremento en el mRNA de NR2A a su nivel basal [I/R/VH ( $1.74 \pm 1.10$ ); I/R/RSV ( $3.24 \pm 2.13$ )]. En los

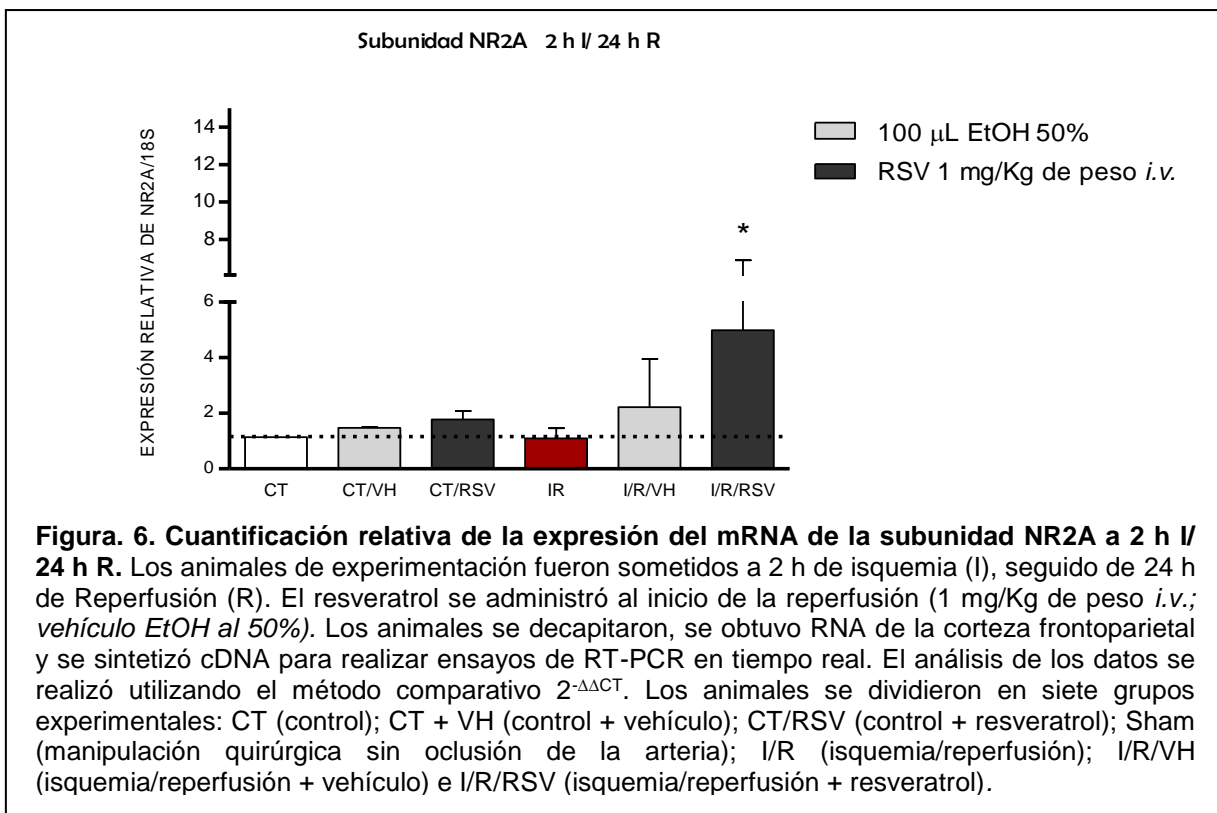
grupos control, la expresión de NR2A mostró una tendencia a incrementar después de la administración de etanol y resveratrol [CT/VH ( $2.3 \pm 0.5$ ); CT/RSV ( $2.9 \pm 2.7$ )]. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con etanol y los tratados con RSV, en condiciones normales, ni en I/R (Fig. 5).



De acuerdo a los experimentos realizados podemos determinar que las subunidades NR1 y NR2A del receptor NMDA presentaron un perfil de expresión similar al incrementarse su expresión en condiciones de I/R y disminuir con la administración de vehículo y el RSV. Este comportamiento podría estar asociado a su mecanismo de regulación a nivel transcripcional, (i.e. ambas subunidades son reguladas por factores de transcripción de la familia Sp) (Bai & Hoffman 2009). Esta familia de factores de transcripción tiene una expresión ubicua, en su estructura contiene un motivo de dedos de zinc mediante el cual se une directamente al ADN y puede activar o reprimir la transcripción de varios genes en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos (Tan & Khachigian, 2009). Se sabe que la familia de factores transcripcionales Sp se activa en presencia de estrés oxidativo (Ryu et al.,

2003), condición que en IC es persistente. Esta podría ser la razón por la cual se favorece la expresión de ambas subunidades en la fase aguda de la I/R. Sin embargo, a tiempos más prolongados de R (24 h) se desconocen los mecanismos que se encuentran involucrados en la regulación de ambas subunidades.

Por otra parte, debido a que la subunidad NR2A mostró un perfil de expresión similar al de NR1, decidimos evaluar a 2 h I/24 h R y observamos que su expresión se encontraba a un nivel basal ( $1.15 \pm 0.39$ ). La administración de etanol mantuvo éste nivel de expresión [CT/VH ( $1.16 \pm 0.62$ ); I/R/VH ( $1.14 \pm 2.14$ )]. Un hallazgo muy importante a este tiempo de I/R fue que la administración de RSV indujo un incremento en el nivel de expresión de NR2A en condiciones normales y en I/R [CT/RSV ( $2.54 \pm 2.71$ ); I/R/RSV ( $5.14 \pm 1.93$ ) ( $P < 0.03$ , Anova Tukey)] (Fig. 6).



En un estudio realizado por Malchiodi-Albedi et al. (2011) se demostró que el pre-tratamiento con curcumina (un compuesto polifenólico con capacidad antioxidante) es capaz de aumentar el nivel de la proteína de la subunidad NR2A en



cultivo primario de neuronas de retina e hipocampo expuestas a concentraciones excitotóxicas de NMDA. Esta regulación de la subunidad NR2A, modula negativamente la actividad del receptor NMDA, disminuyendo la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, lo que confiere un efecto protector contra la excitotoxicidad por glutamato. El incremento de NR2A se observó a las 6 h del pre-tratamiento con curcumina alcanzando su nivel máximo a las 24 h. Por lo observado en nuestros resultados, es probable que el etanol y el RSV puedan ejercer un efecto similar a la curcumina a tiempos largos de I/R; sin embargo, es necesario evaluar el nivel de proteína para confirmarlo.

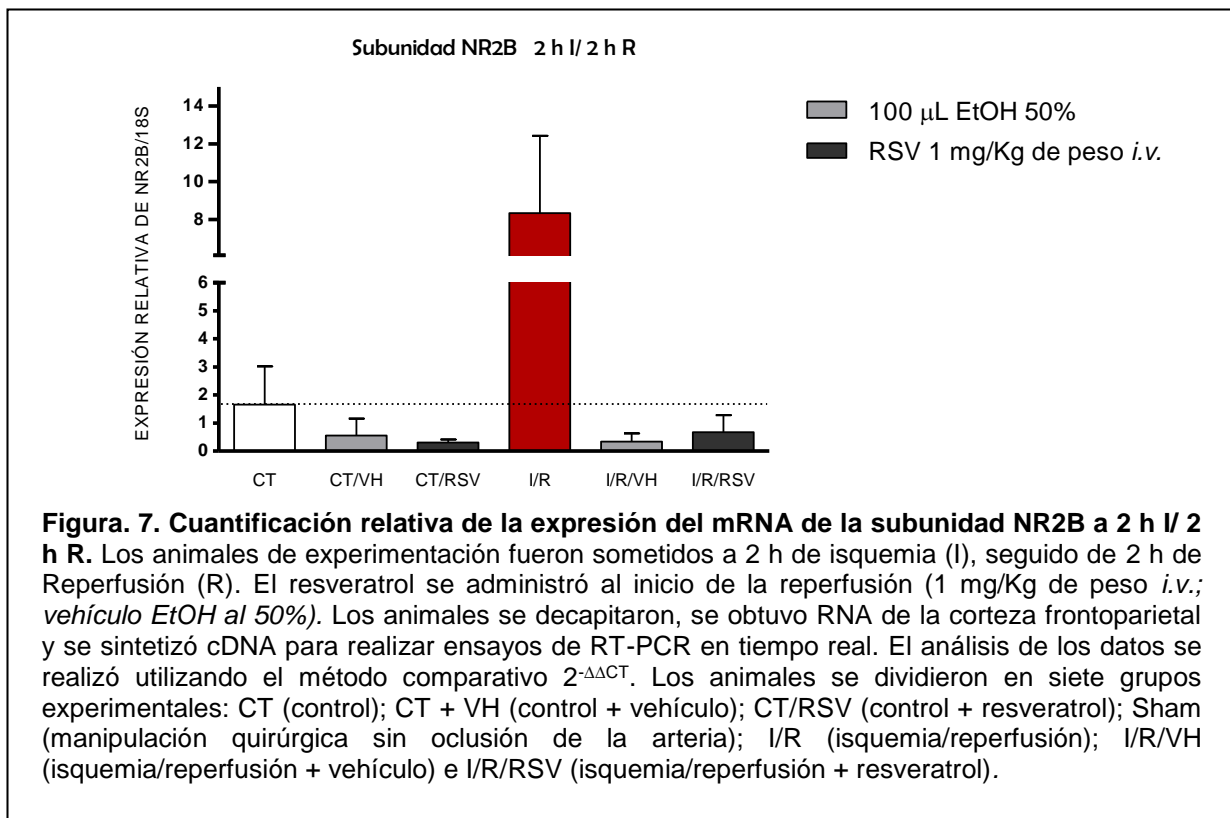
La importancia de la regulación de NR2A por el etanol y RSV, reside en que esta subunidad forma heterodímeros con subunidades NR1, los cuales se localizan principalmente en regiones membranales sinápticas. Se ha descrito que la activación de los receptores sinápticos NR1/NR2A promueve vías de supervivencia neuronal, dependientes de la activación de CREB y de la expresión del BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Hardingham *et al.*, 2002; Papadia *et al.*, 2005). Por lo tanto, es posible que la administración del etanol/RSV al inducir la sobreexpresión de la subunidad NR2A, favorezca el ensamble de receptores NR1/NR2A, con lo cual se regularía la entrada de  $Ca^{2+}$  a la neurona. Sin embargo, la regulación de la expresión del mRNA de NR2A desde tiempos cortos de I/R (i.e. 2 y 4 h) por parte del tratamiento con etanol/RSV resultaría muy importante para prevenir el daño neuronal durante esta etapa crítica.

### **Regulación de la subunidad NR2B por el resveratrol en IC.**

La subunidad NR2B del receptor NMDA, se localizan predominantemente en sitios extrasinápticos (Tovar & Westbrook, 1999; Brickley *et al.*, 2003), esta característica única permite que estos receptores sean estimulados debido a la salida excesiva (desbordamiento extrasináptico) de glutamato en el cerebro durante IC (Drejer *et al.*, 1985; Rossi *et al.*, 2000). Los receptores NMDA extrasinápticos activan vías de señalización que inducen la muerte neuronal durante la IC (Finkbeiner, 2000; Hardingham *et al.*, 2002, Takasu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007). En un estudio realizado

por Tu *et al.*, (2009), demostraron que la proteína cinasa 1 asociada a muerte (DAPK1 por sus siglas en inglés) es activada en IC y se une a la subunidad NR2B de receptores NR1/NR2B extrasinápticos vía su extremo C-terminal y la fosforila en Ser-1303. Esta interacción provoca un incremento en la conductancia a través de estos receptores, que conlleva a un influjo masivo de  $\text{Ca}^{2+}$ , condición que resulta en una muerte neuronal irreversible.

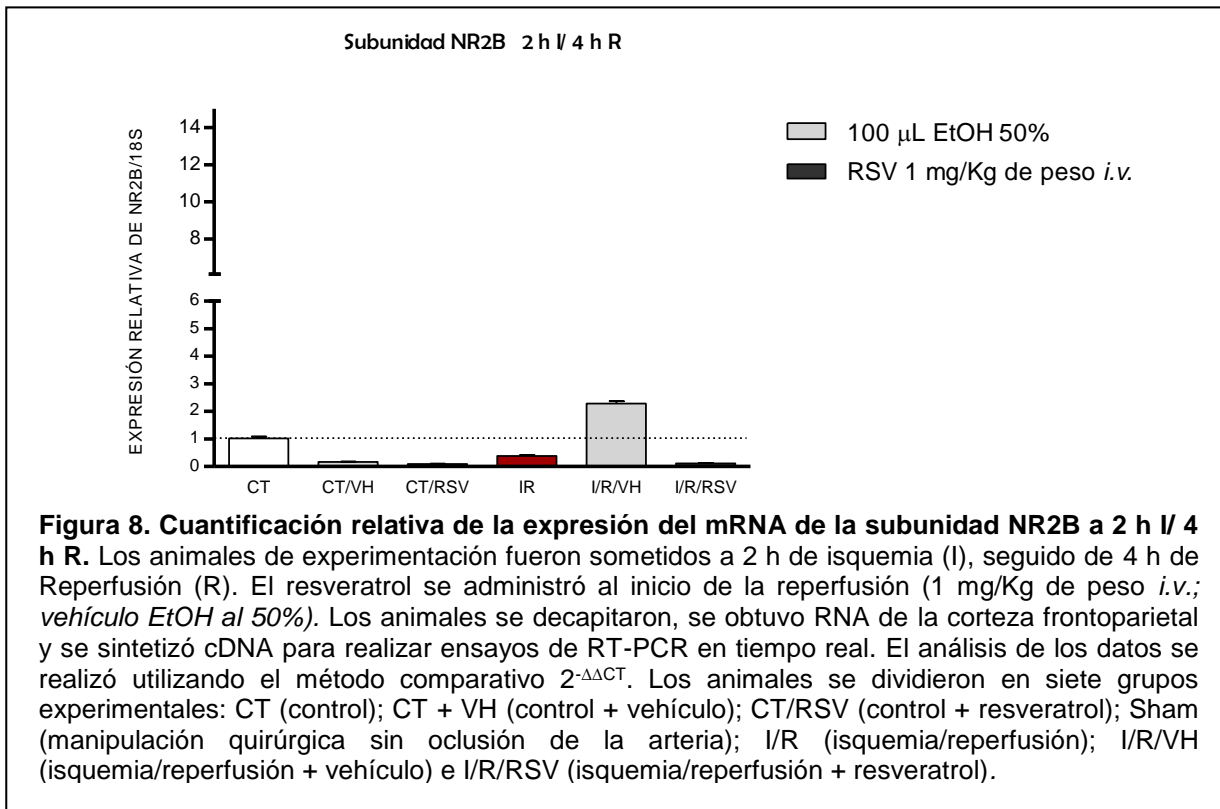
Debido a las propiedades que se le han atribuido a esta subunidad como mediador importante de daño en IC (Hardingham *et al.*, 2010), es importante evaluar su expresión y el efecto del RSV sobre la misma.



Al llevar a cabo los experimentos, encontramos que 2 h I/2 h R inducen un incremento significativo en la expresión del mRNA de la subunidad NR2B ( $8.34 \pm 4.08$ ) con respecto al grupo control ( $1.66 \pm 1.36$ ) ( $P < 0.0001$ , Anova Tukey). La administración de etanol y RSV previno este incremento disminuyendo la expresión por debajo del nivel basal en grupos control [CT/VH ( $0.56 \pm 0.60$ ); CT/RSV ( $0.31 \pm$

0.11]) y en los sometidos a I/R [I/R/VH ( $0.34 \pm 0.30$ ); I/R/RSV ( $0.68 \pm 0.60$ )]. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos administrados con etanol y RSV, en condiciones normales y en I/R (Fig. 7).

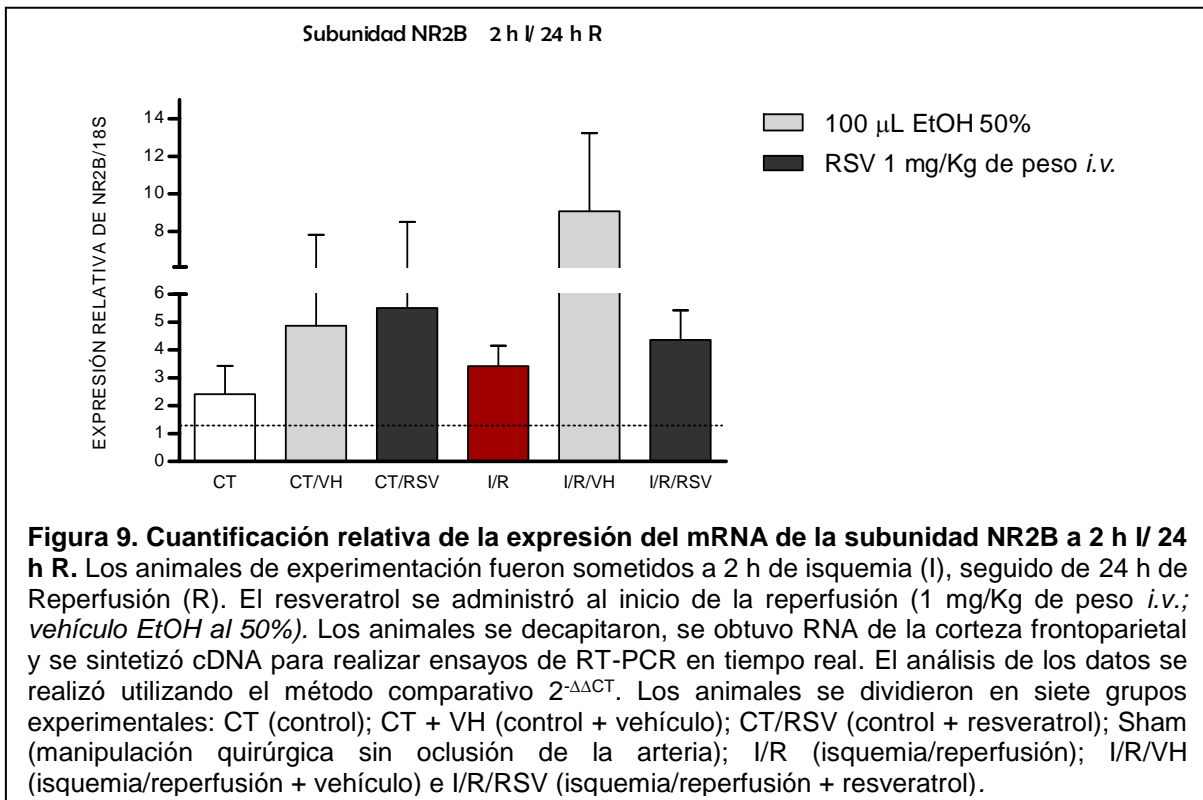
Al evaluar a 2 h I/4 h R, el nivel de expresión del mRNA de la subunidad NR2B se encontró por debajo de su nivel basal ( $0.38 \pm 0.04$ ) con respecto al grupo CT ( $1.02 \pm 0.07$ ). En los grupos control, la administración de etanol y RSV disminuyó la expresión de NR2B por debajo del nivel basal [CT/VH ( $0.16 \pm 0.02$ ); CT/RSV ( $0.09 \pm 0.01$ )]. Mientras que la administración del etanol en el grupo sometido a I/R incrementó la expresión de NR2B dos veces con respecto al control [I/R/VH ( $2.19 \pm 0.08$ ) ( $P < 0.0001$ , Anova Tukey)]. La administración del RSV disminuyó el nivel de la expresión del mRNA de la subunidad NR2B por debajo del nivel basal en el grupo sometido a I/R [I/R/RSV ( $0.12 \pm 0.01$ )] (Fig. 8).



De acuerdo a lo reportado por Liu *et al.*, (2010), el nivel de expresión del mRNA de NR2B se incrementa durante las primeras horas de la IC y posteriormente

va disminuyendo hasta llegar a su nivel basal. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con etanol/RSV es capaz de disminuir la expresión de esta subunidad desde la 2 h de I/R, lo cual podría prevenir el ensamblaje de receptores NR1/NR2B que se han asociado a la activación de vías que desencadenan la muerte neuronal.

Por otra parte, a 24 h de R, la expresión del mRNA de la subunidad NR2B se mantuvo cercana al nivel basal ( $3.4 \pm 0.7$ ). La administración de etanol y RSV indujo un incremento en la expresión de NR2B en los grupos control y en los sometidos a I/R [CT/VH ( $4.9 \pm 2.9$ ); CT/RSV ( $5.5 \pm 3.0$ )]. No se observaron diferencias significativas entre los grupos I/R/VH ( $9.1 \pm 4.16$ ) e I/R/RSV ( $4.4 \pm 1.1$ ) (Fig. 9).

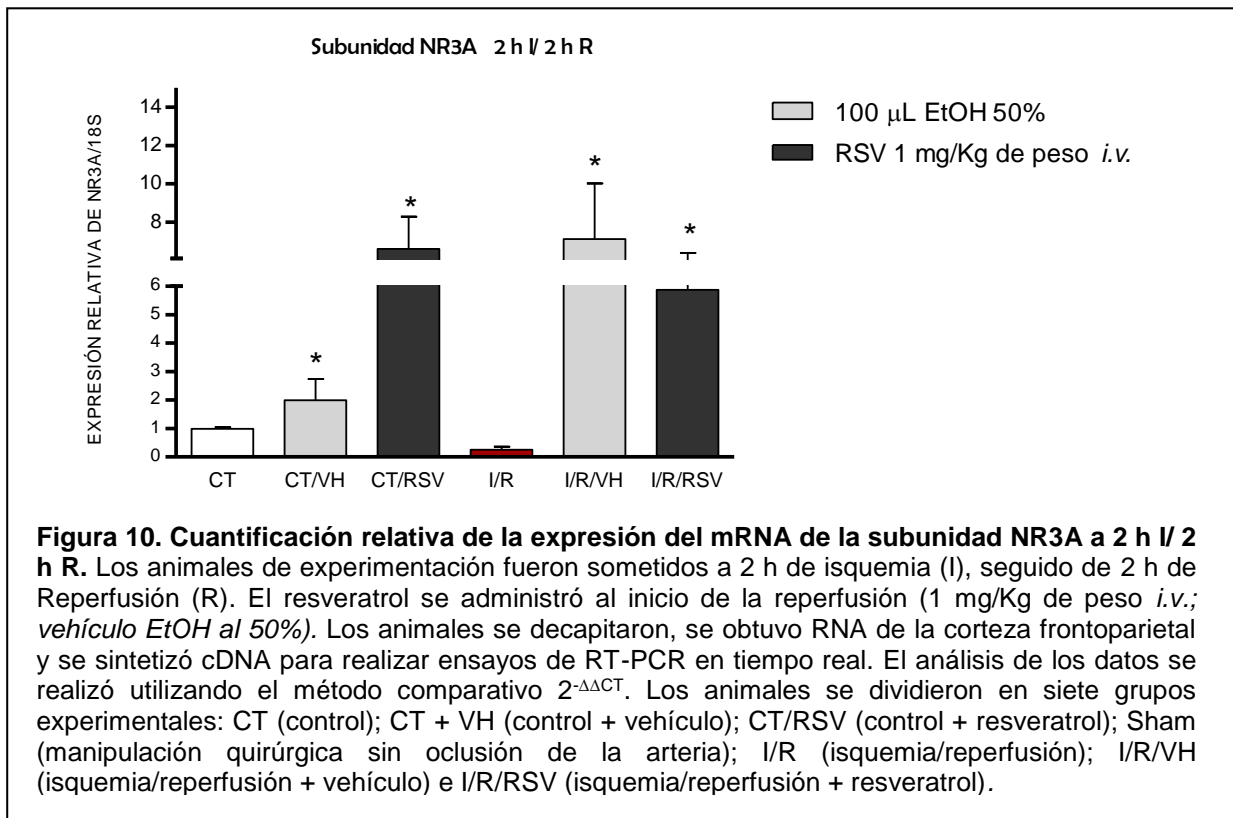


### Regulación de la subunidad NR3A por el resveratrol en IC.

Por último, evaluamos el efecto del RSV y el EtOH-50% sobre el nivel de expresión de la subunidad NR3A del receptor NMDA, debido a que se ha demostrado que la incorporación de esta subunidad en sistemas de expresión heterólogos y en sistemas biológicos confiere un efecto protector en IC tanto *in vitro*

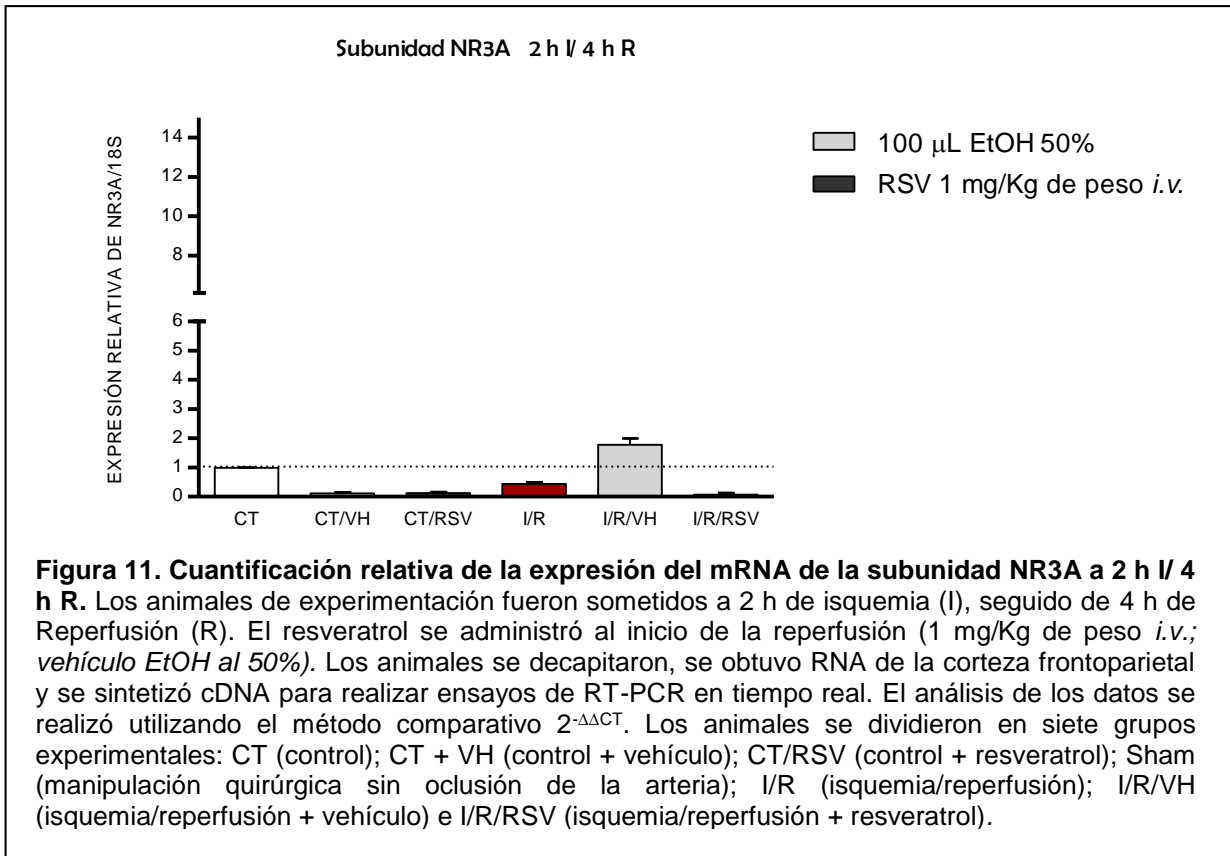
como *in vivo* (Nakanishi *et al.*, 2009). Cabe señalar que la expresión de esta subunidad en corteza cerebral adulta es muy baja, sin embargo su expresión es persistente en neuronas de retina en adultos (Wong *et al.*, 2002).

Determinamos la expresión del mRNA de la subunidad NR3A en ratas sometidas a 2 h I/ 2 h R y encontramos un nivel de expresión cercano al basal ( $0.18 \pm 0.08$ ), grupo CT ( $1.0 \pm 0.1$ ). La administración de etanol y RSV indujo un incremento significativo de NR3A tanto en grupos control [CT/VH ( $2.0 \pm 0.7$ ); CT/RSV ( $6.6 \pm 1.7$ )], como en los sometidos a I/R [I/R/VH ( $7.1 \pm 2.9$ ); I/R/RSV ( $5.9 \pm 0.5$ )] ( $P < 0.0001$ , Anova Tukey)] (Fig. 10).

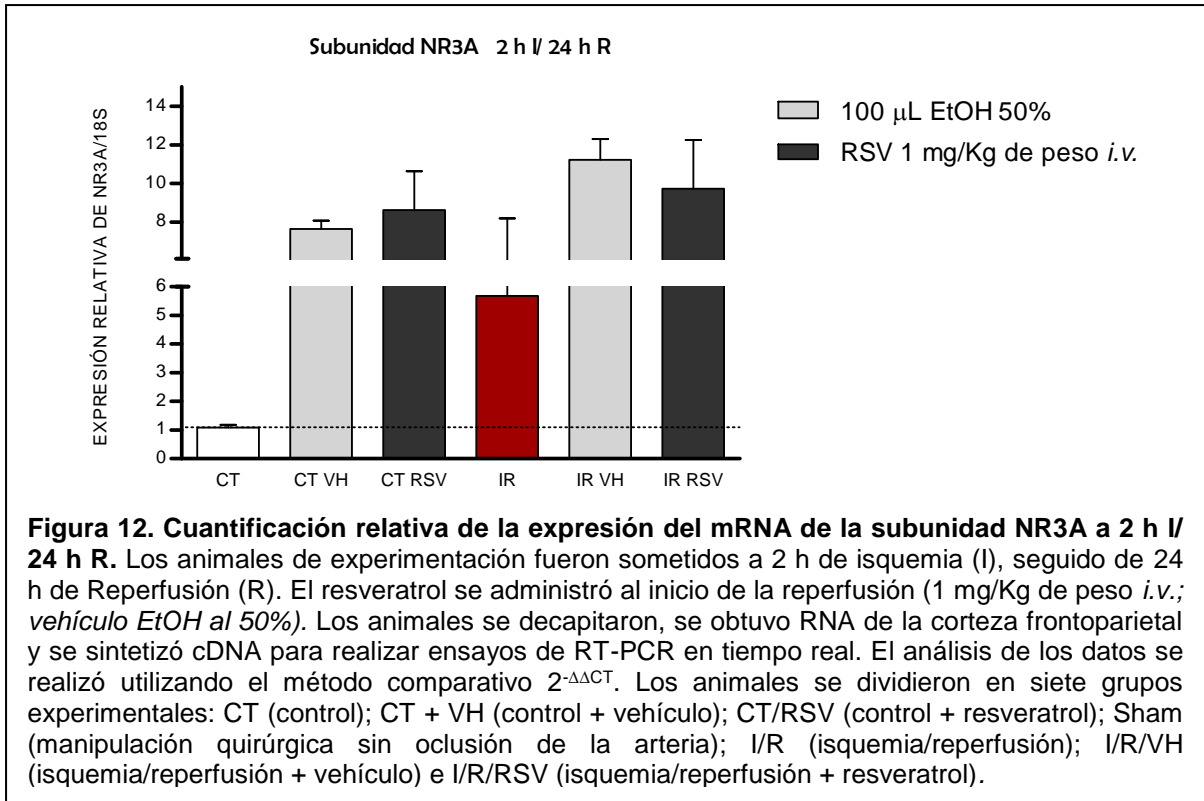


A 2 h I/ 4 h R, observamos la expresión del mRNA de la subunidad NR3A por debajo del nivel basal ( $0.4 \pm 0.1$ ), grupo CT ( $1.0 \pm 0.0$ ). La administración de etanol y RSV disminuyó la expresión de NR3A por debajo del nivel basal en los grupos CT [CT/VH ( $0.1 \pm 0.0$ ); CT/RSV ( $0.1 \pm 0.0$ )]. En el grupo sometido a I/R, la administración de etanol, indujo un incremento en el nivel de mRNA de NR3A [I/R/VH( $1.8 \pm 0.2$ )],

mientras que la administración de RSV disminuyó la expresión por debajo del nivel basal [I/R/RSV ( $0.1 \pm 0.1$ )] (Fig. 11).



Por otra parte, a 2 h I / 24 h R, observamos un incremento significativo en la expresión del mRNA de NR3A ( $5.68 \pm 2.52$ ) con respecto al grupo CT ( $1.09 \pm 0.09$ ) ( $P < 0.0001$ , Anova Tukey). En los grupos control, la administración de etanol y RSV indujo un incremento en la expresión de esta subunidad [CT/VH ( $7.65 \pm 0.43$ ); CT/RSV ( $8.63 \pm 2.00$ )]. Mientras tanto, en los grupos sometidos a I/R, el tratamiento con etanol y RSV mantuvo el incremento en la expresión de NR3A, sin que se observen diferencias significativas entre ambos grupos [I/R/VH ( $11.22 \pm 1.08$ ) e I/R/RSV ( $9.74 \pm 2.51$ )] (Fig. 12).



Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con etanol y RSV indujo un incremento en la expresión de la subunidad NR3A desde tiempos cortos de I/R. En diversos estudios se ha descrito que la sobreexpresión de esta subunidad está asociada a neuroprotección ya que disminuye la neurotransmisión a través del receptor NMDA. Debido a que el influjo de  $Ca^{2+}$  a través del receptor NMDA media la neurodegeneración excitotóxica, se ha postulado que la subunidad NR3A podría actuar como molécula inhibidora en éste proceso (Das et al., 1998). Reportes apoyan el efecto del etanol observado en nuestro trabajo (Collins et al., 2009). Así mismo, estudios epidemiológicos establecen que el consumo de alcohol leve y moderado (una o dos copas al día) se asocia con un riesgo menor de enfermedad cardíaca coronaria, incluyendo enfermedad isquémica del corazón, cardiomiopatía, diabetes y accidente cerebrovascular (Zakhari et al., 1999). Lo anterior coincide con el efecto protector del etanol y el RSV observado en I/R, dónde su administración al inicio de la R, es capaz de prevenir la muerte neuronal (Trejo-Quiñones Y., 2013).

El efecto protector del etanol y RSV podría estar asociado a su capacidad para disminuir la función del receptor NMDA, así como también la de inhibir la liberación de aminoácidos excitadores y eliminar radicales libres. Así mismo, se ha descrito que el etanol inhibe la corriente de iones activadas por el receptor NMDA, evitando así la excitotoxicidad inducida por éste (Gao *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2003).

Por último, la disminución de las subunidades NR1, NR2A y NR2B inducida por el etanol y el RSV desde tiempo cortos de R, podría regular el ensamble de receptores NMDA, provocando una disminución en el número de receptores localizados en la membrana plasmática después de la I/R. Adicionalmente, la sobreexpresión de subunidades NR2A y NR3A debido al tratamiento con etanol y RSV después de la I/R podría tener un efecto protector ya que la formación de receptores que incluyen cualquiera de esas subunidades favorece la disminución de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> en la neurona.

## **CONCLUSIONES.**

En este trabajo encontramos que el tratamiento con etanol y RSV regula el nivel de expresión del mensajero de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR3A del receptor NMDA en un modelo de IC *in vivo*. Estos resultados en conjunto, sugieren una participación del etanol y el RSV como reguladores de la expresión del receptor NMDA.

Las perspectivas del presente trabajo, estarán encaminadas a definir el efecto protector de ambos compuestos, mediante el análisis a nivel de proteína y a nivel funcional. Además, es necesario evaluar el efecto del RSV empleando otro vehículo, debido a que las propiedades antioxidantes del etanol y su efecto observado en la regulación de las subunidades del receptor NMDA enmascaran su posible efecto.



## REFERENCIAS.

1. Alwan A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva. World Health Organization 2011.
2. INEGI. Mujeres y hombres en México 2012.
3. Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M y Abiusi G. Classification of the cerebrovascular diseases. *Revista de Neurología* 2001; 33 (5): 455-464.
4. Harukuni H y Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* 2006; 24: 1–21.
5. Arauz A y Ruiz-Franco A. Enfermedad vascular cerebral. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 2012; 55 (3): 11-21.
6. Dirnagl U, Iadecola C y Moskowitz M A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22 (9): 391–397.
7. Pan J, Konstas A, Bateman B, Ortolano Girolamo A y Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 2007; 49: 93–102.
8. León M, Gloss G, Lijtszain C, Zambito F y Domínguez L. Trombólisis con activador tisular del plasminógeno recombinante por un evento vascular cerebral en un paciente portador de prótesis valvular aórtica tipo Bjork-Shiley. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 2003; 48 (2): 118-123.
9. Jordán J, Ikuta I, García-García J, Calleja S y Segura T. Stroke pathophysiology: management challenges and new treatment advances. *J. Physiol. Biochem* 2007; 63 (3): 261-278.
10. Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J y Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 196-205.
11. Aronowski J, Strong R y Grotta James. Reperfusion injury: Demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17(10): 1048-1056.
12. Rodrigo J, Fernández A, Serrano J, Peinado M y Martínez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 26–50.

13. Neumar Robert W. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Annals of Emergency Medicine* 2000; 36: 483-506.
14. Nakamichi N y Yoneda Y. Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> for drug development: desensitization of N-Methyl-D-aspartate receptor channels. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 348–350.
15. Mayer Mark L. Glutamate receptor ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 2005; 15: 282–288.
16. Chaffey H y Chazot P. NMDA receptor subtypes: Structure, function and therapeutics. *Current Anaesthesia & Critical Care* 2008; 19: 183–201.
17. Hardingham Giles y Bading Hilmar. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Rev. Neurosci* 2010; 11: 682-696.
18. Macdonald J, Xiong Z y Jackson M. Paradox of Ca<sup>2+</sup> signaling, cell death and stroke. *Trends in Neurosciences* 2006; 29 (2): 75-81.
19. Starkov A, Chinopoulos C y Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* 2004; 36:257–264.
20. Thompson J, Srinivasan V y Perez-Pinzon M. Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning. *Current Neuropharmacology* 2012; 10: 354-369.
21. Simonyi A, Wang Q, Miller R, Yusof M, Shelat P, Sun A, y Sun G. Polyphenols in cerebral ischemia. *Molecular Neurobiology* 2005; 31: 135-147.
22. Nadtochiy S y Redman K. Mediterranean diet and cardioprotection: the role of nitrite, polyunsaturated fatty acids and polyphenols. *Nutrition* 2011; 27 (7-8): 733–744.
23. Hicks J, Montes-Cortes D, Cruz-Domínguez M, Medina-Santillan R y Olivares-Corichi I. Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 2029-2037.
24. Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, Alami M, *et al.* Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2013: 1-10.
25. Sun A, Wang Q, Simonyi A y Sun G. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2010; 41(2-3): 375–383.

26. Trejo-Quiñones Y. Evaluación del efecto protector del resveratrol y etanol en un modelo de isquemia cerebral en rata [tesis de licenciatura]. Facultad de Química. UNAM. 2013.
27. Valko M, Leibfritz D, Molcon J, Cronin M, Mazur M y Joshua T. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 44–84.
28. Mohora M, Greabu M, Totan A, Mitrea N y Batinno M. Redox-sensitive signaling factors and antioxidants. *FARMACIA* 2009; 57 (4): 399-411.
29. Matteucci A, Cammarota R, Paradisi S, Varano M, Balduzzi M, Malchiodi-Albedi F, *et al.* Curcumin protects against NMDA-Induced toxicity: A possible role for NR2A subunit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 1070–1077.
30. Rivera-Rodriguez J.A. Regulación de la expresión del receptor NMDA por el extracto de ajo envejecido y S-alilcisteína en un modelo de isquemia cerebral [tesis doctoral]. México: Universidad Autónoma de Guerrero; 2011.
31. Cabrera A, Martínez O, Laguna G, Juárez R, Rosas V, Loria J, *et al.* Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med Int Mex* 2008; 24(2): 98-103.
32. Longa Z, Weinstein R, Carlson S y Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20: 84-91.
33. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, *et al.* Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Research* 2009; 1250: 242- 253.
34. Livak J and Schmittgen D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
35. Wenthold R, Prybylowski K, Standley S, Sans Ny Petralia S. Trafficking of NMDA receptors. *Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43:335–58.
36. Gascón S, Deogracias R, Sobrado M, Roda J, Renart J, Rodríguez-Peña A y Díaz-Guerra M. Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 (41): 35018–27.
37. Tan T, Albert M y Sun Y. The N-Methyl-D-Aspartate receptor in cerebral ischemia. *North American Journal of Medicine and Science* 2009; 2 (1): 9-14.

38. Chandler L, Sumners C y Crews F. Ethanol inhibits NMDA receptor-mediated excitotoxicity in rat primary neuronal cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17(1): 54–60.
39. Tornes-Reyes A, Ortíz-Plata A, Salazar M, Pedraza J, Aguilera P, Espinoza-Rojo M, *et al.*, En: IV congreso de especies reactivas del oxígeno en biología y medicina de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Querétaro, Queretaro. México. 2013 (19-22).
40. Hamanaka R y Chandel S. Mitochondrial reactive species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences* 2010; 35(9): 505-513.
41. Mori H, Manabe T, Watanabe M, Satoh Y, Suzuki N, Toki Shima, *et al.* Role of the Carboxy-Terminal region of the GluR2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron* 1998; 21: 571–580.
42. Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, *et al.*, Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function *in vivo*. *Cell* 1998; 92: 279–289.
43. Bai G y Hoffman P. Transcriptional regulation of NMDA receptor expression. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5277/>
44. Tan N. y Khachigian L. Sp1 phosphorylation of gene transcription. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 2009; 29 (10): 2483–2488.
45. Ryu H, Lee H, Zaman K, Kubilis J, Ferrante R, Ross B, *et al.* Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, anti-death transcription factors in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23 (9): 3597–3606.
46. Hardingham E y Bading H. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002: 148–153.
47. Papadia S, Stevenson P, Hardingham N, Bading H, Hardingham E. Nuclear Ca<sup>2+</sup> and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25 (17): 4279–4287.
48. Tovar K and Westbrook G. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses *in vitro*. *J. Neurosci* 1999; 19: 4180–418

49. Brickley S, Misra C, Mok M, Mishina M y Cull-Candy S. NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. *J. Neurosci* 2003; 23: 4958–4966.
50. Drejer J, Benveniste H, Diemer N y Schousboe A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J. Neurochem.* 1985; 45: 145–151.
51. Rossi D, Oshima T y Attwell D. (2000). Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403: 316–321.
52. Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 2000; 25: 11–14.
53. Takasu M, Dalva M, Zigmond R y Greenberg M. Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science* 2002; 295: 491–495.
54. Liu Y, Wong T, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai T, *et al.* NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci* 2007; 27 (11): 2846–2857.
55. Liu Z, Zhao W, Xu T, Pei D y Peng Y. Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationship to apoptosis following transient forebrain ischemia. *Brain Research* 2010: 133–139.
56. Tu W, Xu X, Peng L, Zhong X, Zhang W, Soundarapandian M, *et al.* DAP1 interaction with NMDA receptor NR2B subunit mediates brain damage in stroke. *Cell* 2010; 140: 222–234.
57. Nakanishi N, Tu S, Shin Y, Cui J, Kurokawa T, Zhang D, *et al.* Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 2009; 29 (16): 5260–5265.
58. Wong H, Liu X, Matos M, Chan S, Pérez-Otaño I, Boysen M, *et al.* Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J. Comp. Neurol* 2002; 450: 303–317.
59. Collins M, Neafsey E, Mukamal K, Gray M, Parks D, Das D, *et al.* Alcohol in moderation, cardioprotection and neuroprotection: epidemiological considerations and mechanistic studies. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33 (2): 206–219.
60. Zakhari S. Molecular mechanisms underlying alcohol-induced cardioprotection: contribution of hemostatic components. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23 (6): 1108–1110.

61. Gao Z, Chen X y Hu G. Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. *Brain Research* 2006; 1111: 41-47.
62. Liao S, Chen S, Raung S y Chen C. Ethanol attenuates ischemic and hypoxic injury in rat brain and cultures neurons. *Neuro Report* 2003;14: 2089-2094.

## ANEXOS.

### I. Administración del RSV.

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 <sub>1</sub> --- 350 gr peso de la rata

$$X_1 = \underline{0.35 \text{ mg de RSV para una rata de 350 gr.}}$$

\* Para preparar la solución stock se consideró el peso de las 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de solución stock de RSV necesitábamos 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 <sub>2</sub>

$$X_2 = 0.035 \text{ mL del stock del stock de RSV por rata **}$$

\*\* 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 H<sub>2</sub>O bidestilada (H<sub>2</sub>O-bd) (35  $\mu$ L). El volumen final que inyectamos a las ratas fueron 100  $\mu$ L, por lo tanto agregamos el volumen restante de etanol al 50%, (esto es 30  $\mu$ L) para no alterar la concentración final de etanol. Por último, como vehículo utilizamos etanol a una concentración de 50%.

## II. Preparación de H<sub>2</sub>O-DEPC.

El RNA es por lo general más sensible que el DNA a la degradación por nucleasas. Las nucleasas que actúan específicamente sobre el RNA, las RNA<sub>sas</sub>, son abundantes en las muestras biológicas y también están presentes en las manos y en general por toda la superficie de nuestros cuerpos, por lo tanto, es necesario utilizar inhibidores de RNA<sub>sas</sub> a la hora de extraer RNA.

El DEPC (dietil pirocarbonato) es un inhibidor de RNA<sub>sas</sub>. Su presentación consta de una solución clara que tiene que añadirse al H<sub>2</sub>O Milli-Q ó bidestilada a una concentración final de 0.1%. Tras ello, se deja una noche agitando para que se mezcle perfectamente y posteriormente, y antes de usarlo, se esteriliza a 120 ° C durante 20-30 minutos.

1 mL de DEPC se agrega a 1 L de H<sub>2</sub>O Milli-Q/Bidestilada. Homogeneizar durante toda la noche a T ambiente y posteriormente esterilizar a 120 ° C durante 20-30 minutos.

## III. Purificación de RNA por el método de TRIzol ®.

**Importante:** Para tejidos se debe utilizar un homogenizador libre de RNAsas (tratado durante 15 minutos con agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y posteriormente con agua tratada con dietil pirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC; 1 mL/Litro de agua). Usar guantes. Etanol al 75% en H<sub>2</sub>O-DEPC.

1. Se realiza una disección del cerebro y se extrae la corteza frontoparietal izquierda (aproximadamente 50 µg), la cual es depositada en un tubo eppendorf dónde previamente se agrega 1 mL de Trizol, posteriormente se homogeniza mecánicamente empleando un pistilo de teflón (10 golpes en promedio).
2. Se adicionan 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol y se agita vigorosamente en el vortex por 15 segundos, se incuban a T.A. 2-3 minutos aproximadamente. Inmediatamente, las muestras se centrifugan a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C con la finalidad de eliminar las proteínas y lípidos.



3. Una vez que se obtiene la fase acuosa que contiene el RNA, esta debe transferirse a un tubo limpio y se agregan 0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol y se mezclan. En éste paso, las muestras se dejan incubando durante toda la noche a 4°C.
4. Continuando con la técnica, se centrifugan durante 10 minutos a 12,000 x g a 4°C y después se elimina el sobrenadante con pipeta y con cuidado para obtener el botón de RNA.
5. Una vez obtenido el botón de RNA, éste se lava posteriormente con 1mL de etanol al 75% (en H<sub>2</sub>O-DEPC), mezclar en el vortex y centrifugar a 7,500 x g a 4°C durante 5 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante dejar secar el botón de RNA a T.A. Finalmente se disuelve el RNA en 50 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. El RNA disuelto se utiliza ese mismo día. Mantener el RNA a 4°C.
7. Utilizar el RNA disuelto en agua ese mismo día. El que ya no se utilice se guarda de -20 a -80 °C pero se le agrega 11 µL de acetato de sodio y 700 µL de etanol absoluto por cada 50 µL de RNA en agua.

**Nota:** El RNA en etanol al 75 % puede guardarse durante una semana de 2-8 °C o durante un año a -5 a -20 °C. Para recuperarlo se centrifuga a 7,500 x g durante 5 min a 4 °C y se continúa en el paso 6.

#### IV. Curva de Validación para el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

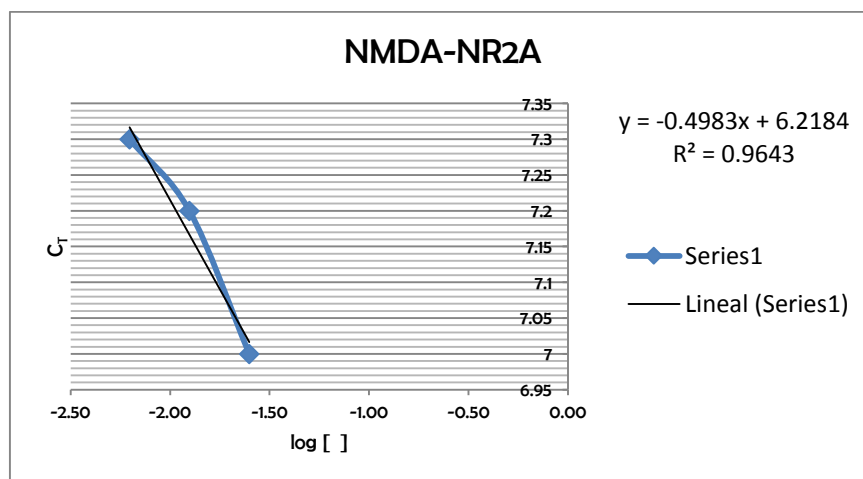
Realizamos la cuantificación relativa de la expresión génica utilizando el método  $\Delta\Delta CT$  (Livack and Schmittgen, 2001), en la que se comparó la expresión de los genes de estudio (blanco) entre diferentes muestras y se normalizó respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno).

Para utilizar el método fue necesario determinar que la eficiencia de amplificación del gen blanco y del control endógeno es similar. Se realizó una curva de validación utilizando una serie de diluciones (1:20, 1:40, 1: 80, 1:60) que se amplificaron tanto para el gen blanco como para el gen endógeno. Posteriormente se compararon los CT (número de ciclos que son necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia) del gen blanco y los del gen de referencia ( $C_T$  gen blanco- $C_T$  control endógeno=  $\Delta C_T$ ) en cada muestra. Los valores  $\Delta C_T$  se graficaron en el eje y contra la concentración en cada una de las diluciones en el eje x, la pendiente de la recta obtenida debe ser menor o igual a 0.1 para que el método sea válido.

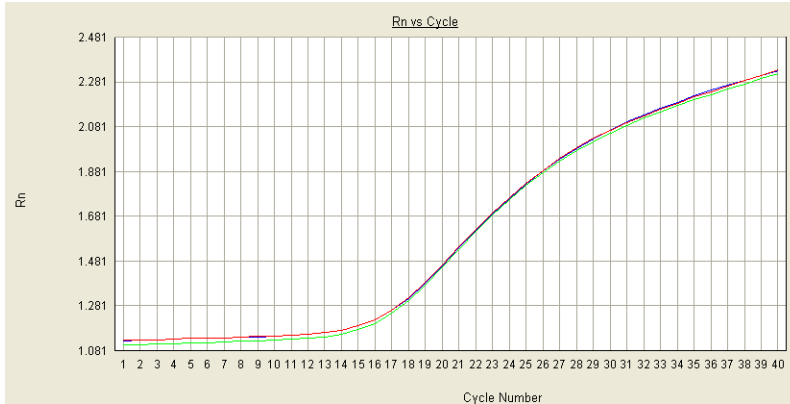
En la siguiente tabla observamos los valores obtenidos de la amplificación y la diferencia entre los  $C_T$ s del gen endógeno menos el gen blanco, en éste caso 18S y NR2A respectivamente.

Dilución	log de la concentración	CT 18S	CT NR2A	$\Delta C_T$ NR2A - CT 18S
0.025	-1.60	18.9	25.9	7
0.0125	-1.90	19.9	27.1	7.2
0.00625	-2.20	20.8	28.1	7.3

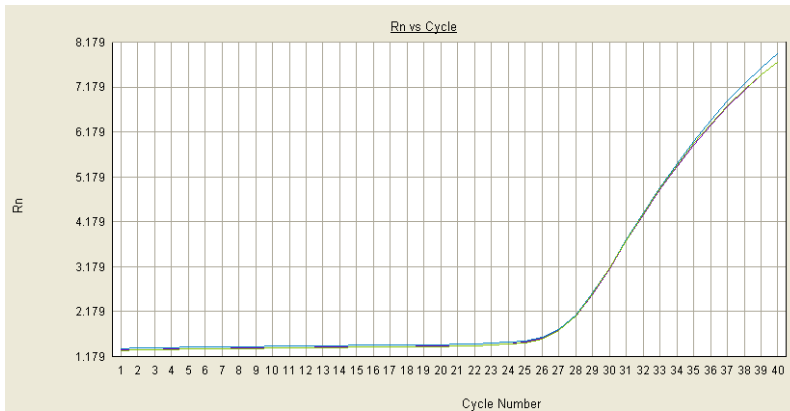
Enseguida se muestran graficados los valores que obtuvimos:



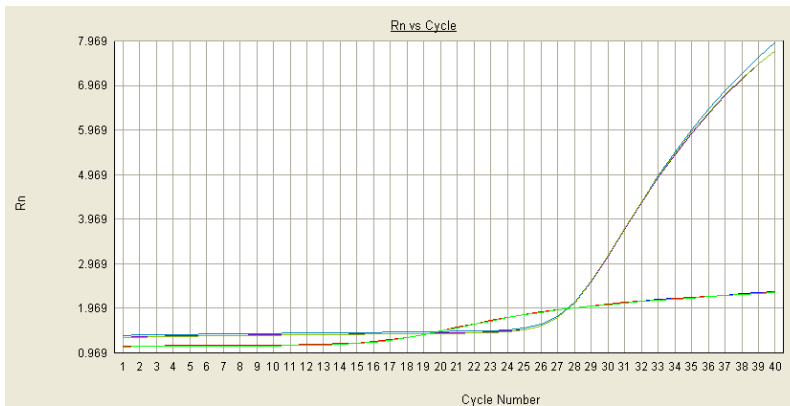
Gráficas de amplificación, donde podemos observar los triplicados.



Gen-18 S



Gen-NR2A



Genes -NR2A/18S

**Importante:** Se realizó el mismo procedimiento para los diferentes genes analizados en esta tesis.

No observamos amplificación de la subunidad NR3B.