



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

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA ACTIVACIÓN
DE AMPK Y EL NIVEL DE ESPECIES REACTIVAS DE
OXÍGENO EN UN MODELO *in vivo* DE ISQUEMIA
CEREBRAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOÉDICAS

PRESENTA:

ANAYELI NARAYANA PINEDA RAMIREZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. **MÓNICA ESPINOZA ROJO**

CODIRECTORA DE TESIS: Dra. **PENÉLOPE AGUILERA HERNANDEZ**

CHILPANCINGO, GRO., FEBRERO DE 2015.

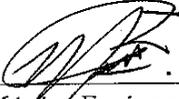


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

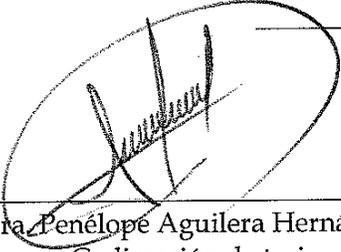
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 08 días del mes de enero de dos mil quince, 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 la activación de AMPK y el nivel de especies reactivas de oxígeno en un modelo in vivo de isquemia cerebral", presentada por la alumna Anayeli Narayana Pineda Ramírez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

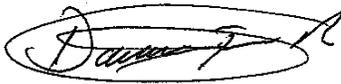
El Comité Tutorial



Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis



Dra. Penélope Aguilera Hernández
Codirección de tesis



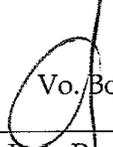
Dr. Donaciano Flores Robles



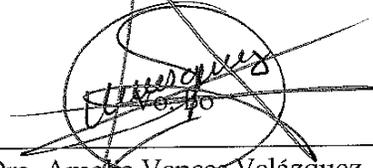
Dr. Alejandro Millán Vega



Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame



Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Unidad
Académica de Ciencias Químico Biológicas



Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

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

Bajo la Dirección de
Dra. Mónica Espinoza Rojo

Y codirección de
Dra. Penélope Aguilera Hernández

Con la asesoría de
Dr. Donaciano Flores Robles
Dr. Alejandro Millán Vega
Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Durante el periodo en que la C. Anayeli Narayana Pineda Ramírez cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca del CONACyT (número de becario: 341607).

Agradecimientos

Al Señor, que sin ti nada soy y por ti soy lo que soy... gracias a ti tres tesoros tengo, mi salud, mi familia y mis amigos. Gracias Dios por todo lo que me has dado por no soltar mi mano y mantenerme a tu lado contra viento y marea.

A mis padres y a mis hermanos que por su apoyo incondicional logre escalar un peldaño más en mi vida profesional. Gracias por siempre impulsar mis sueños, como este que ahora se convierte en realidad. Son lo mejor y más importante en mi vida. Los adoro.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo, le agradezco infinitamente la oportunidad que me dio de formar parte de su equipo de trabajo. He aprendido mucho del gran ser humano que es y de su trabajo en la investigación. Gracias por fomentar mi deseo de superación.

A la Dra. Penélope Aguilera Hernández, porque es un ejemplo a seguir en la vida y en la investigación, porque he aprendido mucho de usted y seguiré aprendiendo. Gracias por el apoyo y por permitirme formar parte de su laboratorio.

A mis sinodales: Dr. Alejandro Millán Vega; Dr. Donaciano Flores Robles; Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame, infinitas gracias por su disposición y valioso tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de la generación 2012-2014 de la Maestría en Ciencias Biomédicas; María, Ivette, Abi, Jonny y Abdiel, de quienes he aprendido mucho, de sus cualidades y virtudes únicas. Siempre recuerdo con una gran sonrisa todos los lindos y divertidos momentos que compartimos. De cada uno de ustedes me llevo algo en el corazón, espero que el habernos conocido aquí, sea el principio de una larga amistad. Los quiero un montón.

Al M. en C. José A. Rivera Rodríguez, amigo mío te agradezco por el apoyo en los momentos buenos y en los de desánimo. Gracias por escucharme, por los buenos consejos y por estar al pendiente de mí. Dios bendiga tu vida siempre.

Al M. en C. Carlos Cesar Patiño Morales porque siempre has estado ahí desde el inicio de este viaje, apoyándome y alentándome cuando me sentía decaída. Con nada se paga el cariño de un amigo, como el que tú me has dado. Bendiciones siempre baby.

Al M. en C. Alfredo Villanueva Duque, porque eres una gran persona y un gran amigo. Gracias por hacer más placentero mi curso por la maestría. Por los ánimos cuando parecía que nada salía bien, por las risas y los buenos ratos. Que Dios siempre te dé salud y trabajo.

Dedicatorias

A mis padres; Miguel Ángel Pineda y Ángela Ramírez de Pineda porque sin ustedes nada soy y no hay día en que no ponga en práctica todo lo que me han enseñado. Porque siempre me han motivado a salir adelante y me han enseñado que nada es imposible, este triunfo es más suyo que mío.

A mis hermanos; Miguel Ángel y Allan, porque todo lo que hago siempre es pensando en ustedes. Que este sea un ejemplo de que todo es posible, de que en ustedes está el poder. Y siempre recuerden que... Cuando DIOS te permite llegar a la cima no lo hace para que te quedes ahí, lo hace para que desde lo alto puedas ver cuál será tu siguiente meta y sigas hasta conquistarla.

*Los adoro con el alma
Narayana Pineda.*

**EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE AMPK
Y EL NIVEL DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN UN
MODELO *in vivo* DE ISQUEMIA CEREBRAL**

ÍNDICE

	Pág.
I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. MATERIAL Y MÉTODO	14
Animales de Laboratorio	14
Diseño experimental	14
Modelo de isquemia cerebral (MCAO)	15
Pruebas conductuales para determinar el déficit neurológico	15
Tratamiento	16
Western Blotting para AMPK	16
Evaluación ERO	17
V. RESULTADOS	20
VI. DISCUSIÓN	27
VII. CONCLUSIONES	33
VIII. AGRADECIMIENTOS	34
IX. REFERENCIAS	35

I. RESUMEN.

La isquemia cerebral resulta de la oclusión de una arteria cerebral importante. La disminución del flujo sanguíneo cerebral restringe el suministro de oxígeno y glucosa disminuyendo el metabolismo energético de la célula y aumentando el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO). La pérdida neuronal puede prevenirse al modular la función mitocondrial, el estado energético celular y el nivel de ROS. El resveratrol (RSV) aumenta la función mitocondrial a través de mecanismos estrechamente asociados con el metabolismo de la glucosa y la activación de vías de generación de ATP, en las que está involucrada la cinasa activada por AMP (AMPK). En modelos *in vivo* e *in vitro* se ha observado que el RSV previene el daño mitocondrial. **Objetivo:** Evaluar si el tratamiento con resveratrol regula la activación de AMPK a través de la disminución de los niveles de ERO en un modelo de isquemia cerebral. **Materiales y métodos:** Ratas macho Wistar (250 a 350 gr.), fueron sometidas a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 2 horas. Una dosis de RSV (1mg/kg; i.v.) diluido en etanol al 50%, se administró al inicio de la reperusión. Las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos de reperusión (0, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos). Los niveles de AMPK total y pAMPK fueron evaluados por Western Blot en corteza frontoparietal. El nivel de ROS fue evaluado por citometría de flujo con las sondas CellROX y CM-H2DCFDA. **Resultados:** La reperusión provocó un aumento en los niveles de pAMPK después de 15 min y alcanzó un nivel máximo a los 60 min. El RSV aumentó los niveles de pAMPK en los grupos sometidos a MCAO con y sin reperusión. Se observó un incremento máximo a los 60 min de reperusión y se mantuvo hasta los 120 min. El nivel de ERO incremento en un 64% por la I/R y disminuyó hasta los niveles basales después del tratamiento con RSV. **Conclusiones:** En nuestro modelo el mecanismo de acción del RSV podría estar asociado a la regulación del nivel de ERO permitiendo así la activación de la AMPK, activando un mecanismo que favorezca la supervivencia neuronal.

Palabras clave: Isquemia cerebral, Resveratrol, mitocondria, AMPK, ERO.

II. ABSTRACT.

Cerebral ischemia results from occlusion of a major cerebral artery. Decreased cerebral blood flow restricts the supply of oxygen and glucose decreasing energy metabolism of the cell and increasing the level of reactive oxygen species (ROS). The neuronal loss can be prevented by modulating mitochondrial function, cellular energy status and level of ROS. Resveratrol (RSV) increases mitochondrial function through mechanisms closely associated with glucose metabolism and activation of ATP generating pathways, where AMP kinase (AMPK) is activated involved. *In vivo* and *in vitro* models it has been observed that the RSV prevents mitochondrial damage. **Objective:** Evaluate whether treatment with resveratrol regulates AMPK activation through the reduction of ROS levels in a model of cerebral ischemia. **Materials and methods:** Male Wistar rats (. 250 to 350 g) were subjected to occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) for 2 hours. RSV dose (1mg / kg; iv) diluted in 50% ethanol, was administered at the onset of reperfusion. The rats were sacrificed at different times of reperfusion (0, 15, 20, 30, 60 and 120 minutes). AMPK levels of total and pAMPK were evaluated by Western blotting in frontoparietal cortex. ROS level was evaluated by flow cytometry with CM-H2DCFDA and CellROX probes. **Results:** The reperfusion resulted in increased levels pAMPK after 15 min and peaked at 60 min. The RSV pAMPK increased levels in the groups subjected to MCAO with and without reperfusion. A maximum increase at 60 min of reperfusion was observed and maintained until 120 min. ROS levels increase by 64% by the I/R and decreased to baseline after treatment with RSV. **Conclusions:** In our model the mechanism of action of RSV may be associated with the regulation of the level of ROS thus allowing activation of AMPK by activating a mechanism that promotes neuronal survival.

Keywords: Cerebral ischemia, Resveratrol, mitochondria, AMPK, ROS.

III. INTRODUCCIÓN.

Los accidentes cerebro vasculares, son originados por la alteración de uno o más vasos sanguíneos provocando la disminución brusca de la circulación de la sangre al cerebro. Las estadísticas indican que el 72.94% de los accidentes cerebro vasculares observados en la práctica clínica son de naturaleza isquémica y el 27.06% restante son de tipo hemorrágico (Cabrera *et al.*, 2008). La isquemia cerebral resulta de la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral (FSC), por un trombo en una arteria cerebral importante.

Debido a que la reducción del FSC no es homogénea en el territorio isquémico, es posible observar dos regiones morfológicamente importantes desde el punto de vista funcional (Dirnagl *et al.*, 1999). En la primera región, denominada núcleo isquémico, el FSC disminuye considerablemente por lo tanto el daño neuronal es irreversible, y se observa muerte celular por necrosis. La segunda región se localiza en la periferia del núcleo isquémico y se denomina zona de penumbra, aquí la irrigación sanguínea se reduce aproximadamente en un 50%. En esta zona la evolución del daño, es más lenta y las células cuentan con energía para que se lleve a cabo la muerte celular por apoptosis (Dirnagl *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 2008). En la clínica, la penumbra isquémica es relevante desde el punto de vista terapéutico ya que es una zona con tejido viable y susceptible de prevenir su conversión a núcleo isquémico (Dirnagl *et al.*, 1999; Arauz *et al.*, 2002; Sweeney *et al.*, 1995; Doyle *et al.*, 2008). Para evitar la expansión del área de infarto es determinante que la recuperación del FSC (reperusión) sea rápida, ya que paradójicamente, su restablecimiento tardío tiene consecuencias que agravan la lesión cerebral (Dirnagl *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 1998; Sanderson *et al.*, 2012).

El proceso de isquemia/reperusión (I/R), desencadena una secuencia de fenómenos moleculares que inducen la muerte celular por diversos mecanismos. Entre estos, destaca la excitotoxicidad por glutamato, que se origina debido a la sobrestimulación de los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y que está asociada a un aumento intracelular de calcio. Un incremento excesivo

del calcio intracelular, que sobrepase la capacidad amortiguadora de la mitocondria, altera su función provocando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Se han sugerido diversos sitios de producción de ERO, pero la más importante es la generación de anión superóxido en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Las ERO reaccionan irreversiblemente con proteínas, fosfolípidos y DNA nuclear y mitocondrial, causando lipoperoxidación, daño a la membrana mitocondrial y celular, alteraciones en la homeostasis iónica y falla en la fosforilación oxidativa provocando un déficit de los niveles energéticos de la célula y finalmente una ruptura en el balance redox celular (Lipton, 1994; Dirnagl *et al.*, 1999; Nicholls y Ward., 2000; Culmsee *et al.*, 2004; Durukan y Tatlisumak., 2007; Doyle *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2012; Sanderson *et al.*, 2012). El daño provocado a la mitocondria por las ERO y la pérdida del $\Delta\Psi_m$ llevan a la despolarización mitocondrial y la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTm) que tiene una participación muy importante en la activación de la apoptosis (Nicholls y Ward, 2000).

En la zona de penumbra se activan mecanismos que pueden provocar muerte celular o favorecer la supervivencia neuronal. Un papel clave lo desempeña la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), la cual es una enzima que regula procesos metabólicos funcionando como un sensor energético de la célula. La AMPK se activa alostéricamente por AMP, pero para su completa activación necesita ser fosforilada (pAMPK) por cinasas río arriba como LKB1. La pAMPK inhibe vías que consumen energía y activa vías que producen ATP (Li y McCullough., 2010; Hardie, 2011; Manwani y McCullough., 2013). Activada por diversos estímulos, la vía de señalización de AMPK ejerce efectos benéficos en situaciones en donde se presentan condiciones energéticas anormales como ocurre en isquemia.

En neuronas la activación de la AMPK incrementa la producción de lactato como fuente alterna de energía (Li y McCullough., 2010). Además, facilita la translocación del transportador GLUT-3 a la membrana plasmática, incrementando la captación de glucosa y su metabolismo, lo que resulta en un incremento en la producción de ATP (Kuramoto *et al.*, 2007; Weisová *et al.*, 2009). Se ha observado que el fármaco activador de la AMPK, el 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleosido (AICAR) incrementa la supervivencia en un cultivo de neuronas de hipocampo sometidos a insultos metabólicos (10 μ M beta amiloide /24h) y excitotóxicos (10 μ M glutamato/24h) y disminuye la muerte celular en ratas con isquemia cerebral global (Culmsee *et al.*, 2001).

Sin embargo, en isquemia cerebral se ha observado que, cuando los niveles de ERO son muy altos como sucede en el área de penumbra al restablecerse el FSC, los niveles de fosforilación de AMPK se ven disminuidos. Esto podría estar asociado al aumento de uno de los productos de la peroxidación lipídica causada por ERO, el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que se ha reportado es capaz de modificar directamente e inhibir la actividad de LKB1 en líneas celulares MCF-7. El tratamiento con HNE disminuye los niveles de LKB1 fosforilado y también provoca la disminución de hasta 3 veces los niveles de LKB1 total (Peters *et al.*, 1998; Dolinsky *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que la inhibición de AMPK cuando se da tratamiento con el compuesto C, reduce la viabilidad de cultivo primario de neuronas corticales en condiciones fisiológicas de oxígeno y glucosa (Zhu *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que el incremento en ERO y la consecuente inhibición de AMPK podrían estar asociados al daño en el tejido isquémico.

En contraste a la producción excesiva de ERO generadas por la I/R, en el preconditionamiento isquémico se ha observado que niveles moderados de ERO son citoprotectores y desempeñan un papel importante en la regulación de la señalización de vías de supervivencia. Por ello, se ha sugerido que si se reduce la formación de ERO que se generan en grandes cantidades durante la I/R mediante

el uso de un antioxidante administrado al momento de la reperfusión, se podrían activar vías de señalización que incrementan supervivencia celular (Thompson *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior nos resulta elemental la búsqueda de estrategias o combinación de las mismas que puedan reducir los daños ocasionados por el estrés oxidativo celular asociado a la I/R. Está reportado que el uso de compuestos naturales como los antioxidantes en la dieta diaria tienen efectos benéficos contra ciertas enfermedades (Hwang *et al.*, 2004) y se cree que es a través de la activación de AMPK (Park *et al.*, 2007; Breen *et al.*, 2008).

Se ha visto que el RSV, reduce parcialmente el daño neuronal inducido por la I/R (Baur y Sinclair., 2006; Yousuf *et al.*, 2009). Y que su administración al inicio de la reperfusión previene el daño ocasionado por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en el modelo experimental en rata (Trejo-Quiñones 2014).

Aunque no se ha descrito con precisión su mecanismo de acción, se ha reportado que dosis moderadas de RSV activan a la AMPK de la misma manera que lo hace AICAR e induce la biogénesis mitocondrial activando a LKB1. Además, el RSV estimula la función mitocondrial tanto *in vivo* como *in vitro* (Price *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que la activación neuronal de AMPK podría ser un mediador importante en la actividad neuroprotectora del RSV, a través del restablecimiento del balance redox y del metabolismo energético de la célula (Dasgupta y Milbrand, 2007; Hardie, 2011).

Por lo anterior, la intención de esta investigación fue evaluar si el tratamiento con RSV regula la activación de AMPK a través de la disminución de los niveles de ERO en un modelo de isquemia cerebral.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de Laboratorio.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, de 280-350 g de peso (aproximadamente 16 semanas de edad) proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Se utilizó un número total de 84 animales que fueron divididos aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales (n= 4) y para cada análisis se usaron grupos independientes. Los animales fueron colocados en jaulas de acrílico con libre acceso a agua y alimento. Durante el estudio las ratas fueron mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (12 horas luz/oscuridad). Todos los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo a 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.

Se utilizó el modelo de MCAO en ratas macho de la cepa Wistar para evaluar el efecto del RSV en la fosforilación de AMPK y sobre el nivel de ERO. Para ello, las ratas fueron sometidas a 2 horas de MCAO diferentes tiempos de reperfusión (0, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos), el tratamiento (RSV) fue administrado al inicio de la reperfusión. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en los grupos Control (CT), CT con RSV, CT con vehículo, grupo sometidos a 2 h de MCAO, y grupos sometidos a 2 h de MCAO seguida de diferentes tiempos de R. Para realizar el análisis se extrajo la corteza frontoparietal del hemisferio izquierdo (lado ipsilateral a la lesión). El nivel de fosforilación de AMPK fue evaluado con ensayos de inmunodetección en fase sólida (Western blotting) y el nivel de ERO se determinó con ensayos de citometría de flujo usando las sondas

fluorescentes CellROX (LifeTechnologies; No. Cat. C10444) y CM-H2DCFDA (Invitrogen; No. Cat. C6827).

Modelo experimental de isquemia cerebral inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).

La IC focal transitoria fue producida por MCAO, empleando el método descrito por Longa *et al.*, (1989). Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 2%. 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 (aproximadamente 17 mm); en este punto el filamento ocluye el origen de la arteria cerebral media. Después de 2 horas, el filamento fue retirado para permitir la reperusión.

Pruebas conductuales para determinar el daño neurológico de la rata.

El estado neurológico de cada rata fue determinado por dos pruebas: 1) *Flexión de la pata contralateral a la lesión*, las ratas se suspenden de la base 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 base de la cola y se les permite moverse libremente apoyando las patas delanteras, mientras se observa la dirección del movimiento durante 30 segundos; los animales dañados realizan al menos 5 vueltas en sentido contralateral a la lesión. Se trabajó con ratas que cumplieron con ambas pruebas; es decir que presentaron flexión de la pata derecha y una conducta de por lo menos 10 vueltas con giro a la derecha en 30 segundos.

Tratamientos.

Las ratas fueron tratadas al inicio de la reperusión. Se aplicó una dosis de 1 mg/kg de RSV (SIGMA; No. Cat. R5010) en 100 μ L etanol (EtOH) por vía intravenosa (vena coccígea, localizada en la cola de la rata). Se utilizó una solución de RSV en 96% de etanol como stock que para su administración se diluyó en EtOH al 50% diluido en agua. La dosis de RSV fue seleccionada con base a estudios previos donde se muestra un efecto neuroprotector (Yousuf *et al.*, 2009). Los grupos tratados con Vh fueron administrados con 100 μ L de EtOH al 50% por vía intravenosa.

Evaluación del nivel de fosforilación de AMPK por Western Blotting.

Extracción de proteínas.

De corteza frontoparietal. Se homogenizó el tejido y se pasó a un tubo eppendorf. Se agregó al tubo 500 μ L de Buffer A hipotónico (Hepes pH 7.9 10 mM, KCl 10 mM, EDTA pH 8.0 0.1 mM, EGTA 0.1mM, DTT 1mM) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (1:100; SIGMA) y de fosfatasas (1:100; SIGMA). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 min, se agregó Nonidet P-40 al 10% y se agito en vortex durante 10 segundos. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 30 segundos (Centrifuga Eppendorf, Modelo 5415 D). Se separó el sobrenadante en otro tubo y se tomaron 10 μ L del homogenizado que fueron utilizados para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry *et al.*, 1951. A las muestras se les agregó amortiguador de muestra Laemmli, en una proporción 1:1 y se sometieron a ebullición durante 5 min, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Western Blot.

Las muestras (200 µg de proteína) se separaron por peso molecular en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, durante 1 hora a 100 voltios. Las proteínas fueron electrotransferidas (350 mA) a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD) durante 1 h. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS (Tris-Base 25mM, NaCl 137mM). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-AMPKα (1:1000, Cell Signaling Technology, catálogo 2532) y anti phospho-AMPKα (Thr172) (1:1000, Cell Singnaling Technology, catálogo 2531) durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 4 veces con 25 mL TBS-Tween-0.1% cada uno de 5 min, en agitación y a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:10 000, Jackson inmunoResearch) 2 h a temperatura ambiente en agitación constante y suave. Las membranas se lavaron 4 veces con 25 mL TBS-Tween-0.1% cada uno de 5 min, en agitación y a temperatura ambiente. La señal específica se reveló por quimioluminiscencia con Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore; No. Cat. WBLUF0100).

Evaluación de los niveles de ERO por Citometría de flujo.

Procesamiento de tejido.

Las ratas fueron sometidas a las mismas condiciones de MCAO y fueron sacrificadas a los 20 minutos de reperfusión. Se realizó la extracción y obtención de la corteza frontoparietal ipsilateral a la lesión y el tejido fue congelado a -20°C hasta su uso. Posteriormente se homogenizó mecánicamente con el embolo de una jeringa en 2 mL de medio de cultivo DMEM™ (Invitrogen, No. Cat. D1152-1L) frío y se filtró a través de un fragmento de organza en un tubo eppendorf, se centrifugó por 5 min a 5000 rpm (Centrifuga Eppendorf, modelo 5415 D), el sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en 200 µL de medio de cultivo DMEM™ (para marcaje con CM-H2DCFDA) y en 200 µL de PBS 1X frío (para marcaje con CellROX). Todo el proceso se realizó en hielo. Para ambos

experimentos, el control positivo a estrés oxidativo fue estimulado con 50µL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) incubando durante 30 min a 37°C y para el control negativo el tejido fue tratado con 2 µL de ditioneitol (DTT) incubando durante 2 h a 37°C.

Detección de ERO

- 1) *Empleando la sonda 5-(6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceina diacetato, acetil ester (CM-H2DCFDA).*

La cual es una sonda que puede reaccionar con peróxido de hidrogeno (H₂O₂), radicales hidroxilo y peroxinitrito. Esta sonda se deriva de otra sonda, la 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina diacetato, acetil ester (H2-DCFDA), pero con un grupo clorometil adicional, el cual potencia la habilidad de la sonda para unirse a componentes intracelulares, prolongando la retención de la sonda por parte de la célula. En su forma reducida esta sonda no es fluorescente pero una vez oxidada por las ERO la sonda es convertida 2',7'-dichlorofluoresceina (DCF), que es altamente fluorescente.

Las muestras y los controles fueron centrifugados por 5 min a 5000 rpm (Centrifuga Eppendorf, modelo 5415 D), se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido añadiendo 200 µL de medio con sustrato que se preparó con 1µL de CM-H2DCFDA (Invitrogen; No. Cat. C6827) al 5 µM en 1 mL de medio de cultivo DMEMTM. Se incubaron durante 20 min a 37°C. Las muestras se centrifugaron nuevamente durante 5 min a 5000 rpm y se desechó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 200 µL de Flow Buffer (0.05% de BSA, EDTA 2mM pH 7.2) frío. Todo se realizó en hielo y los tubos se conservaron protegidos de la luz hasta su medición. Se evaluaron por citometría de flujo a una longitud de onda de 493 nm para excitación y 520 nm para emisión.

2) *Empleando el kit CellROX.*

El kit tiene una sonda no fluorescente en su estado reducido pero en presencia de ERO es oxidado y exhibe una fluorescencia intensa.

Las muestras y los controles se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 200 μ L de PBS 1X frío. A todos los tubos les fueron agregados 2 μ L de CellROX (LifeTechnologies; No. Cat. C10444) y fueron incubados durante 30 min a 37°C, al término fueron centrifugados por 5 min a 5000 rpm y fueron lavados 2 veces con 500 μ L de PBS 1X frío. Finalmente se resuspendió el botón celular en 200 μ L de PBS y fueron cubiertos de la luz hasta su medición. Todo el procedimiento se realizó en hielo y por último la reacción se midió por citometría de flujo a una longitud de onda de 485 nm para excitación y 520 nm para emisión.

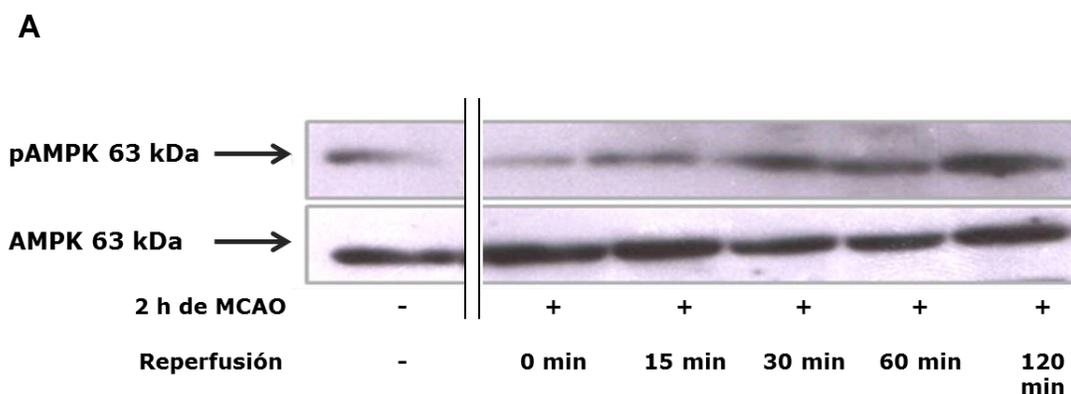
Análisis de datos.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Los datos crudos se analizaron por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y la prueba de Tukey, donde los valores con un valor de $p < 0.05$ serán considerados estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

Efecto de 2 h de MCAO y diferentes tiempos de reperfusion en la fosforilación de AMPK.

La determinación del efecto de la I/R en la fosforilación de AMPK, se realizó Western Blotting de corteza frontoparietal. Encontramos que 2 horas de isquemia cerebral y diferentes tiempos de reperfusion no afectan los niveles de expresi3n de la AMPK total (Figura 1 A). Mientras que en el nivel de AMPK fosforilada, se detect3 una tendencia a aumentar tanto en el grupo sometido exclusivamente a MCAO como en aquellos sometidos a MCAO seguido de reperfusion; sin embargo, los cambios no fueron estadisticamente significativos (Figura B). Se observ3 un incremento del 74% en la fosforilaci3n de AMPK a 2 horas de isquemia con respecto al control; 89% y 101% a los 15 y 30 minutos de reperfusion, respectivamente; alcanzando el nivel m3ximo a los 60 minutos con un aumento del 132%; finalmente a los 120 min de reperfusion se detect3 un incremento del 99.71% (Figura 1 A y B).



B

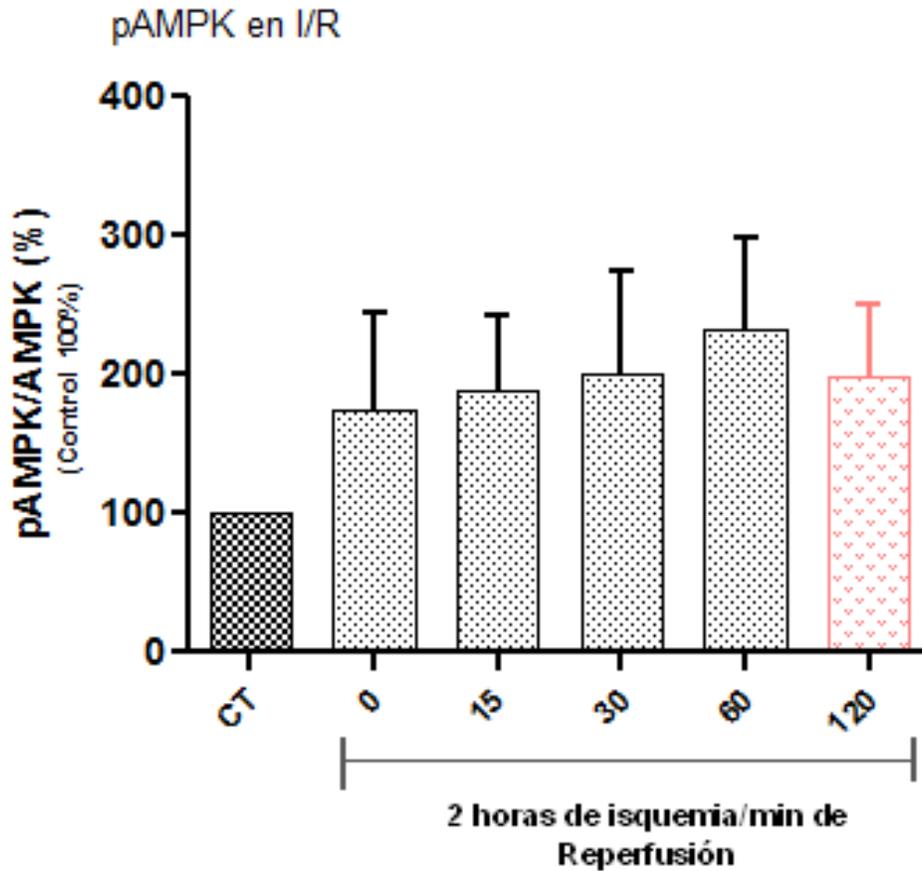


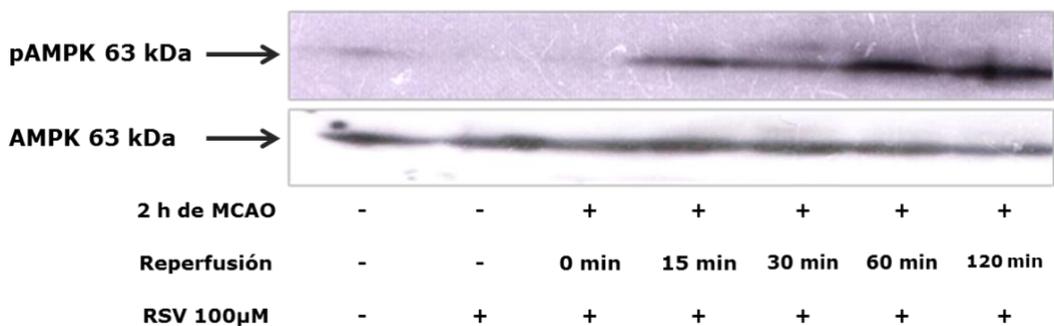
Figura 1. Efecto de la isquemia y la reperusión en los niveles de fosforilación de AMPK. Los animales de experimentación fueron sometidos a 2 h de Isquemia (MCAO), seguido de diferentes tiempos de reperusión (R). Se obtuvo la corteza frontoparietal, se realizó extracción y cuantificación de proteínas para realizar ensayos de Western Blotting. Nivel de expresión de la proteína AMPK total y pAMPK (panel 1 A) en ratas control (CT), en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 0 minutos de R (2I); en ratas con 2 horas de isquemia y 15 minutos de R (2I/15R); en ratas con 2 horas de isquemia y 30 minutos de R (2I/30R); en ratas con 2 horas de isquemia y 60 minutos de R (2I/60R); en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 120 minutos de R (2I/120R). La cuantificación del nivel de expresión de la pAMPK se realizó con el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con los niveles de expresión de la AMPK total. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes.

Efecto del RSV en la fosforilacion de AMPK después de 2 h de MCAO y diferentes tiempos de reperfusion.

Se ha reportado que el RSV tiene un efecto neuroprotector y que esto está relacionado con la activación de vías involucradas en la regulación del metabolismo energético de las células. Por ello, decidimos evaluar el efecto que tiene la administración del RSV en la fosforilación de la AMPK.

Observamos que el RSV no afectó los niveles de la AMPK total durante la isquemia, ni durante la reperfusion (Figura 2A). Por otro lado, se observó que el tratamiento con RSV administrado a ratas sanas provocó una disminución del 72% en el nivel de la pAMPK (ANOVA. Tukey; $p < 0.05$) (Figura 2B). El tratamiento con RSV incrementó los niveles de la pAMPK en los grupos sometidos a I/R. A los 60 minutos de reperfusion hubo un incremento estadísticamente significativo del 214% en el nivel de pAMPK (ANOVA. Tukey; $p < 0.05$). A los 120 minutos de reperfusion se alcanzó el pico de fosforilación con un 277% (ANOVA. Tukey; $p < 0.05$) (Figura 2 A y B).

A



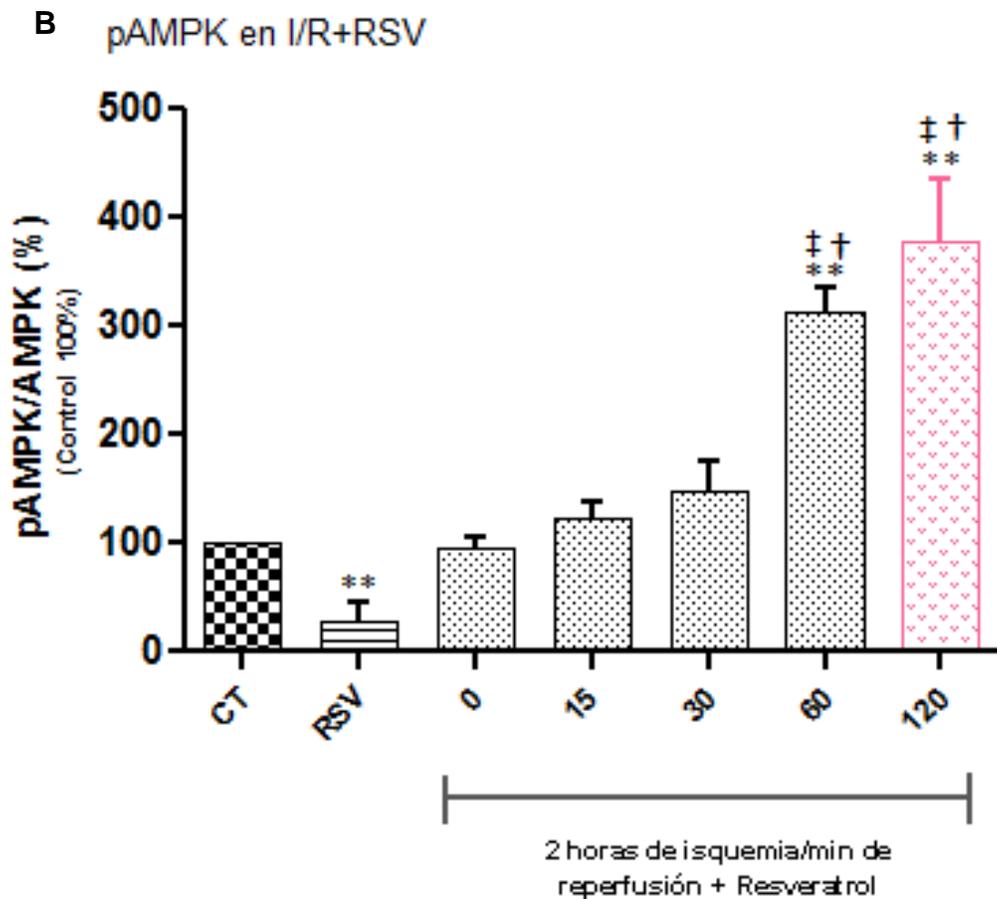


Figura 2. Efecto del RSV en el nivel de fosforilación de AMPK. Los animales de experimentación fueron sometidos a 2 h de Isquemia (MCAO), seguido de 0, 15, 30, 60 y 120 min de reperusión (R). El resveratrol (RSV) se administró al inicio de la R (1 mg/Kg de peso; i.v.; vehículo EtOH al 50%). Se obtuvo la corteza frontoparietal, se realizó extracción y cuantificación de proteínas para realizar ensayos de Western Blotting. Nivel de expresión de la proteína AMPK total y pAMPK (panel 2 A) en ratas control (CT), en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 0 minutos de R y tratamiento con RSV (2I); en ratas con 2 horas de isquemia y 15 minutos de R con RSV (2I/15R); en ratas con 2 horas de isquemia y 30 minutos de R con RSV (2I/30R); en ratas con 2 horas de isquemia y 60 minutos de R con RSV (2I/60R); en ratas sometidas a 2 horas de isquemia y 120 minutos de R con RSV (2I/120R). La cuantificación del nivel de expresión de la pAMPK se realizó con el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con los niveles de expresión de la AMPK total. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes. Análisis de varianza, ANOVA; Tukey $p < 0.05$; **diferencia significativa vs CT; † vs 2I; ‡ vs 2I/15R.

Efecto de la I/R y el RSV en el nivel de ERO en corteza cerebral.

Se ha propuesto que la actividad antioxidante del RSV tiene un efecto neuroprotector en diferentes modelos experimentales de daño, sin embargo no se han reportado estudios que profundicen en los mecanismos celulares y moleculares involucrados (e. g. la regulación de vías de señalización). Por ello, decidimos evaluar el efecto del RSV en la producción de ERO. Para lo cual, las ratas fueron sometidas a 2 horas de MCAO seguidas de 20 minutos de reperfusión.

Utilizando la sonda CM-H2DCFDA, se observó que el nivel de ERO se incrementó en un 11.8% y 26.9% en los grupos control tratados con vehículo y RSV, respectivamente. En las ratas sometidas a I/R, el nivel de ERO incrementó en un 64%; la administración del vehículo lo incrementó hasta un 105% mientras que el RSV lo disminuyó en un 56.4% (Tabla I, Figura 4).

REACTIVO	CT	Vh	RSV	2I/20'R	2I/20'R + Vh	2I/20'R +RSV
CM-H2DCFDA	100 ± 0	111.82 ± 6.68	126.97 ± 21.00	164.16 ± 24.78	205.37 ± 57.75	148.92 ± 22.29
CellROX	100 ± 0	144.18 ± 17.13	151.67 ± 40.19	123.87 ± 30.64	169.27 ± 22.80 *	119.89 ± 5.46

Tabla 1. **Efecto de la Isquemia/reperfusión y del tratamiento con RSV en las niveles de ERO.** El resveratrol (RSV) se administró al inicio de la reperfusión (1 mg/Kg de peso; i.v.; vehículo EtOH al 50%). El vehículo se administró al inicio de la reperfusión (100µL de EtOH al 50%; i.v.). Nivel relativo de especies reactivas de oxígeno (ERO) (n=5). CT=Control Sano; RSV= Control sano que recibió tratamiento de RSV; Vh= control sano que recibió el tratamiento con solo vehículo; 2I/20'R=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de reperfusión; 2I/20'R+Vh=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de reperfusión y tratamiento con vehículo; 2I/20'R+RSV=ratas con 2

horas de isquemia y 20 minutos de perfusión con tratamiento de RSV. Los datos crudos, se expresan como la Media \pm Error estándar. ANOVA. Tukey $p < 0.05$; *diferencia significativa vs CT.

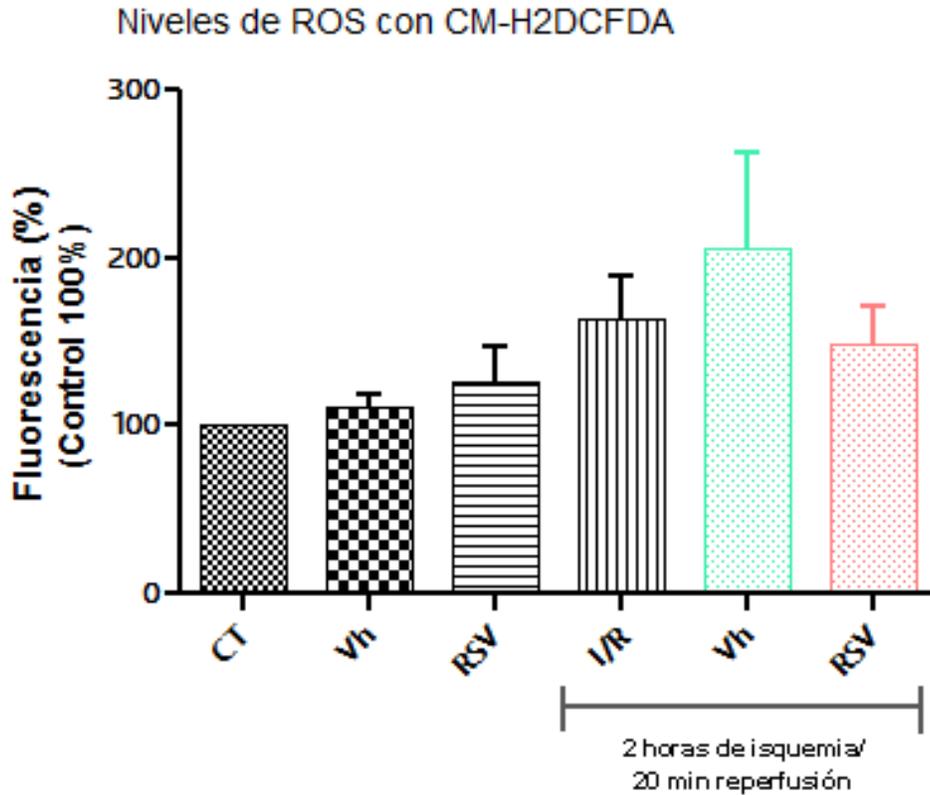


Figura 4. Niveles de ERO con el reactivo de CM-H2DCFDA. Nivel relativo de especies reactivas de oxígeno (ERO) (n=5). CT=Control Sano; RSV= Control sano que recibió tratamiento de RSV (1 mg/Kg de peso; i.v.; vehículo EtOH al 50%); Vh= control sano que recibió el tratamiento con solo vehículo (100 μ L de EtOH al 50%; i.v.); 2I/20'R=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de R; 2I/20'R+Vh=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de R y tratamiento con vehículo; 2I/20'R+RSV=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de reperfusion con tratamiento de RSV.

Debido a que está reportado que en la mitocondria se produce principalmente anión superóxido (O_2^-), decidimos evaluar el nivel de ERO con CellROX que a diferencia de la CM-H2DCFDA es sensible a oxidación por O_2^- .

Observamos un patrón similar en los niveles de producción de ERO cuando se realizaron los ensayos con la sonda CellROX. En los grupos control a los que se les administró Vh y RSV se observó un incremento en los niveles de ERO del 44.1% y 51.6%, respectivamente. La I/R sin y con vehículo provocó un incremento en el nivel de ERO, de 23.8% y de 69.2% (ANOVA. Tukey; $p < 0.05$), respectivamente, siendo el último estadísticamente significativo; mientras que el con el RSV el nivel de ERO regreso a los niveles basales (Figura 5).

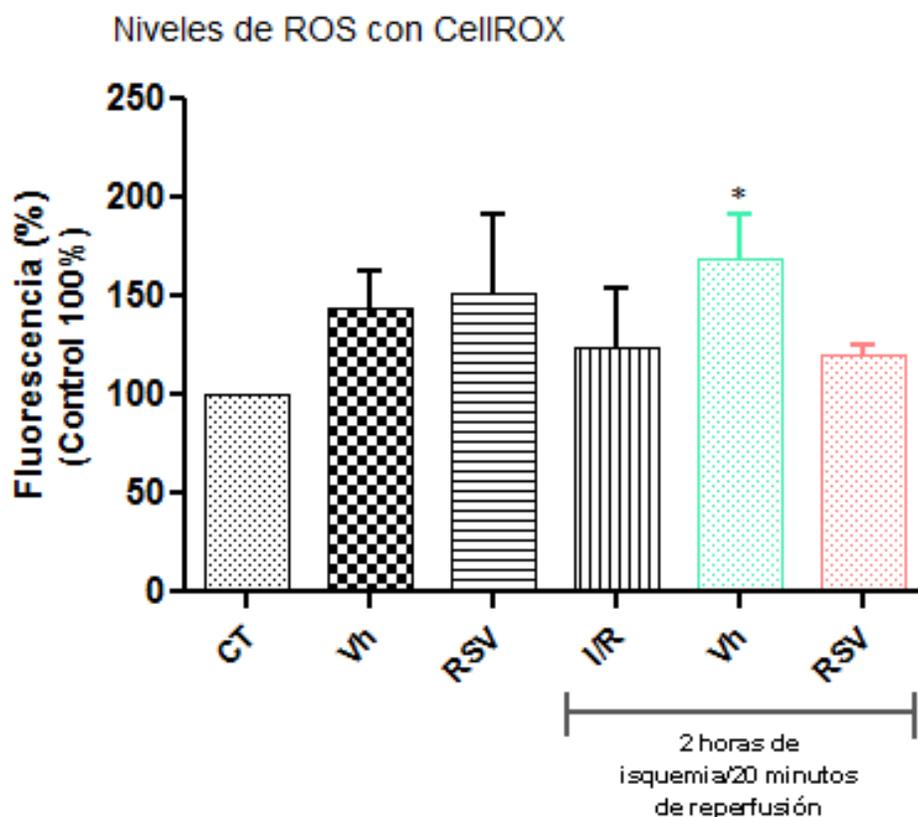


Figura 5. Niveles de ERO con el reactivo de CellROX. Nivel relativo de especies reactivas de oxígeno (ERO) (n=5). CT=Control Sano; RSV= Control sano que recibió tratamiento de RSV (1 mg/Kg de peso; i.v.; vehículo EtOH al 50%); Vh= control sano que recibió el tratamiento con solo vehículo (100µL de EtOH al 50%; i.v.); 2I/20´R=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de reperfusion (R); 2I/20´R+Vh=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos R y tratamiento con vehículo; 2I/20´R+RSV=ratas con 2 horas de isquemia y 20 minutos de R con tratamiento de RSV. Análisis de varianza, ANOVA; Tukey * $p < 0.05$.

VI. DISCUSIÓN

La I/R incrementa la fosforilación de la AMPK en una manera dependiente del tiempo, sin alterar los niveles de la AMPK total.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que después de 2 h de MCAO el nivel de la AMPK total, no se modifica; lo que coincide con observaciones previas (McCullough et al., 2005). Sin embargo, la I/R provoca alteraciones en la fosforilación de AMPK en la corteza frontoparietal, ipsilateral a la lesión. Estos cambios podrían estar asociados con la utilización de la glucosa en el cerebro y en el metabolismo energético durante la isquemia. De hecho, en el modelo de isquemia *in vivo* inducido por MCAO se ha demostrado la activación de AMPK y se ha sugerido que funciona de manera autónoma para recuperar el balance energético de la célula (Li et al., 2007).

La fosforilación de AMPK puede estar asociada a la disminución de los sustratos energéticos durante la I/R y ser el resultado de un mecanismo de compensación celular que se activa cuando la mitocondria se ve comprometida, por ejemplo debido a la falla en la fosforilación oxidativa (Culmsee et al., 2001; McCullough et al., 2005; Li et al., 2007; Li y McCullough., 2010; Wu et al., 2011). Es decir, la carencia de nutrientes durante la I/R altera las condiciones energéticas de las neuronas provocando un incremento en la proporción AMP/ATP, con esto AMPK se activa alostericamente para después ser fosforilada por cinasas como LKB1, la cinasa cinasa dependiente-calcio/calmodulina (CaMKK), la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP), Sirtuina1 (SIRT1) y factor de crecimiento transformante- β cinasa-1 (Shin et al., 2009). La fosforilación de AMPK es posible porque hay regiones en la corteza cerebral donde aún existe irrigación sanguínea por vasos colaterales que proporcionan, aunque en concentraciones limitadas, glucosa y oxígeno.

El curso temporal de fosforilación de AMPK que observamos, concuerda con lo reportado en otros grupos de trabajo en donde el nivel de pAMPK se

incrementa después de 2 h de MCAO (McCullough *et al.*, 2005) Sin embargo, estos grupos observan que la fosforilación se mantiene por periodos prolongados. Por ejemplo, en ratones sometidos a 2 h de MCAO, se incrementa la fosforilación de AMPK después de 90 min, y se mantiene estable hasta por 24 horas (McCullough *et al.*, 2005); en modelos *in vitro*, 2 h de privación de oxígeno y glucosa (OGD) provoca incrementos importantes en la fosforilación de AMPK los cuales se mantienen estables hasta por 6 h; en cultivos celulares sometidos a excitotoxicidad por glutamato, se observa un incremento en los niveles de AMP que activa a AMPK por tiempos prolongados (McCullough *et al.*, 2005; Weisová *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la I/R podría incrementar los niveles de la pAMPK por un tiempo superior al de los 120 min que nosotros evaluamos.

En nuestro modelo observamos un incremento en la fosforilación de AMPK, aunque esta no fue significativa, esto podría ser una consecuencia de la variabilidad del modelo de MCAO o a que utilizamos toda la región afectada por la I/R en donde se mezclan la zona de penumbra e infarto, lo que podría estar encubriendo el efecto. Adicionalmente, el bajo nivel de activación detectado en la fosforilación de AMPK podría estar asociado a la sobreproducción de ERO al inicio de la reperfusión (Peters *et al.*, 1999). Se ha visto que el 4-hidroxi-2-nonanal (producto de la lipoperoxidación) disminuye la actividad de LKB1 (Dolinsky *et al.*, 2009), en consecuencia se reduce la fosforilación de AMPK. Sin embargo, sería importante evaluar el efecto de la reperfusión por periodos prolongados.

El RSV incrementa los niveles de fosforilación de la AMPK después de 2 h de MCAO y diferentes tiempos de reperfusión.

El RSV tiene efectos protectores que regulan vías metabólicas y de función mitocondrial (Breen *et al.*, 2008; Price *et al.*, 2012). A pesar de que no se conoce a ciencia cierta el mecanismo, su efecto ha sido relacionado con la regulación del estrés oxidativo y la activación de AMPK (Baur y Sinclair *et al.*, 2006; Dasgupta y Milbrand, 2007). Se ha visto que el RSV tiene efectos en el metabolismo de la

glucosa a través de la activación de AMPK (Breen *et al.*, 2008), la cual protege a neuronas de hipocampo durante OGD, estrés metabólico, excitotóxico y oxidativo (Culmsee *et al.*, 2001).

En nuestro estudio, observamos que el tratamiento con RSV, no provoca cambios en los niveles totales de AMPK lo que coincide con lo reportado por Breen y *col.*, en su modelo *in vitro* (Breen *et al.*, 2008). Sin embargo, el tratamiento con RSV incrementó la fosforilación de AMPK en las ratas con isquemia sin y con reperusión. Estos resultados coinciden con reportes en donde el RSV incrementa la fosforilación de AMPK en diferentes tipos celulares incluyendo neuronas (Park *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

El mecanismo por el cual el RSV activa a AMPK no está bien descrito; sin embargo se han planteado diferentes hipótesis. Hay reportes que indican que el RSV es un activador de sirtuinas y éstas podrían estar involucradas en la estimulación de la fosforilación de AMPK. Ya que se ha visto una disminución en los niveles de pAMPK cuando se da tratamiento con nicotinamida (inhibidor de sirtuinas) y han demostrado que cuando se utilizan inhibidores específicos de SIRT-1 hay una disminución de la fosforilación de AMPK (Breen *et al.*, 2008; Price *et al.*, 2012). Otros autores reportan que la fosforilación de AMPK por el RSV depende de LKB1 (Dasgupta y Milbrand, 2007), y que aunque su mecanismo de acción no está bien descrito, este podría estar relacionado con la regulación del nivel de las ERO (Dolinsky *et al.*, 2009).

La MCAO durante 2 horas y los 20 minutos de reperusión provocan un aumento en los niveles de ERO

Para determinar si el efecto neuroprotector del RSV se relaciona con su actividad antioxidante, evaluamos el nivel de ERO en ratas sometidas a I/R y tratadas con RSV. El incremento que observamos puede deberse al aumento intracelular de calcio (Ca^{2+}) que ocurre por la sobreactivación de los receptores NMDA, este

desbalance iónico activa a la fosfolipasa A₂ (PLA₂), que genera ácido araquidónico (involucrado en la producción de ERO) (Lipton, 1999). El Ca²⁺ provoca daño en la mitocondria, debido a su incapacidad para amortiguar la entrada de este ion hacia su interior (Murphy *et al.*, 1999). Alterando la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones, permitiendo la liberación de electrones al espacio mitocondrial que pueden reaccionar con el oxígeno y producir ERO moderadamente en regiones isquémicas del cerebro donde la tensión parcial del oxígeno (O₂) es preservada por el flujo residual colateral (e.g. penumbra) (Back *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002). Sin embargo cuando hay un retorno repentino del aporte de oxígeno (reperfusión), esos electrones librados en la mitocondria reaccionan bruscamente con el O₂ provocando un incremento exacerbado en el nivel de ERO.

El aumento de ERO que observamos en este estudio, coinciden con lo reportado por Peters *et al.*, (1998), quienes demostraron que a los 20 minutos de perfusión se observa el máximo incremento en la producción de ERO, y que esta se mantiene elevada por lo menos durante 3 horas. Se ha reportado en modelos *in vitro* que la exposición a 100 μM de glutamato/10 μM de glicina durante 10 min incrementa la generación de anión superóxido (O₂⁻) (Castilho *et al.*, 1999). Debido a que durante la I/R se liberan grandes cantidades de glutamato, es probable que el incremento en el nivel de ERO detectado en nuestro modelo este asociado con este evento. Adicionalmente, se ha observado que en mitocondrias aisladas de neuronas de rata Wistar, la estimulación con 10 μM de Ca²⁺ incrementa la producción de ERO cuando el complejo I de la fosforilación oxidativa es inhibido por la rotenona (Starkov *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2003)) Dado que en la I/R, también se observa un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y está asociado a una falla mitocondrial, este podría ser otro mecanismo involucrado en la producción de ERO en nuestro modelo.

El tratamiento con RSV disminuye los niveles de ERO después de 2 horas de MCAO y 20 minutos de reperfusión.

No toda la producción de ERO y de especies reactivas de nitrógeno (ERN) es dañina, se ha demostrado que bajos niveles de producción de ERO tiene un efecto citoprotector (Thompson *et al.*, 2012). Por lo tanto, con la hipótesis de que la administración de antioxidantes al inicio de la reperfusión pueden contener el pico de ERO producido por la reperfusión evaluamos el efecto del RSV en el modelo de I/R.

En nuestro estudio observamos que el RSV disminuyó los niveles de ERO incrementados por la I/R. Aunque estos resultados no fueron significativos, existe una tendencia que nos podría indicar que el RSV está llevando a cabo su efecto antioxidante. Estos resultados coinciden con lo que se encontró anteriormente en nuestro grupo de trabajo, donde se evaluó el efecto protector del RSV y se encontró que el tratamiento al inicio de la reperfusión disminuye las células positivas a etidina, es decir las que produjeron altos niveles de ERO (Trejo-Quñones, 2014). En nuestro estudio, demostramos que el RSV disminuye la producción de ERO desde tiempo cortos, cuando se observa la máxima producción de O_2^- (Peters *et al*, 1999). Esto está apoyado por el reporte de Gülçin (2010) quien describió que el RSV es un antioxidante muy efectivo por encima de antioxidantes estándar como α -tocoferol y trolox, ya que tiene mayor afinidad por neutralizar el O_2^- . Estos datos además sugieren que el efecto protector del RSV está asociado a sus propiedades antioxidantes.

Por otro lado, debido a que el etanol al 50% fue utilizado como vehículo evaluamos su efecto en el nivel de ERO. Los resultados obtenidos demostraron que la administración de etanol incrementó de manera importante los niveles de ERO. Esto sugiere que el etanol promueve el estrés oxidativo sumándolo al provocado por la propia I/R. Estos resultados coinciden con los de otros autores, por ejemplo en ratas, el etanol puede perturbar mecanismos antioxidantes

intracelulares, incluyendo las vías del glutatión (GSH), GSH peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa (Schlorff *et al.*, 1999). También se ha reportado que el etanol incrementa la sensibilidad del cerebro al estrés oxidativo por daño mitocondrial (Ramachandran *et al.*, 2001). Además, el tratamiento con etanol incrementa de manera dependiente a la dosis el nivel de ERO, en particular del O_2^- , en un cultivo primario de neuronas (Boyadjieva and Sarkar, 2013). Lo que podría explicar el incremento observado cuando evaluamos el efecto del etanol con la sonda CellROX.

VII. CONCLUSIONES

En el modelo *in vivo* de isquemia cerebral observamos que la I/R incrementa la fosforilación de AMPK de manera dependiente del tiempo de la reperfusión, la cual comienza a disminuir a los 120 minutos de reperfusión.

El tratamiento con RSV incrementa la activación de AMPK, alcanzando el pico máximo de fosforilación a los 120 minutos de reperfusión.

Observamos que la I/R incrementa el nivel de ERO y que el tratamiento con RSV administrado al inicio de la reperfusión, disminuye el nivel de ERO hasta alcanzar niveles basales.

VIII. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alama Ortiz Plata en el departamento de Neuropatología Experimental del INNN por su participación con el proceso quirúrgico para inducir la MCAO.

Al CONACYT por el apoyo otorgado a Anayeli Narayana Pineda Ramírez (No. De becario 341607) para la realización de sus estudios de posgrado.

IX. REFERENCIAS

Arauz, A., Barinagarrementeria, F., Navarrete, H., Ascanio, G., Osorno, M., Miranda, L., Alegria, M. A., Escamilla, J. M. & Cantu, C. (2002) Acute management of cerebral infarction. *Rev Invest Clin*, 54: 266-70.

Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 5:493-506.

Bolaños J.P, Moro M.A., Lizasoain I, and Almeida A. (2009). Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61:1299–1315.

Boyadjieva N.I. and Sarkar D.K. (2013). Microglia play a role in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in developing hypothalamic neurons. *Alcohol Clin Exp Res*. 37(2): 252–262.

Breen, D.M., Sanli, T., Giacca, A., Tsiani, E. (2008). Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 374, 117–122.

Cabrera, A., Martínez, O., Laguna, G., Juárez, R., Rosas, V., Loria, J., Medellín, R., Cerón R., Sánchez, F., Álvarez, L., Rumbo, U., (2008) Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med Int Mex*, 24, 98-103.

Castilho R.F., Ward M.W., and Nicholls D.G. (1999) Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Acute Glutamate Excitotoxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells. *J. Neurochem*. 72 (4):1394-1401.

Culmsee C., Junker V., Kremers W., Thal S., Plesnila N. and Kriegstein, J. (2004) Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke*. 35:1197-202.

Culmsee C., Monnig J., Kemp B.E., Mattson M.P. (2001) AMPactivated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*. 17:45–58.

Dasgupta, B., Milbrandt, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *PNAS*. 104 (17), 7212-7222.

Dirnagl, U., Ladecola, C., Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.

Dolinsky, V.W., Chan A.Y.M., Frayne I.R, Light P.E., Rosiers C.D., Dyck J.R.B. (2009). Resveratrol Prevents the Prohypertrophic Effects of Oxidative Stress on LKB1. *Circulation*. 19:1643-1652.

Doyle P. K., Simon P.R., Stenzel –Poore P.M (2008) Neuropharmacology-Special Issue on Cerebral Ischemia Mechanisms of Ischemic Brain Damage. *Neuropharmacology*, 55(3): 310-318.

Durukan A, Tatlisumak T (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem and Behav*, 2007 May;87(1):179-97

Gülçin I. (2010) Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.11:210–218

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase- an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*. 25:1895–1908.

Hwang I.K., Yoo K.Y., Kim D.S., Jeong Y.K., Kim J.D., (2004) Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Life Sci*. 75: 1989–2001.

Kuramoto, N., Wilkins, M.E., Fairfax, B.P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T.G., Pangalos, M.N., Moss, S.J. (2007). Phospho-dependent functional modulation of GABA (B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*. 53:233–47.

Li, J., McCullough, D.L. (2010). Effects of AMP-ctivated protein kinase in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*; 30, 480-492.

Li, J., Zeng, Z., Viollet, B., Ronnett, G.V., McCullough, L.D. (2007) Neuroprotective effects of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke*. 38 (11):2992–2999.

Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79, 1431-568.

Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., (1994) Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med*, 330, 613–622.

Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R., (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84–91.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R., (1951) Protein measurement with the folin fenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.

Manwani B., and McCullough L.D. (2013) Function of the Master Energy Regulator Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase in Stroke. *Journal of Neuroscience Research*. 91:1018–1029.

McCullough, L.D., Zeng, Z., Hong, Li., Landree, L.E., McFadden, J., Ronnett, G.V. (2005). Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J Biol Chem*. 280:20493–502.

Nicholls, D.G., and Ward M.W. (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci*. 23, 166-174.

Park E.C., Kim M., Lee J.H., Min B., Bae H., Choe W., Kim S., Ha J (2007) Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp. Mol. Med*. 39(2):222-229.

Patel M.I., Gupta A., Dey C.S. (2011). Potentiation of neuronal insulin signaling and glucose uptake by resveratrol: the involvement of AMPK. *Pharmacological reports*. 63, 1162-1168.

Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., Dirnagl, U. (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 196-205.

Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, Y.J.A., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, J.B., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, S.J., Hubbard, P.B., Verela, T.A., Davis J.G., Varamini, B., Hafner A., Moaddel, R. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2; 15(5): 675–690.

Sanderson T.H., Reynolds C.A., Kumar R., Przyklenk K., Hüttermann M (2012). Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation. *Mol Neurobiol*. 47(1): 9-23.

Schlörff E.C., Husain K., Somani S.M. (1999) Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol*. 18(2-3):203-14.

Sousa S.C., Maciel E.N., Vercesi A.E., Castilho R.F. (2003) Ca₂⁺ induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Letters* 543:179-183.

Starkov, A.A., Polster, B.M. and Fiskum, G. (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax.J. *Neurochem.*83:220-228.

Sweeney, M. I., Yager, J. Y., Walz, W. & Juurlink, B. H. (1995) Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*, 73, 1525-35.

Thompson J.W., Narayanan S.V., Perez-Pinzon M.A. (2012). Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning. *Curr Neuropharmacol.* 10(4):354-69.

Trejo-Quiñones, Y., 2014. Evaluación del efecto del resveratrol en el daño celular, la producción de eros y la expresión del tgf-β1 en un modelo de isquemia cerebral en rata. Tesis Licenciatura. UNAM.

Wang R.Y., Xiao-yu L., Shu-wei Jia Jian Zhao Dan Cui Ling Wang (2014). Resveratrol Protects Neurons and the Myocardium by Reducing Oxidative Stress and Ameliorating Mitochondria Damage in a Cerebral Ischemia Rat Model. *Cell Physiol Biochem.* 34:854-864.

Ward W.M., Rego A.C., Frenguelli G.B., Nicholls G.D (2000) Mitochondrial Membrane Potential and Glutamate Excitotoxicity Cultured Cerebral Granule Cells. *The Journal of Neuroscience.* 20(19):7208-7219.

Weisová, P., Concannon C.G., Devocelle, M., Prehn, M.H.J., Ward, W.M. (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.* 29(9):2997-3008.

Wu Y., Li X., Zhu X., Zhu J.X., Wenjie X., Le W., Zhen F., Jankovic J., Pan T (2011) Resveratrol-Activated AMPK/SIRT1/Autophagy in Cellular Models of Parkinson's Disease. *Neurosignals.* 19:163-174.

Yousuf S., Atif F., Ahmad M., Hoda N., Ishrat T., Khan B., Islam F (2009) Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Research* 1250:242-253.

Zhu J., Dagda R.K., and Chu C.T. (2011). Monitoring Mitophagy in Neuronal Cell Cultures. *Methods Mol Biol.* 793: 325–339.