



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA "MANUEL
VELASCO SUAREZ"

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Efecto del resveratrol sobre la actividad de unión de los factores
de transcripción Sp y NRF1 en un modelo *in vivo* de isquemia
cerebral

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.B.P Iván Mijaíl Alquisiras Burgos

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alejandro Millán Vega

CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Penélope Aguilera

Chilpancingo, Gro, Febrero del 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 11 días del mes de septiembre de dos mil catorce, 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 actividad de unión de los factores de transcripción Sp y NRF1 en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral", presentada por el alumno Iván Mijail Alquisiras Burgos, 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

Dr. Alejandro Millán Vega
Dirección de tesis

Dr. Pável Sierra Martínez

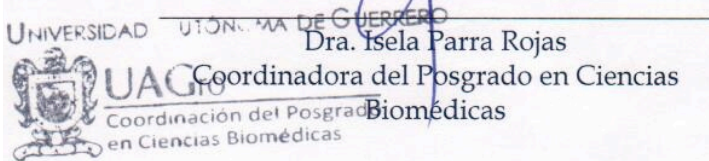
Dr. Donaciano Flores Robles

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Penélope Aguilera Hernández

Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UAGro.
Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas
Vo. Bo
Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vasculare Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” (INNNMVS) en el Distrito Federal México.

Bajo la dirección del

Dr. Alejandro Millán Vega

La codirección de

Dra. Penélope Aguilera

La asesoría de

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Pavel Sierra Martínez

Y el apoyo técnico del

Dr. Pavel Montes de Oca

Durante el periodo en el que el QBP. Iván Mijaíl Alquisiras Burgos Curso la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca CONACyT (Nº 445084). Además recibió apoyo del Banco Santander al otorgarle la beca de Movilidad Nacional Santander durante el periodo de Enero-Julio 2014

Agradecimientos

Dr. Alejandro Millán Vega

Gracias por permitirme formar parte del equipo de trabajo y por la confianza depositada en mi para la culminación de este proyecto.

Dra. Penélope Aguilera

Gracias por la asesoría académica prestada durante mi estancia en el INNNMVS que me permitió crecer profesionalmente hasta convertirme en un estudiante capacitado y comprometido con las exigencias del posgrado.

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Le agradezco la confianza y el apoyo al incluirme en el equipo de trabajo.

Dr. Donaciano Flores Robles, Dr. Pavel Sierra Martínez, Dra. Ma. Elena Moreno Godínez y la Dra. Gloria Fernández Tilapa.

Gracias por las aportaciones académicas para culminar este proyecto de manera exitosa.

Dedicatorias

A mi madre y familia por el apoyo incondicional otorgado para el crecimiento y desarrollo de mi vida académica.

A la M en C. Irlanda Peralta por estar a mi lado en esta etapa de mi vida e impulsar mis proyectos académicos.

A la familia Muñiz - Alquisiras por el apoyo incondicional durante mi estancia en la ciudad de México.

“El investigador debe ser libre para desarrollar su ciencia”

Iván Alquisiras

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	2
III.	INTRODUCCIÓN.....	3
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
VI.	CONCLUSIONES.....	23
VII.	PERSPECTIVAS.....	23
VIII.	ANEXOS.....	24
IX.	REFERENCIAS.....	25

I. RESUMEN

La isquemia cerebral resulta de la reducción del flujo sanguíneo debido a la obstrucción o trombosis de una arteria cerebral importante. Este evento puede activar vías de muerte o supervivencia celular dependiendo de diversos factores, como es la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas durante la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo. La administración de antioxidantes [e. g. resveratrol (RSV)] promueve la supervivencia neuronal a través de la activación de mecanismos dependientes del estado REDOX celular que aún no están claramente identificados. Los factores transcripcionales de la familia de la proteína específica (Sp) y el factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) son regulados por ERO. Estos factores participan en la transcripción de genes implicados en la transmisión sináptica y el metabolismo energético neuronal, indispensables en la supervivencia celular. Por ello, en este estudio, se investigó el efecto del RSV en la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 al ADN en un modelo in vivo de isquemia cerebral. **Métodos** Ratas Wistar macho (250 a 350 g) se sometieron a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 2 h y a diferentes tiempos de reperfusión (0, 15, 30, 60 y 120 min). El RSV se administró (1 mg/kg, i. v.; diluido en etanol al 50%) al inicio de la reperfusión. Se extrajeron proteínas nucleares de la corteza cerebral parietal y se analizó la actividad de unión mediante el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). **Resultados.** Encontramos que la I/R activa a los factores Sp y NRF1. La máxima actividad de unión para ambos factores se observó después de 15 min de reperfusión (Sp: 222.13% y NRF1: 167.3%). El RSV previno el aumento en la actividad los factores Sp y NRF1 inducida por la isquemia (Sp: 96.8%. y NRF1: 106.4%). **Conclusiones.** El efecto del RSV en la actividad de Sp y NRF1 podría favorecer la supervivencia neuronal después del daño isquémico. Por un lado, permitiendo la expresión de genes relacionados con el restablecimiento energético como el del transportador de glucosa y las subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial. Por otro lado, modulando la expresión de las subunidades del receptor NMDA y consecuentemente las complicaciones por excitotoxicidad por glutamato.

II. ABSTRACT

Introduction: Cerebral ischemia results from decreased blood flow due to obstruction or thrombosis of a major cerebral artery. This event can trigger cell death or cell survival pathways depending on various factors such as the concentration of reactive oxygen species (ROS) produced during ischemia and the recovery of blood flow. The administration of antioxidants [e. g. resveratrol (RSV)] promotes the activation of neuronal survival pathways, through mechanisms dependent cellular redox state that are not clearly identified. The transcription factors of the family of specific protein (Sp) and nuclear respiratory factor 1 (NRF1) are regulated by ROS. These factors are involved in the transcription of genes involved in synaptic transmission and neuronal energy metabolism, indispensable to cell survival. Therefore, in this study was investigated, the effect of RSV in the binding activity to DNA of transcription factors Sp and NRF1 in an *in vivo* model of brain ischemia. **Methods:** Male Wistar rats (250-350 g) were subjected to occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) for 2 h and different times of reperfusion (0, 15, 30, 60 and 120 min). RSV was administered (1mg/kg, i.v, diluted in ethanol to 50%) at the beginning of reperfusion. Nuclear proteins were extracted from the parietal cortex and the binding activity was analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results.** We found that I/R activate the transcription factors Sp and NRF1. The maximum binding activity of both factors was observed after 15 min of reperfusion (Sp: 222.13% and NRF1: 167.3%). RSV prevented the increase in the activity of transcription factor Sp and NRF1 induced by I/R (Sp: 96.8% and NRF1 106.4%). **Conclusions.** The effect of RSV on the binding activity of Sp and NRF1 could promote the neuronal survival after ischemic damage. Probably, by allowing the expression of genes related with the energy restoration as glucose transporter and the subunits of the mitochondrial respiratory chain. Furthermore, by modulating the expression of NMDA receptor subunits and consequently decreasing the complications of glutamate excitotoxicity.

III. INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral resulta de la reducción del flujo sanguíneo, debido a un émbolo o trombosis en una arteria cerebral importante, que en la mayoría de los casos es la arteria cerebral media (Durukan y Tatlisumak, 2007). Esta situación conlleva a una inmediata reducción de la actividad neurológica en la zona directamente irrigada por la arteria que fue obstruida, formándose el núcleo isquémico o zona de infarto donde el daño neuronal es irreversible. Sin embargo, rodeando al área de infarto, existe una segunda zona de daño denominada zona de penumbra; la cual permanece funcional aunque existe el riesgo potencial de que esta zona se afecte irreversiblemente si el flujo sanguíneo no es restablecido durante los primeros minutos de la isquemia (Durukan y Tatlisumak, 2007).

La reducción en el flujo sanguíneo, disminuye el suministro de oxígeno y glucosa provocando un déficit energético que afecta de manera inevitable la actividad de las proteínas dependientes de ATP. Una de las principalmente afectadas, es la bomba de Na^+/K^+ , encargada de mantener el potencial de membrana celular. Su inactivación provoca la despolarización de la membrana neuronal induciendo la liberación excesiva de glutamato al medio extracelular (Moskowitz *et al.*, 2010). El colapso energético afecta también a los transportadores de glutamato, que en condiciones normales transportan al glutamato al interior de las células gliales, manteniendo las concentraciones extracelulares en niveles fisiológicos (Fu *et al.*, 2005). Sin embargo, durante un episodio de isquemia cerebral las células gliales se despolarizan (Arango *et al.*, 2008), impidiendo que el glutamato sea internalizado. De esta manera, también contribuyen a que la concentración de este aminoácido aumente en el espacio extracelular hasta niveles tóxicos (Luján, 2004).

Como consecuencia del aumento de glutamato en el espacio extracelular, se observa la sobreactivación de sus receptores neuronales ionotrópicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales son altamente permeables a Ca^{2+} . Debido a que estos receptores no se desensibilizan, se desencadena una internalización masiva de Ca^{2+} al espacio citoplasmático (Nakamichi y Yoneda, 2005; Hardingham, 2009).

En condiciones fisiológicas la mitocondria amortigua la concentración

citoplasmática de Ca^{2+} ; sin embargo, en la isquemia cerebral se sobrepasa su capacidad amortiguadora provocando un daño mitocondrial irreversible. Este daño está asociado a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot) (Nicholls *et al.*, 2000; Murphy, 2009).

Los niveles elevados de ERO generados en el área de infarto provocan la oxidación de biomoléculas como proteínas, enlaces dobles de fosfolípidos y ADN nuclear. De esta manera, se promueve la peroxidación lipídica y daño a prácticamente cualquier componente celular. Sin embargo, en la penumbra, donde los niveles de ERO son menores, se observa la activación de vías de señalización involucradas con la muerte neuronal programada o de la supervivencia en forma dependiente del tiempo de isquemia y el déficit energético (Thomson *et al.*, 2012).

Entre los genes inducidos por ERO se encuentran algunos involucrados con el funcionamiento de la sinapsis y la plasticidad neuronal como las subunidades del receptor NMDA (*Grin1*, *Grin2A* y *Grin2B*); así como genes involucrados con el restablecimiento del metabolismo energético como los transportadores de glucosa (*Glut*) 1, 2 y 3, y el complejo IV mitocondrial [la citocromo c oxidasa (COX), que participa en la fosforilación oxidativa y la generación de ATP]. Todas estas proteínas son esenciales en la inducción de la neuroprotección durante un proceso isquémico (Okamoto *et al.*, 2002; Dhar *et al.*, 2009; Priya *et al.*, 2013; Durukan y Tatlisumak, 2007; Arango *et al.*, 2008).

Asimismo, en el evento denominado pre-acondicionamiento isquémico, se ha demostrado que los niveles moderados de ERO generadas por la mitocondria, inducen la activación de vías de señalización que promueven la transcripción de genes involucrados en la supervivencia neuronal principalmente la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (e. g. *Glut* 1,2,3 y COX) (Bai *et al.*, 1998; Nicholls *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2003; Murphy, 2009; Thomson *et al.*, 2012). Este es un mecanismo protector innato celular que se activa por la exposición isquémica leve, que consideramos podría simularse empleando antioxidantes. Es decir, el empleo de antioxidantes podría prevenir el crecimiento del área de infarto y favorecer la activación de

mecanismos asociados a la supervivencia celular (dirigidos a mantener las concentraciones de ATP a niveles fisiológicos), tal como ocurre en la zona de penumbra cuando los tiempos de isquemia y reperfusión son cortos.

Diversos estudios han demostrado que la utilización de compuestos antioxidantes en modelos de isquemia cerebral proporciona un efecto neuroprotector (Hardingham, 2010; Moskowitz *et al.*, 2010; Matteucci *et al.*, 2011). El resveratrol (trans-3, 4', 5-trihydroxystilbene) (RSV) es una fitoalexina natural que se encuentra en una gran variedad de frutas y semillas. Esta molécula se encuentra en la naturaleza en conformación *cis* y *trans*, siendo la conformación *trans* la forma activa y que posee actividades biológicas que validan el interés de su investigación en modelos experimentales de enfermedades humanas (Lamuela *et al.*, 1995; Catalgol *et al.*, 2012).

Una característica importante del RSV, es su alta capacidad para capturar el anión O_2^- (Gülcin, 2010), el cual se genera en grandes cantidades durante la isquemia cerebral (Peters *et al.*, 1998). Se ha demostrado que una dosis única de 1 mg/kg de RSV administrada al inicio de la reperfusión disminuye el nivel de ERO en un 82% (Trejo, 2014). Esta disminución en el nivel de ERO detectado coincide con una disminución en el número de células positivas a fluorojade, un indicador de la neurodegeneración neuronal (Trejo, 2014).

Se han sugerido diversos mecanismos por los cuales el RSV podría ejercer su efecto neuroprotector. Por ejemplo, el RSV al modular los niveles de ERO podría permitir la activación de vías de neuroprotection similares a las que se activan en el precondicionamiento isquémico (Narayanan *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha determinado cual es el mecanismo empleado.

Tenemos evidencia de que en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular y el metabolismo energético como los transportadores de glucosa 1, 3 y 4, es aumentada por el RSV, esto ocurre después de 2 h de isquemia inducida por la MCAO seguida de 4 h de reperfusión (Tornes, 2014). Este incremento sugiere que el RSV puede ayudar a superar el fracaso energético al favorecer la entrada de glucosa y consecuentemente la síntesis de ATP durante la isquemia cerebral, previniendo así la muerte neuronal. Además, el RSV disminuye la expresión de las subunidades del receptor NMDA *Grin1*, *Grin2A* y *Grin2B*

después de 2 h de isquemia y 2 h de reperfusión (Cerón, 2013). Debido a que la expresión de las subunidades del receptor NMDA se ve aumentada durante la isquemia cerebral, posiblemente contribuye con las complicaciones y muerte celular por excitotoxicidad por glutamato durante la isquemia; por lo tanto, el efecto del RSV podría contribuir a disminuir el daño.

Es importante destacar que las regiones promotoras de los genes de los transportadores de glucosa y las subunidades del receptores NMDA tienen sitios de unión a diversos factores de la familia de la proteína específica (Sp) y el factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) (Okamoto *et al.*, 2002; Dhar *et al.*, 2009; Priya *et al.*, 2013). En este contexto la actividad neuroprotectora del RSV podría ser atribuible a su capacidad de modular la actividad de los factores transcripcionales Sp y NRF1, los cuales regulan la expresión de genes involucrados en supervivencia y muerte celular. Por ello, estos factores transcripcionales se vuelven un posible blanco terapéutico para reducir el daño durante la isquemia cerebral. Es por eso que nos planteamos determinar el efecto del RSV sobre la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 durante la I/R.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal

Se utilizaron ratas wistar macho con un peso corporal de 280 a 320 g procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. Durante el proyecto las ratas fueron mantenidas en jaulas de acrílico, bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (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 establecidos por la Norma Oficial Mexicana para la Producción Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Diseño experimental

Se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) para evaluar la actividad de unión de los factores Sp1 y NRF1 en la corteza frontoparietal ipsilateral a la lesión. Para este análisis los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos experimentales: control (**CT**) sin tratamiento; control más vehículo (**CT+VH**) al que se administró 200 µl de etanol (EtHO) al 50% i. v por la vena caudal; control más RSV (**CT+ RSV**), al que se le administró 1 mg de RSV/kg de peso (diluido en EtHO al 50%) i. v. por la vena caudal; el isquemia/reperfundido (**I/R**), en el que las ratas se sometieron a 2 h de isquemia y a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 min) de reperfundición; el I/R más vehículo (**I/R+VH**), en el que a las ratas se sometieron a 2 h de isquemia y 15 min de reperfundición a las cuales se les administró el EtOH al inicio de la reperfundición; y el sometido a I/R más RSV (**I/R+RSV**), en el que a las ratas se sometieron a 2 h de isquemia y 15 min de reperfundición a las cuales se les administró el RSV al inicio de la reperfundición.

Modelo experimental de I/R.

Para inducir la isquemia cerebral transitoria se utilizó la técnica de MCAO descrita por Longa *et al.* (1989). Las ratas se anestesiaron con isofluorano al 2%. Inicialmente la bifurcación de la carótida cervical fue expuesta a través de una incisión en el cuello del animal. Posteriormente, un monofilamento de nylon de 3-0 se introdujo a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm). En este punto el filamento ocluyó el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media. Después de 2 h de oclusión el filamento se retiró cuidadosamente; los animales en esta etapa fueron anestesiados y suturados nuevamente con la finalidad de permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión). Las ratas se sacrificaron después de 0, 15, 30, 60 y 120 min de perfusión por decapitación.

Pruebas conductuales

Después de 2 h de oclusión se realizaron 2 pruebas conductuales para determinar el estado neurológico del animal: 1) Flexión *de la pata contralateral a la lesión*, las ratas se suspendieron por la base de la cola y la postura de los miembros delanteros fue observada. Las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, mientras que los animales con daño doblan la pata contralateral como consecuencia de la lesión; y 2) Conducta de giro, las ratas fueron sostenidas por la base de la cola permitiéndoles moverse libremente al apoyar las patas delanteras; se observó la dirección del movimiento durante 30 segundos. Los animales dañados realizan al menos 5 vueltas en sentido contralateral a la lesión.

Administración del RSV

El RSV (Sigma; No. R5010) a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal se administró en 100 μ L de etanol al 50 % (5 mM) por vía intravenosa (v.i.) por la vena caudal) al inicio de la perfusión en una dosis única. De la misma manera se administraron 100 μ L de vehículo (EtOH al 50 %).

Extracción de proteínas nucleares

Se siguió el protocolo propuesto por Priya A. *et al* (2013). Se utilizaron 5 g de tejido de la corteza cerebral de la región frontoparietal ipsilateral a la lesión. El tejido se disgregó en 500 µl de buffer "A" [Hepes 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma, P8340; 1:100)] y se incubó en hielo durante 15 min. Después se adicionaron 25 µl de Nonidet P-40 (10%) y la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg. Se eliminó el sobrenadante (proteínas citoplasmáticas) y al concentrado nuclear se le adicionaron 50 µl de Buffer "C" (Hepes 20 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM conteniendo inhibidores de proteasas). El concentrado nuclear se agitó suavemente durante 30 min en frío. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y el sobrenadante (proteínas nucleares) se separó en tubos nuevos. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y se hicieron alícuotas de 10 µg de proteína las cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).

La actividad de unión al ADN de los factores transcripcionales Sp y NRF1 se analizó mediante EMSA. Los oligonucleótidos utilizados (Eurofins mwg/operon) en el ensayo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados para ensayos EMSA con las secuencias consenso para los factores Sp y NRF1.

Factor	Cadena	Oligonucleótidos	Referencia
Sp	5'-3'	ATTCGATCGGGGCGGGAG	Gaudreault, et al., 2013; Ramos, et al., 2007.
	5'-3'	CTCCCGCCCCGATCGAAT	
NRF1	5'-3'	TTTTGCGCGCTCCAAGCATTACGCCAACGCAGGCGCGC	Dhar y Wong-Riley, 2009.
	5'-3'	TTTTGCGCGCCTGCGTTGGCGTAAATGCTTGGAGCGCGC	

Marcaje de oligos

Los oligonucleótidos fueron marcados con biotina en los extremos OH-3' utilizando el Kit ADN 3' End Biotinylation (Pierce Prod. No. 89818). Se preparó la reacción de marcaje mezclando los reactivos de marcaje (10 μ l de amortiguador de reacción TdT [5X], 1 μ l de oligo de la muestra [5 pmol], 5 μ l de Biotina-11-UTP [5 μ M], 5 μ l de TdT Diluidas [2 U/ μ l], 29 μ l de H₂O)

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 min. En seguida se adicionaron 2.5 μ l de EDTA 0.2 M para detener cada reacción y 50 μ l de cloroformo: alcohol isomílico (24:1) a cada reacción para extraer las TdT. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 16,000 rpm durante 2 min para separar las fases, se retiró el sobrenadante y se almacenó. El marcaje de oligos complementarios se realizó por separado y se alinearon antes de su uso mezclando volúmenes iguales y desnaturalizando la mezcla a 90°C por 1 min dejando enfriar lentamente a temperatura ambiente.

Ensayo de retardamiento

Los ensayos EMSA se realizaron utilizando el kit quimioluminiscencia LightShift EMSA (Pierce, No. 20148). Se emplearon 10 μ g de extracto de proteína nuclear y 0.2 ng de oligonucleótidos marcados con biotina, los cuales fueron mezclados en frío con los reactivos de unión (2 μ l de amortiguador de unión [10X], 1 μ l de EDTA [200 mM], 1 μ l de MgCl₂ [100 mM], 1 μ l de KCL [1M], 1 μ l de glicerol [50%], 0.5 μ l de Poly di:dc [1 μ g/ μ l], 5 μ l de extractos nucleares [2 μ g], 2 μ l de oligo marcado con biotina [5 fmol], 7 μ l de H₂O)

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 min., posteriormente, las mezclas de reacción se corrieron en un gel de poliacrilamida al 5% con amortiguador TBE 0.5X (Tris 450 mM, ácido bórico 450 mM, EDTA 10 mM) frío en una cámara de electroforesis (Bio-Rad) sumergida en hielo a 50 V por 2 horas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nylon cargadas positivamente (Biodyne, No. 60207).

La transferencia se realizó en una cámara húmeda de transferencia (Bio-Rad) empleando amortiguador TBE 0.5X frío a 380 mA por 45 min. Para unir los

oligos a la membrana, las membranas se reticularon a 120 mJ/cm² en un crosslinker automático (Amersham Biosciences) por 1 min.

Revelado

Para el revelado de las bandas se utilizó el kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Pierce, No. 89880). La membrana se incubó con 15 ml de buffer de bloqueo a temperatura ambiente por 30 min en agitación suave. En seguida se adicionaron 50 µl del conjugado estreptavidina- peroxidasa de rábano diluido en 15 ml de buffer de bloqueo (1:300) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en agitación suave. Pasados los 30 min el buffer de bloqueo con enzima se desechó y fue sustituido por 5 ml de buffer de lavado 1X para retirar el exceso de enzima; se realizaron 4 lavados con 15 ml de buffer de lavado 1X por 5 min a temperatura ambiente en agitación suave. En el último lavado el buffer de lavado 1X fue sustituido por 15 ml de sustrato equilibrado y la membrana se incubó por 5 min.

En seguida, se trabajó la membrana se montó en un casete de revelado, se adicionó 1 ml de la solución de luminol + peróxido de hidrógeno (1:1) y se expuso a un film (Kodak Biomax light film) por 10 min. En seguida el film fue sumergido en solución reveladora (Sigma-Aldrich, No. P7042-1GA) diluida en agua (1:4) durante 2 min hasta la aparición de las bandas, el film fue lavado con agua y en seguida fue sumergida en solución fijadora (Sigma-Aldrich No. P7167-1GA) diluida en agua (1:4). Posteriormente, el film fue lavado con agua y secado para su posterior análisis. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

Ensayos de competencia

Se mezclaron extractos nucleares y el oligo (10 fmol) con la secuencia consenso específica, observándose unión y retardamiento. Para determinar que la señal fuera específica se utilizaron dos condiciones, una adicionando un exceso de oligo específico no marcado (10 pmol) y otra adicionando oligo heterólogo no marcado (10 pmol). (Figuras 1A y 2A).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism; utilizando un análisis de variancia One way -ANOVA para comparación de medias de más de 3 grupos; tomándose como resultado significativo una $p < 0.05\%$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha descrito que diversos mecanismos celulares esenciales, tales como la expresión de genes, están fuertemente influenciadas por el equilibrio oxidoreducción (REDOX) celular (Valko *et al.*, 2007). Múltiples estudios sugieren que las ERO como el radical $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y el HO^{\cdot} modulan la expresión génica a través de la activación e inactivación de cinasas y factores transcripcionales sensibles al estado REDOX (Held *et al.*, 2012). Los antioxidantes, debido a su capacidad para interactuar con las ERO, regulan este equilibrio REDOX celular que está alterado durante la I/R (Panickar *et al.*, 2011).

Efecto de la MCAO y la reperfusión sobre la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1.

Con el objetivo de determinar el curso temporal de activación de estos factores, evaluamos el efecto de 2 h de MCAO y de los diferentes tiempos de reperfusión (0, 15, 30, 60 y 120 min) sobre la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 a su secuencia consenso.

Al evaluar la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp, encontramos que la isquemia cerebral incrementa la actividad de unión en el grupo **I/R(0min)** en un 90.8% respecto al grupo **CT**. La máxima actividad de unión se observó después de 15 min de reperfusión en el grupo **I/R(15min)** con 222.13% de unión, siendo estadísticamente significativo respecto al control ($p > 0.05\%$). También, observamos que la actividad fue disminuyendo gradualmente hasta no observarse diferencias estadísticamente significativas respecto al **CT**, esto ocurrió a los 120 min después de la reperfusión en el grupo **I/R(120 min)** con una actividad de 133.5% (ANOVA, $p < 0.05$) (Figura 1 B).

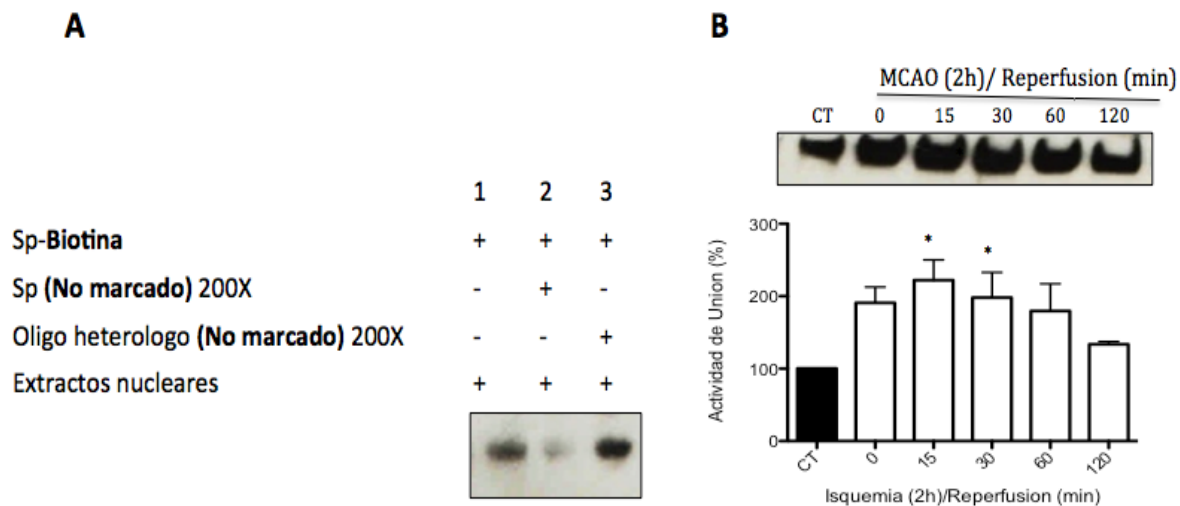


Figura 1. Actividad de unión de los factores transcripcionales Sp. (A) *Ensayos de competencia.* Carril 1, oligo con secuencia de unión para Sp marcado con biotina + extractos nucleares (EN); carril 2, oligo con sitios de unión Sp marcado con biotina + exceso de oligo homólogo (sitios de unión Sp) no marcado (200X) + EN; carril 3, oligo con sitios de unión Sp + exceso de oligo heterólogo marcado (200X) + EN. Debido a que la sonda homóloga compite por la unión del factor, con la que se observa una disminución de la unión, pero no con la sonda heteróloga, el experimento demuestra la especificidad de la unión. (B) *Curso temporal de unión a su sitio consenso de los factores Sp.* Las ratas Wistar fueron divididas aleatoriamente en 6 grupos, control y sometidas a 2 h MCAO y a diferentes tiempos de reperusión. **CT**: ratas control; **I/R(0min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 0 min de reperusión; **I/R(15min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 15 min de reperusión; **I/R(30min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 30 min de reperusión; **I/R(60min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 60 min de reperusión; **I/R(120min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 120 min de reperusión. A partir de los cerebros se diseccionaron cortezas frontoparietales ipsilaterales y extrajeron proteínas nucleares que fueron incubadas con oligos con la secuencia de unión para Sp marcado con biotina (n =4). Se realizó un análisis de variancia One way –ANOVA, $p < 0.05\%$.

Al evaluar la actividad de unión del factor transcripcional NRF1 encontramos que su actividad también se incrementó después de 2 h de isquemia en el grupo **I/R(0min)**, observándose un 151.2% de unión respecto al grupo **CT**. La máxima actividad se observó 15 min después de la reperusión en el grupo **I/R(15min)** con un 167.3%, y se mantuvo elevada hasta los 30 min en el grupo **I/R(30 min)** con un 162.7 %, ambas tuvieron una diferencia estadísticamente significativa respecto al **CT** (ANOVA, $p > 0.05\%$); disminuyendo gradualmente hasta no observarse diferencia estadísticamente significativa respecto al **CT**, esto después de 120 min de reperusión en el grupo **I/R(120 min)** con un 136.02% (ANOVA, $p < 0.05$) (Figura 2B).

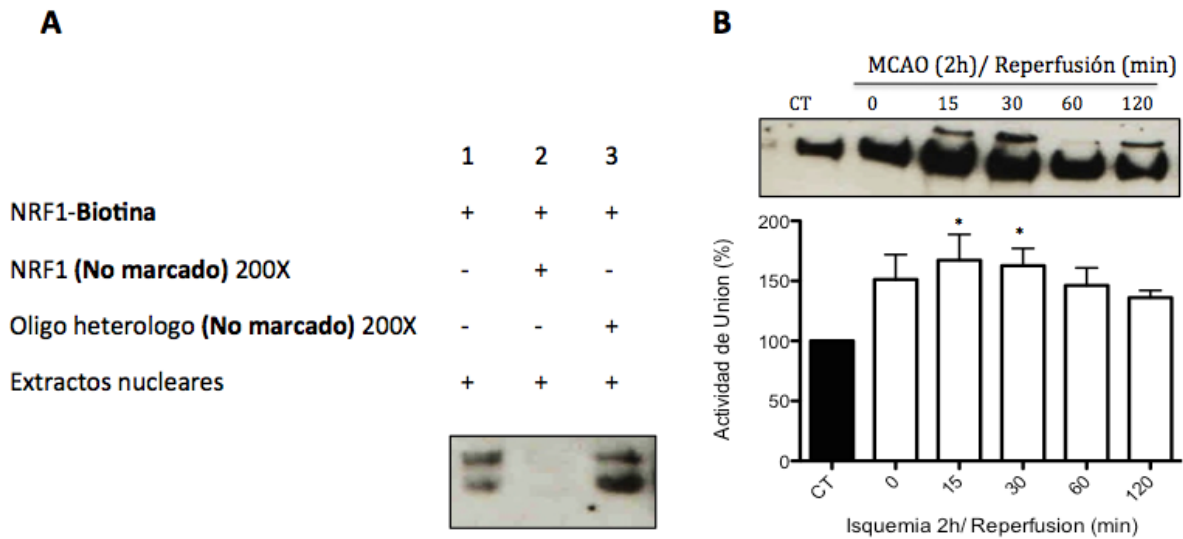


Figura 2. Actividad de unión del factor NRF1(A) *Ensayos de competencia*. Carril 1, oligo con secuencia de unión para NRF1 marcado con biotina + extractos nucleares (EN); carril 2, oligo con sitios de unión NRF1 marcado con biotina + exceso de oligo homólogo (sitios de unión NRF1) no marcado (200X) + EN; carril 3, oligo con sitios de unión NRF1 + exceso de oligo heterólogo no marcado (200X) + EN. Debido a que solo la sonda homóloga compite por la unión del factor, observada con la disminución de la unión, el experimento demuestra la especificidad de la unión. (B) *Curso temporal de unión a su sitio consenso del factor NRF1*. Las ratas Wistar fueron divididas aleatoriamente en 6 grupos, control y sometidas a 2 h MCAO y a diferentes tiempos de reperfusion. **CT**: ratas control; **I/R(0min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 0 min de reperfusion; **I/R(15min)**: ratas sometidas a 2h de MCAO y 15 min de reperfusion; **I/R(30min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 30 min de reperfusion; **I/R (60min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 60 min de reperfusion; **I/R(120min)**: ratas sometidas a 2 h de MCAO y 120 min de reperfusion. A partir de los cerebros se diseccionaron cortezas frontoparietales ipsilaterales y extrajeron proteínas nucleares que fueron incubadas con oligos con la secuencia de unión para NRF1 marcado con biotina (n =4). Se realizó un análisis de variancia One way –ANOVA, $p < 0.05\%$.

La proteína cinasa B (PKB), también conocida como AKT, es activada por acción de ERO (Friguls *et al.*, 2001; Huang y Hee-Yong, 2006; Yalcin *et al.*, 2010; Chetram *et al.*, 2013). Una vez activa, fosforila a los factores transcripcionales de la familia Sp, los cuales se encuentran expresados de forma constitutiva en el citoplasma celular. La fosforilación permite su translocación nuclear y la unión a su secuencia consenso en el promotor de sus genes blanco (Pore *et al.*, 2004). Nuestros resultados concuerdan con la evidencia que indica que después de 1 h de isquemia se activa AKT (Friguls *et al.*, 2001). La activación de AKT durante la isquemia explicaría el aumento en la actividad de unión de los factores que observamos después de 2 h de

isquemia; este incremento incluso podría estar en la fase terminal de activación de AKT inducida por la isquemia. Adicionalmente, observamos un incremento en la actividad de unión de los factores Sp a los 15 min de reperfusión. Este aumento podría representar un segundo pico de activación de la cinasa, que coincide con la generación de grandes cantidades de ERO durante los primeros 20 min de reperfusión (Peters *et al.*, 1998).

La familia de factores transcripcionales Sp incluye a los factores Sp1, Sp3 y Sp4, siendo Sp1 y Sp4 los que participan como promotores de la transcripción génica, mientras que Sp3 participa como un inhibidor de la transcripción. Debido a que los 3 factores transcripcionales se unen a la misma secuencia consenso, la dirección de la transcripción dependerá de que factor se une primero (Bouwman y Philipsen, 2002; Sapetschnig *et al.*, 2004).

El modelo propuesto por Hota *et al* (2010) sugiere que Sp3 es sensible a la oxidación por ERO; esto se debe a que su secuencia aminoacídica es rica en cisteínas, un aminoácido sensible a oxidación (Ryu *et al.*, 2003; Held *et al.*, 2012). La oxidación de las cisteínas en el factor Sp3 impide la unión a su secuencia consenso y debido a que es un modelo por competitividad la oxidación de Sp3, permite que Sp1 y Sp4 (los cuales fueron activados por AKT) se unan al promotor, promoviendo la transcripción. Es decir, el incremento en la producción de ROS durante la I/R, podría inhibir la unión de Sp3 al ADN; esta situación favorecería la unión de Sp1 y Sp4, ocasionando un aumento en la transcripción de sus genes blanco. En nuestro estudio sería importante determinar qué factores Sp se están uniendo al ADN por efecto de la I/R.

Asimismo, la activación de AKT por ERO permite la activación del factor transcripcional NRF1 (Piantadosi *et al* 2006). El factor NRF1 activo se transloca al núcleo favoreciendo la unión a su sitio consenso en el promotor de sus genes blanco (e. g. *Glut 1, 2 y 3, COX, Grin1, Grin2A y Grin2B*) promoviendo su expresión. Por ello, el incremento en la actividad de Sp1 y NRF1 que observamos concuerdan con la evidencia que indica que durante la I/R aumenta la expresión del RNAm de las subunidades del receptor glutamatérgico NMDA (*Grin1 y Grin2B*) (Cerón, 2014), los cuales podrían estar involucrados en el daño neuronal.

Efecto del RSV sobre la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 durante la reperusión

Con el objetivo de determinar el efecto del RSV sobre la actividad de unión de los factores Sp y NRF1, se administró RSV (1 mg/Kg; i.v.) al inicio de la reperusión. Las ratas fueron sometidas a 2 h de MCAO y sacrificadas después de 15 min de reperusión. Al evaluar la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp, encontramos que en los grupos **CT+RSV** (93.97 %), **CT+VH** (120.2 %) y **Sham** (84.5 %) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo **CT** (100 %). Sin embargo, observamos que en el grupo **I/R (15min)**, en el cual la actividad de unión de los factores Sp está aumentada en un 222.13%. La administración de RSV previno el incremento de esta actividad de unión la cual se mantuvo en el nivel basal en el grupo **I/R (15min)+RSV** (96.8 %). De manera sobresaliente, encontramos que la administración del vehículo (EtHO al 50 %) disminuyó la actividad en el grupo **I/R (15min)+VH** a 40.23 %, siendo este resultado estadísticamente significativo en comparación con el grupo **I/R (15min)** (ANOVA, $p < 0.05$) (Figura 3).

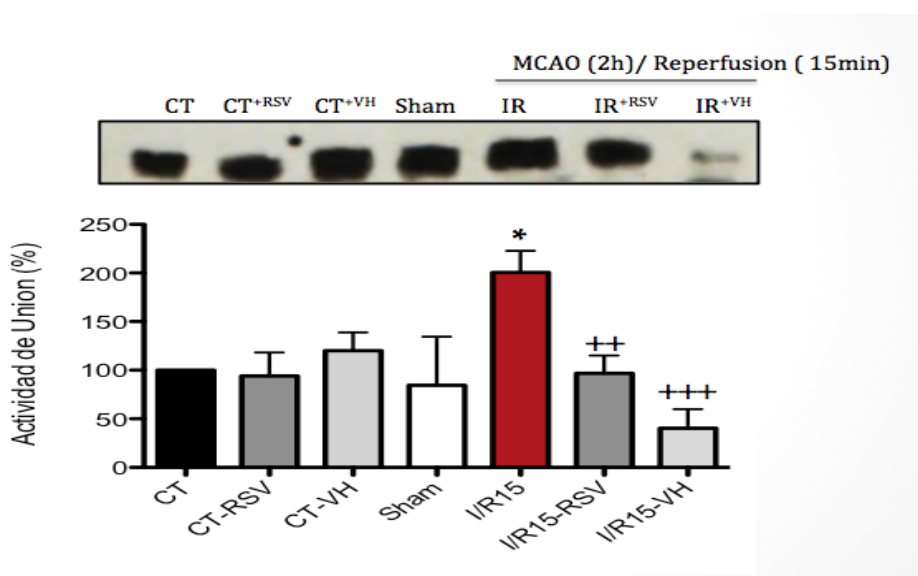


Figura 3. Efecto del RSV sobre la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp. Ratas Wistar macho fueron sometidas a MCAO por 2 h seguidas de 15 min de reperusión. Grupos: **CT**: Ratas control, **CT-RSV**: Ratas control con administración de RSV; **CT-VH**: Ratas control con administración de EtHO al 50%; **Sham**: Ratas sometidas a cirugía pero sin MCAO; **I/R15**: Ratas con 2h de MCAO / 15 min de reperusión; **I/R15-RSV**: Ratas con 2 h de MCAO/ 15 min de reperusión y administración de RSV al inicio de la reperusión; **I/R15-VH**: Ratas con 2h de MCAO/ 15 min de reperusión con administración de EtHO al 50% al inicio de la reperusión. A partir de los cerebros se diseccionaron cortezas frontoparietales ipsilaterales se extrajeron proteínas nucleares que fueron incubadas con oligos con la secuencia de unión para Sp marcado con biotina y se analizaron en ensayos EMSA (n = 4). Se realizó un análisis de varianza One way –ANOVA, $p < 0.05$ %.

Al evaluar la actividad de unión del factor transcripcional NRF1 tampoco encontramos diferencias significativas entre los grupos **CT+RSV** (101.3 %), **CT+VH** (123.08 %) y **Sham** (89.08 %). Sin embargo, como ya se describió, la MCAO aumenta la actividad de unión de NRF1 a los 15 min de reperfusion. En el grupo **I/R(15min)** en donde se registró un aumento del 167.3 %, observamos que la administración de RSV previno el aumento en la actividad de unión de NRF1 provocando que se mantuviera a niveles basales **I/R(15min)+RSV** (106.4%). De la misma manera que con Sp, la administración de EtHO al 50% disminuyó la actividad del factor NRF1 en el grupo **I/R(15min)+VH** a 49.7% siendo estos resultados estadísticamente significativos en comparación con el grupo **I/R(15min)** donde no se administró RSV (ANOVA, $p < 0.05$) (Figura 4).

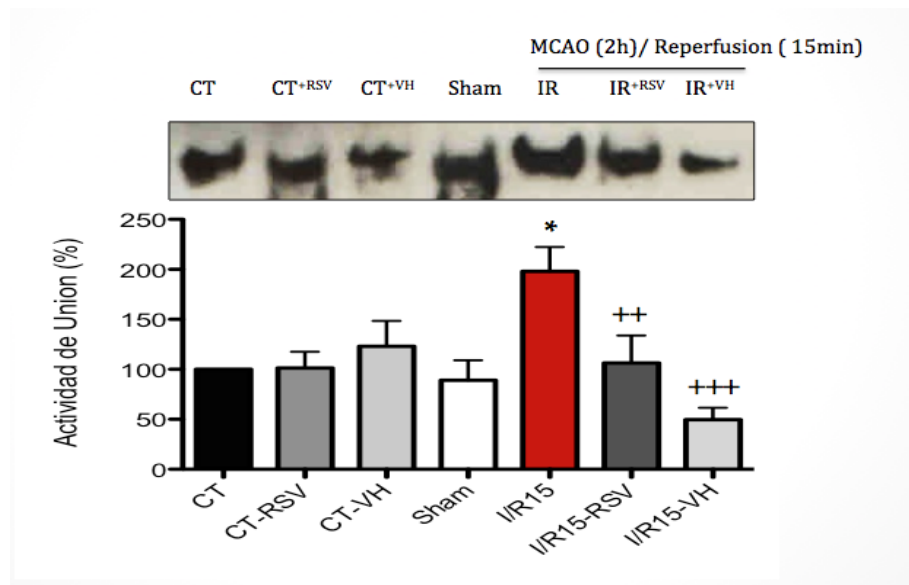


Figura 4. Efecto del RSV sobre la actividad de unión del factor NRF1. Ratas Wistar macho fueron sometidas a MCAO por 2 h seguidas de 15 min de reperfusion. Grupos: **CT**: Ratas control, **CT-RSV**: Ratas control con administración de RSV; **CT-VH**: Ratas control con administración de EtHO al 50%; **Sham**: Ratas sometidas a cirugía pero sin MCAO; **I/R15**: Ratas con 2h de MCAO / 15 min de reperfusion; **I/R15-RSV**: Ratas con 2 h de MCAO/ 15 min de reperfusion y administración de RSV al inicio de la reperfusion; **I/R15-VH**: Ratas con 2h de MCAO/ 15 min de reperfusion con administración de EtHO al 50% al inicio de la reperfusion. A partir de los cerebros se diseccionaron cortezas frontoparietales ipsilaterales se extrajeron proteínas nucleares que fueron incubadas con oligos con la secuencia de unión para NRF1 marcado con biotina y se analizaron en ensayos EMSA (n = 4). Se realizó un análisis de variancia One way –ANOVA, $p < 0.05$.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con RSV previene el incremento en la actividad de unión de Sp y NRF1 inducido por la I/R. También

revelan que el EtHO disminuye la actividad de unión de estos factores transcripcionales por debajo de los niveles basales.

La disminución observada en la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 por efecto del RSV podría deberse a que el RSV administrado en una dosis de 1 mg/Kg al inicio de la reperfusión disminuye los niveles de ERO en un 82% (Trejo, 2013). En este contexto, debido a que la activación de AKT es dependiente de ERO el RSV podría actuar indirectamente sobre la actividad de la cinasa AKT modulando su actividad y de esta manera contribuir a disminuir la actividad de los factores transcripcionales Sp y NRF1.

La disminución en la actividad de Sp y NRF1 inducida por el RSV puede tener dos diferentes efectos. Por un lado, puede disminuir la transcripción de genes involucrados con la muerte celular como son los que codifican para las subunidades del receptor NMDA (e. g. *Grin1* y *Grin2B*) que participa en la excitotoxicidad por glutamato, así como también genes pro inflamatorios que aumentan las complicaciones después de un evento isquémico al contribuir con la disrupción de la barrera hematoencefálica y la formación del edema (Tiwari y Chopra, 2011).

Por otro lado, es importante recordar que dentro de los genes blanco de estos factores transcripcionales también se encuentran algunos relacionados con la neuroprotección como son los que participan en el restablecimiento del metabolismo energético (e. g. *Glut -1, -2 y -3* y las subunidades de la COX) (Okamoto *et al.*, 2002; Durukan y Tatlisumak, 2007; Arango *et al.*, 2008; Dhar *et al.*, 2009; Priya *et al.*, 2013). Estos genes permiten aumentar la captura de glucosa, prevenir el colapso de la cadena transportadora de electrones, mejorar la producción de ATP que es clave para el restablecimiento de múltiples funciones celulares, así como prevenir el daño mitocondrial y la muerte celular por apoptosis (Bai *et al.*, 1998; Nicholls *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2003; Murphy 2009; Thomson *et al.*, 2012). Por lo anterior, la disminución por debajo de los niveles basales puede contribuir al daño neuronal. Sin embargo, los antecedentes señalan que el efecto del RSV en la expresión de *Glut 1, 2 y 3* es complejo, se observó que el RNAm de estos genes disminuye a las 2 h de reperfusión pero se incrementa a las 4 h (Tornes, 2014). Esto sugiere que la

disminución en los niveles de ERO al inicio de la reperfusión provoca la inhibición de la expresión de genes involucrados tanto en el daño como en la neuroprotección; sin embargo, el RSV mantiene en un nivel moderado las concentraciones de ERO, por lo que a tiempos posteriores de la reperfusión, se sigue regulando a vías de señalización que pueden favorecer la supervivencia celular.

Es por eso que sugerimos que el efecto neuroprotector del RSV podría atribuirse a su capacidad de modular los niveles de ERO y consecuentemente vías de señalización. De esta manera, se permitiría que la familia de factores transcripcionales Sp recupere la capacidad de autoregulación, favoreciendo la unión de factor transcripcional Sp3 evitando su oxidación y disminuyendo la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp1 y Sp4. Asimismo la disminución de la actividad del factor transcripcional NRF1 a niveles basales, permitiría modular la expresión génica. Es decir, la modulación de la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 por acción del RSV podría ejercer dos efectos diferentes. Primero, resulta en la disminución de la expresión de las subunidades del receptor glutamatérgico NMDA previniendo el daño por excitotoxicidad y segundo, permite la expresión de genes neuroprotectores, los cuales son expresados durante el preacondicionamiento isquémico (Bai *et al.*, 1998; Nicholls *et al.*, 2000; Ryuet *et al.*, 2003; Murphy, 2009; Thomson *et al.*, 2012).

Por otro lado el efecto del EtHO en la disminución en la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 podría deberse a que en nuestro modelo de I/R se ha descrito que el EtHO administrado en una dosis de [1.3 g/kg v.i] induce un incremento en el estrés oxidativo respecto al grupo I/R (Trejo, 2014). El efecto del EtHO en la generación de ERO durante la I/R concuerda con las evidencias que indican que si el estrés oxidativo aumenta, tanto la actividad de unión de los factores transcripcionales como la actividad transcripcional general después de llegar a un pico máximo tiende a disminuir por debajo de los niveles basales (Gascón *et al.*, 2005; Racay *et al.*, 2009). Este efecto también está apoyado por la capacidad del EtHO para bloquear la actividad de AKT, al inducir un cambio conformacional en el sitio activo de la

cinasa (Huang y Kim, 2012). Lo anterior coincide con la disminución en la activación de los factores transcripcionales Sp y NRF1 por efecto del EtHO que observamos.

Otro posible mecanismo que podría estarse observando durante la I/R es el mediado por calpainas. Estas enzimas se activan por estrés oxidativo y el aumento en su actividad en el tejido cerebral se ha relacionado con la administración de EtHO (Raigopal y Vemuri, 2002). Las calpainas una vez activas degradan a los factores transcripcionales ricos en cisteínas como los factores transcripcionales de la familia Sp y NRF1 impidiendo su translocación nuclear (Mao *et al.*, 2007). Es decir, el estrés oxidativo inducido por la I/R incrementa con la administración de EtHO, lo que lleva a una disminución en la actividad de los factores transcripcionales por debajo de los niveles basales.

Esto último se traduce en la disminución de la expresión de genes relacionados con la muerte celular como el receptor de glutamato NMDA (Cerón, 2014). Asimismo, se ha descrito que el EtHO tiene la capacidad de bloquear la actividad del receptor NMDA e inhibir la liberación de aminoácidos excitotóxicos (e.g glutamato) provocando una disminución de la corriente iónica activada durante la I/R previniendo la excitotoxicidad (Liao *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2013; Hafeez *et al.*, 2014). Lo anterior coincide con que el efecto neuroprotector observado para concentraciones moderadas del EtHO descritas previamente en nuestro modelo de I/R (Trejo, 2014).

Sin embargo, la disminución en la transcripción por debajo de los niveles basales por efecto del EtHO no solo involucra a genes relacionados con la muerte celular, sino que también se ve afectada la expresión de genes relacionados con la supervivencia y la neuroregeneración. Por ello, a pesar que el EtHO tiene la capacidad de disminuir el daño por excitotoxicidad durante la I/R podría interferir con la supervivencia después de un evento isquémico.

Es importante destacar que en presencia de RSV este efecto se ve atenuado debido a que el RSV modula los niveles de ERO producidas por el EtHO y la I/R, proporcionando un ambiente REDOX idóneo para la activación y regulación de los factores transcripcionales sin que la expresión génica se vea afectada de manera negativa (Figura 5) (Tawari y Chopra, 2011).

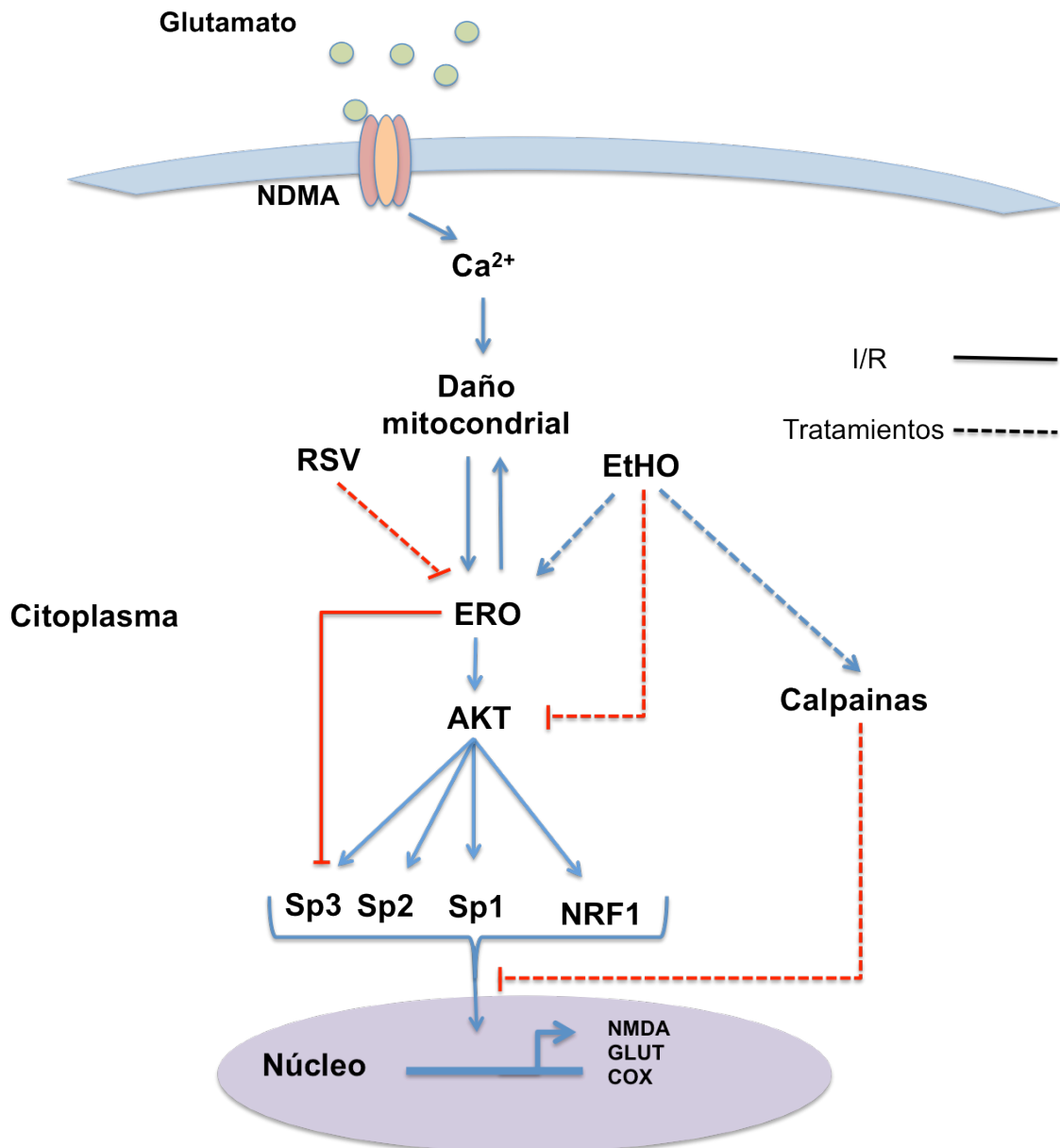


Figura 5: Modelo de activación de los factores transcripcionales de la familia Sp y NRF1 durante la I/R.

El colapso energético durante la I/R induce la despolarización de las membranas celulares, esta despolarización provoca la liberación de glutamato al medio y la sobre activación de los receptores glutamatergicos NMDA esta sobre activación induce la internalización masiva de Ca^{2+} al medio citoplasmático. El Ca^{2+} induce perdida del potencial de membrana mitocondrial provocando la generación de ERO. Las ERO generadas en exceso provocan daño directo a biomoleculas y daño mitocondrial. Por otro lado las ERO oxidan y activan AKT, esta cinasa una vez activa induce la fosforilación del factor NRF1 y los factores de la familia Sp (Sp1, Sp2 y Sp3). El factor NRF1 una vez activo se transloca al núcleo y se une a su secuencia consenso especifica, mientras que los factores de la familia Sp al ser activados se translocan al núcleo y compiten por la misma secuencia de unión en el promotor. Durante la I/R las ERO inducen la oxidación del factor Sp3 impidiendo su translocación nuclear y debido a que es un modelo por competitividad se promueve la unión de Sp1 y Sp2 al sitio de unión. Debido a que el factor Sp3 funciona como un inhibidor de la transcripción, el aumento en la unión de Sp1 y Sp2 promueve el aumento de la transcripción de sus genes blanco. Sin embargo el RSV puede regular esta vía al modular las ERO actúa indirectamente sobre la actividad de la cinasa AKT. Además permite que la familia de factores transcripcionales Sp recuperen su capacidad de autorregulación evitando la oxidación de Sp3. Por otro lado el EtHO induce un cambio conformacional en el sitio activo de AKT inactivándola además promueve el aumento de ERO y la activación de calpainas que degradan a los factores ricos en cisteínas como NRF1 y la familia Sp bloqueando totalmente su actividad.

VI. CONCLUSIONES

La I/R aumenta la actividad de unión de los factores transcripcionales Sp y NRF1 a su secuencia consenso encontrándose el pico máximo de activación después de los 15 min de reperfusión. Sin embargo, el RSV tiene la capacidad de prevenir el aumento en su actividad manteniéndola en niveles basales en los primeros 120 min de reperfusión. Por otro lado, el EtHO bloquea la activación de los factores transcripcionales disminuyendo la actividad por debajo de los niveles basales durante la I/R.

VII. PERSPECTIVAS

El comportamiento de los factores transcripcionales Sp y NRF1 varía en las diferentes áreas de daño durante la isquemia cerebral así como también entre los diferentes tipos celulares del tejido cerebral. La complejidad del tejido no permite determinar el efecto particular del RSV en el área de penumbra por lo que es necesario evaluar el efecto del RSV en tipos celulares específicos bajo condiciones de isquemia determinadas.

Además es necesario realizar ensayos de súperretardamiento, en los que se defina cuál de los factores Sp se está uniendo a su secuencia y de esta manera, demostrar la capacidad del RSV en la regulación de la actividad de la familia de factores transcripcionales Sp. De manera se podría demostrar el efecto del RSV en la I/R sobre la regulación transcripcional.

Por otro lado, debido a que el EtHO como vehículo podría intervenir con la supervivencia después de un evento isquémico, sugerimos evaluar otras alternativas como el aceite de maíz para la aplicación del RSV en la clínica.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: ABREVIATURAS

COX: Complejo IV mitocondrial citocromo c oxidasa

EMSA: Ensayo de retardamiento en la movilidad electroforética.

ERO: Especies reactivas de oxígeno

EtHO: Etanol

Glut: Transportador de glucosa

H₂O₂: Radical peróxido de hidrógeno

HO: Radical hidroxilo

I/R: Isquemia/reperfusión

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral media.

NMDA: Receptor a glutamato tipo N-metil-D-aspartato.

NRF1: Factor nuclear respiratorio 1

O₂: Radical superóxido

PKB (AKT): Proteína cinasa B

REDOX: Estado Oxido-Reducción celular.

RSV: Resveratrol

Sp: Proteína específica

IX. REFERENCIAS

- Aguilera P, Cháñez-Cárdenas ME, Ortiz-Plata A, León-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, Villeda-Hernández J, Sánchez-García A, Maldonado PD.(2010) Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine*.(3-4):241-7. doi: 10.1016/j.phymed.2009.06.004.
- Arango, C., Escobar, M., Buriticá, E., Pimienta, H., (2008). Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental: una visión experimental y su correlato clínico. *Colombia Médica*. 39: 3
- Bai G., Norton D., Prenger M. y Kusiak J. (1998). Single-stranded DNA-binding proteins and neuron-restrictive silencer factor participate in cell-specific transcriptional control of the *NMDAR1* gene. *J. Biol. Chem.* 273 1086–1091.
- Bouwman P, Philipsen S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 2195:27–38.
- Catalgol Betül, Batirel Saime, Taga Yavuz and Kartal Ozer Nesrin. (2012) “Resveratrol: French paradox revisited”. *Frontiers in pharmacology*.
- Ceron Silva A.L (2013) Regulacion de la expresión del receptor NMDA por el resveratrol en isquemia cerebral in vivo. [Tesis de maestria] Unidad Academica de Ciencias Quimico Biologicas UAGro.
- Chetram MA, Bethea DA, Odero-Marah VA, Don-Salu-Hewage AS, Jones KJ, Hinton CV (2013). ROS-mediated activation of AKT induces apoptosis via pVHL in prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 376(1-2):63-71. doi: 10.1007/s11010-012-1549-7. Epub 2013 Jan 12.
- Dhar S, Johar K y Wong-Riley (2013) Bigenomic transcriptional regulation of all thirteen cytochrome c oxidase subunit genes by specificity protein 1. *Open Biol.* 3(3):120176. Doi:10.1098/rsob.120176

- Dhar S. y Wong-Riley M. (2009). Coupling of Energy Metabolism and Synaptic Transmission at the Transcriptional Level: Role of Nuclear Respiratory Factor 1 in Regulating both Cytochrome c Oxidase and NMDA Glutamate Receptor Subunit Genes. *The Journal of Neuroscience*. 29(2):483– 492 .
- Durukan A y Tatlisumak T. (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, 87, 179-97.
- Friguls B, Justicia C, Pallàs M, Planas AM (2001) Focal cerebral ischemia causes two temporal waves of AKT activation. *Neuroreport*. 12(15):3381-4.
-
- Fu P, Peng C, Ding JY, Asmaro K, Sullivan JM, Guthinkonda M, Ding Y (2013) Acute administration of ethanol reduces apoptosis following ischemic stroke in rats. *Neurosci Res*. 76(1-1):93-7 doi:10.1016/j.neures.2013.02.011.Epub 2013 Mar 17.
-
- Gaudreault M., Larouche D., Germain L. y Guérin S. (2013). Qualitatively Monitoring Binding and Expression of the Transcription Factor Sp1 as a Useful Tool to Evaluate the Reliability of Primary Cultured Epithelial Stem Cells in Tissue Reconstruction. *Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. 989: DOI 10.1007/978-1-62703-330-5_11.
- Gee K, Angel JB, Mishra S, Blahoianu MA, Kumar A. (2007) IL-10 regulation by HIV-Tat in primary human monocytic cells: involvement of calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated p38 MAPK and Sp-1 and CREB-1 transcription factors. *J Immunol.*;178(2):798-807. Erratum in: *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3553.
- Gülcin I. (2010) Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight .*Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 1 210–218. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.07.002

- Hafeez A, Elmadhoun O, Peng C, Ding JY, Geng X, Guthikonda M, Ding Y (2014) Reduced Apoptosis by Ethanol and Its Association with PKC- δ and Akt Signaling in Ischemic Stroke. *Aging Dis.* 2014 Mar 8;5(6):366-72. doi: 10.14336/AD.2014.0500366. eCollection 2014.
- Hardingham, G., (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans.* 37(6): 1147–1160. doi:10.1042/BST0371147.
- Held J and Gibson B (2012) Hota SK, Hota KB, Prasad D, Ilavazhagan G, Singh SB (2010). Oxidative-stress-induced alterations in Sp factors mediate transcriptional regulation of the NR1 subunit in hippocampus during hypoxia. *Free Radic Biol Med.* 15;49(2):178-91. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.027. Epub 2010 Apr 8.
- Held J y Gibson B. (2007) Regulatory Control or Oxidative Damage? Proteomic Approaches to Interrogate the Role of Cysteine Oxidation Status in Biological Processes. *Mol Cell Proteomics.* 11 (4): R111.013037. doi: 10.1074/mcp.R111.013037
- Huang B. y Hee-Yong Ki (2006). Interdomain Conformational Changes in Akt Activation Revealed by Chemical Cross-linking and Tandem Mass Spectrometry*. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:1045–1053.
- Huang, B. X., y Kim, H.-Y. (2012). Effects of Ethanol on Conformational Changes of Akt Studied by Chemical Cross-Linking, Mass Spectrometry, and ^{18}O Labeling. *ACS Chemical Biology*, 7(2), 387–394. doi:10.1021/cb2003237
- Kiedrowski L. (1999) Elevated extracellular K(+) concentrations inhibit N-methyl-D-aspartate-induced Ca(2+) influx and excitotoxicity. *Mol Pharmacol.* 56(4):737-43.
- Lamuela R., Romero A., Waterhouse A. y De la Torre M. (1995). Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red Vitis vinifera wines *J Agric Food Chem*, 43: 281–283.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S y Cummins R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20(1):84-91.

- Luján, R. (2004). Bases moleculares de la señalización neuronal. *Ciencia al Día Internacional*. 5(2): 1-19.
- Mao X., Yang S., Simpkins J., y Barger S. (2007) Glutamate receptor activation evokes calpain-mediated degradation of Sp3 and Sp4, the prominent Sp-family transcription factors in neurons. *J Neurochem*. 100(5): 1300–1314.
- Murphy M. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417: 1–13 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20081386.
- Nakamichi N. y Yoneda Y. (2005) Functional Proteins Involved in Regulation of Intracellular Ca²⁺ for Drug Development: desensitization of N-methyl-D-aspartate-receptor channels. *J Pharmacol Sci.* 97: 348-350.
- Narayanan S, Dave K., Perez-Pinzon M. (2013) Ischemic preconditioning and clinical scenarios *Curr Opin Neurol.* 26(1): 17. doi: 10.1097/WCO.0b013e32835bf200
- Nicholls DG y Ward MW. (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* 23(4):166-74.
- Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G., Lipton, S. A., (2002) Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res.* 107: 89–96.
- Panickar K. and Anderson R (2011) Effect of Polyphenols on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Neuronal Death and Brain Edema in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci.* ; 12(11): 8181-8207. doi: 10.3390/ijms12118181
- Piantadosi CA, Suliman HB(2006) Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem.* 281(1):324-33. Epub 2005 Oct 17.
- Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiat J, Pages G, O'Rourke DM, Bernhard E, Maity A. (2004). Sp1 is involved

- in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell*. 15(11):4841-53. Epub 2004 Sep 1.
- Racay P., Tatarková Z., Drgová T., Kaplan P. Y Dobrota D. (2009) Ischemia-Reperfusion Induces Inhibition of Mitochondrial Protein Synthesis and Cytochrome c Oxidase Activity in Rat Hippocampus. *Physiol. Res*. 58: 127-138.
 - Rajakumar RA, Thamocharan S, Menon RK, Devaskar SU (1998) Sp1 and Sp3 regulate transcriptional activity of the facilitative glucose transporter isoform-3 gene in mammalian neuroblasts and trophoblasts. *J Biol Chem*.16;273(42):274 74-83.
 - Rajgopal Y, Vemuri MC. (2002). Calpain activation and alpha-spectrin cleavage in rat brain by ethanol. *Neurosci Lett*. 2002 Mar 22;321(3):187-91.
 - Ramos A., Ho, W., Forte S., Dickson K., JBoutillier J., Favell K. y Barker P. (2007)Hypo-Osmolar Stress Induces p75NTR Expression by Activating Sp1-Dependent Transcription. *The Journal of Neuroscience*. 27(6):1498 –1506.
 - Rodríguez A y Díaz M (2005).Transcription of the NR1 Subunit of the N-Methyl-D-aspartate Receptor Is Down-regulated by Excitotoxic Stimulation and Cerebral Ischemia. *J. Biol. Chem*. 280: 35018-35027 doi: 10.1074/jbc.M504108200
 - Ryu H., Lee J., Zaman K., Kubilis J., Ferrante R., Ross B., Neve R.y Ratan R. (2003) Sp1 and Sp3 Are Oxidative Stress-Inducible, Antideath Transcription Factors in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 23(9):3597–3606.
 - Sapetschnig A, Koch F, Rischitor G, Mennenga T, Suske G. (2004). Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *J Biol Chem* 279:42095–42105.
 - Sun M, Li M, Huang Q, Han F, Gu J, Xie J, Han R, Qin Z, Zhou Z(2014).Ischemia/reperfusion-induced upregulation of TIGAR in brain is mediated by SP1 and modulated by ROS and hormones involved in

glucose metabolism. *Neurochem Int.* 4;80C:99-109. doi: 10.1016/j.neuint.2014.09.006.

- Tajiri S., Oyadomari S., Yano S., Morioka M., Gotoh T., Hamada J. I., Ushio y Mori M. (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death. Differ.* 11: 403-415.
- Thompson J. , Narayanan S. y Perez M. (2012) Redox Signaling Pathways Involved in Neuronal Ischemic Preconditioning. *Current Neuropharmacology.* 10: 354-36
- Tiwari V, Chopra K. (2011) Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain. *J Neurochem.* 117(4):678-90. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07236.x. Epub 2011 Mar 23.
- Trejo-Quiñones Y. (2013) Evaluacion del efecto protector del resveratrol y etanol en un modelo de isquemia cerebral en ratas [Tesis de licenciatura] Facultad de química UNAM.
- Ulrich Dirnagl, Roger P. Simon y John M. Hallenbeck(2003). Ischemic tolerance and endogenous Neuroprotection. *Elsavier.* 26:5.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.*Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.
- Veldhuis WB, van der Stelt M, Delmas F, Gillet B, Veldink GA, Vliegenthart JF, Nicolay K, Bär PR. (2003) In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor.*J Cereb Blood Flow Metab.* 23(1):62-74.
- Yalcin S., Marinkovic D., Mungamuri S., Zhang X., Tong W., Sellers R y Ghaffar S. (2010) ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3^{-/-} mice. *The EMBO Journal .* 29, 4118–4131. doi:10.1038/ emboj.2010.292
- Yousuf, S., Atif, F., Ahmad, M., Hoda N., Ishrat, T., Khan, B. y Islam, F.(2008). Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating

mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. 242–253 doi:10.1016/j.brainres.2008.10.068.