



Universidad Autónoma de Guerrero
Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas
Unidad Académica de Medicina
Maestría en Ciencias Biomédicas

**El extracto de ajo envejecido y la S-alilcisteína inducen
la expresión de los transportadores GLUT-1,
GLUT-3 y GCLC en isquemia cerebral**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:
Carlos Daniel Gómez Martínez

DIRECTORA
Dra. Mónica Espinoza Rojo

CODIRECTORA
Dra. Penélope Aguilera Hernández

Chilpancingo, Gro; a enero del 2010

El extracto de ajo envejecido y la S-alilcisteína inducen la expresión de los transportadores GLUT-1, GLUT-3 y GCLC en isquemia cerebral

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

Bajo la Dirección de
Dra. Mónica Espinoza Rojo

Y codirección de
Dra. Penélope Aguilera Hernández

Con la asesoría de
Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
Dr. Alejandro Millán Vega
Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado

Durante el periodo en que el C. Carlos Daniel Gómez Martínez cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca del CONACYT. Además, recibió el apoyo del Banco Santander Serfín al otorgarle la beca de movilidad Santander Universia durante el periodo de agosto-diciembre del 2008.

AGRADECIMIENTOS

*A mi tutora, la **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, por ser una profesora ejemplar y por su apoyo y ayuda incondicional. Además, por brindarme su confianza.*

*A mi tutora, la **Dra. Penélope Aguilera Hernández**, por ser un científico ejemplar, por su fe en mí y por todas las cosas que me enseñó con paciencia. Admiro su calidad humana.*

*A la **Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado**, al **Dr. Alejandro Millán Vega** y al **Dr. Alfonso Bernabé Carreño**, que fungieron como mis sinodales, por su valioso tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus sugerencias.*

*A la **Dra. Alma Ortiz Plata**, investigadora del laboratorio de Neuropatología Experimental, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, por realizar la cirugía del modelo de isquemia.*

*A mis amigas **Selene García de la Cadena Farfán** y **Araceli Barrón Ortega** alumnas pertenecientes al laboratorio de Patología Vasculat Cerebral, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, por realizar la síntesis de la S-alilcisteína.*

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Introducción.....	4
Materiales y métodos.....	8
Resultados.....	12
Discusión y conclusiones.....	17
Anexos.....	24
Referencias.....	27

RESÚMEN

Introducción. La isquemia cerebral produce alteraciones en el metabolismo energético y en la utilización de glucosa. La sobreexpresión de los transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-3) se induce como mecanismo de defensa en isquemia cerebral. Estos transportadores son regulados por HIF-1 α en forma dependiente del estado redox celular. Compuestos con propiedades antioxidantes como el extracto de ajo envejecido (EAE) y la S-alilcisteína (SAC), podrían regular la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad antioxidante como la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (GCLC). Esta subunidad forma parte de la enzima que participa en la síntesis de glutatión (GSH) y por lo tanto que regula el estado redox celular. **Objetivos.** A) Determinar el efecto de la isquemia/reperfusión cerebral sobre el nivel de expresión de GLUT-1 y GLUT-3 y B) Determinar el efecto del EAE y de la SAC sobre el nivel de expresión de GLUT-1, GLUT-3 y GCLC en isquemia/reperfusión cerebral. **Métodos.** Ratas macho Wistar fueron sometidas a 2 h de isquemia. Un grupo fue sacrificado a diferentes tiempos de reperfusión (0 a 48 h). A otro grupo se les administró el EAE (360 mg/Kg *i.p.*) y SAC (300 mg/Kg *i.p.*) al inicio de la reperfusión, y fueron sacrificados a 2 h de reperfusión. Se sintetizó ADN complementario a partir de ARN total extraído de corteza frontoparietal. Se utilizó PCR cuantitativa para cuantificar la expresión del ARNm de GLUT-1, GLUT-3 y GCLC, el ARN ribosomal 18S se utilizó para normalizar. **Resultados.** No se detectaron cambios en el nivel de expresión de los transportadores durante la isquemia. Se observó un primer incremento en la expresión a 1 h de reperfusión (GLUT-1: 2.16 ± 0.82 y GLUT-3: 2.21 ± 0.15 veces, Tukey, $p < 0.05$). Un segundo incremento lo observamos a 24 h (GLUT-1: 3.9 ± 1.6 y GLUT-3: 3.03 ± 0.37 veces, Tukey, $p < 0.001$). GLUT-1 se mantuvo elevado hasta las 48 h (3.3 ± 1.6 veces, Tukey, $p < 0.001$) de reperfusión, mientras que GLUT-3 regresó a su estado basal. En ratas isquémicas el EAE indujo un incremento en la expresión GLUT-1 y GLUT-3 (1.68 ± 0.17 y 2.74 ± 0.34 veces, respectivamente. Tukey, $p < 0.05$). La SAC también provocó un incremento en la expresión de GLUT-3 (3.54 ± 0.9 veces, Tukey, $p < 0.001$), no así en GLUT-1. El EAE y la SAC promovieron un incremento en la expresión de GCLC (7.90 ± 0.11 y 2.01 ± 0.21 veces, Tukey, $p < 0.001$, $p < 0.05$, respectivamente). **Conclusiones.** La isquemia/reperfusión cerebral induce la expresión de GLUT-1 y GLUT-3, como mecanismo de defensa. El EAE y la SAC inducen un incremento en la expresión de GCLC probablemente asociado a su efecto protector. Sin embargo, ambos inducen un incremento en la expresión de los transportadores; lo que, podría tener un efecto neurotóxico, al incrementar la concentración de glucosa intracelular y favorecer su entrada a vías metabólicas que incrementan la producción de radicales libres.

Palabras claves: S-alilcisteína, extracto de ajo envejecido, transporte de glucosa, isquemia cerebral.

ABSTRACT

Introduction. Cerebral ischemia causes changes in energy metabolism and glucose utilization. Overexpression of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) is a mechanism of defense in cerebral ischemia. HIF-1 α regulation of these transporters depends on the cellular redox state. The use of compounds with antioxidant properties such as aged garlic extract (EAE) and S-allicisteína (SAC) also could regulate the expression of genes that codifies for proteins with antioxidant activity as the glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC). This enzyme is responsible for the synthesis of glutathione (GSH), and the primary reducing agent in the cell. **Objectives.** A) Determine the effect of cerebral ischemia/reperfusion on the level of expression of GLUT-1 and GLUT-3 and B) Determine the effect of AGE and of the SAC on the level of expression of GLUT-1, GLUT-3 and GCLC in ischemia/reperfusion conditions. **Methods.** Male Wistar rats were subjected to ischemia for 2 h. One group was sacrificed after different reperfusion times (from 0 to 48 h). Another group was treated with the AGE (360 mg/kg *i.p.*) and SAC (300 mg/kg *i.p.*) at the onset of reperfusion and was sacrificed 2 h after reperfusion. Complementary DNA was synthesized from 5 μ g of total RNA extracted from the frontoparietal cortex. Transporters were amplified using quantitative PCR. The amplification was performed utilizing specific TaqMan® probes for GLUT-1, GLUT-3, and GCLC. The 18S ribosomal RNA was used to normalize. **Results.** During ischemia no changes were found in the expression of the glucose transporters. A increase was observed at 1 h after reperfusion (GLUT-1: 2.16 ± 0.82 and GLUT-3: 2.21 ± 0.15 fold, Tukey, $p < 0.05$). A second increase was observed 24 h after reperfusion (GLUT-1: 3.9 ± 1.6 and GLUT-3: 3.03 ± 0.37 fold, Tukey, $p < 0.001$). GLUT-1 levels remained elevated at 24 h after reperfusion, whereas, GLUT-3 returned to basal levels. In the ischemic rats, an increase on GLUT-1 and GLUT-3 expression was induced by AGE (1.68 ± 0.17 and 2.74 ± 0.34 fold, respectively, Tukey, $p < 0.05$). The SAC also increased GLUT-3 expression but not cause any change on GLUT-1 expression. The AGE and SAC treatment also increased GCLC expression (7.90 ± 0.11 y 2.01 ± 0.21 fold, Tukey, $p < 0.001$, $p < 0.05$, respectively). **Conclusions.** Ischemia/reperfusion brain induces the expression of GLUT-1 and GLUT-3, as a defense mechanism. The AGE and SAC treatment induce an increase in GCLC expression, probably associated with their protective effect. However, both compounds also induced the expression of transporters, which could have a neurotoxic effect by increasing intracellular glucose and the production of free radicals.

Key words: S-allyl cysteine, aged garlic extract, glucose transport, cerebral ischemia.

1. INTRODUCCIÓN

La glucosa es el principal sustrato utilizado para la producción de energía mediante diferentes vías metabólicas en el sistema nervioso central (SNC). Como el cerebro no puede sintetizar glucosa o almacenar grandes cantidades de glucógeno en los astrocitos, su abastecimiento depende de la glucosa presente en la sangre. La glucosa es captada por transportadores pertenecientes a la familia GLUT, los cuales transportan la glucosa desde la sangre por difusión facilitada en forma dependiente de la concentración (*Castrejón et al., 2007*). Se han descrito 13 isoformas de GLUTs; entre estas, GLUT-1 y GLUT-3 se expresan principalmente en SNC (*Wood & Trayhurn, 2003*). GLUT-1 se expresa como dos isoformas de diferente peso molecular; la isoforma de 55-kDa está localizada en células endoteliales de la barrera hematoencefálica, mientras que la de 45-kDa es localizada en los astrocitos. La diferencia en peso molecular se debe a la glucosilación de la isoforma de 55 kDa. Sin embargo, ambas tienen las mismas propiedades cinéticas y farmacológicas. Por otro lado, GLUT-3 es un transportador de alta afinidad expresado principalmente en neuronas (*Duelli & Kuschinsky, 2001; Qutub & Hunt, 2005; Simpson et al., 2008*). La alta afinidad de este transportador es muy importante ya que el contenido de glucosa en el medio extracelular que rodea a las neuronas es de 1-2 mM comparado con los 5-6 mM presentes en suero (*Simpson et al., 2008*).

La concentración de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 se encuentran aumentada en una gran variedad de condiciones fisiopatológicas, entre las que se incluye a la isquemia cerebral (*Lee & Bondy, 1993; Vanucci et al., 1996:1998; Wei et al., 2008*). La isquemia cerebral es el accidente cerebro vascular más frecuente en México, es una alteración que tiene su origen en la oclusión, por un trombo o un émbolo, de una de las principales arterias cerebrales (*Moustafa & Baron, 2008*). Al restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral se le conoce como reperfusión. Cuando la reperfusión ocurre después de un tiempo corto de isquemia resulta benéfico; sin embargo, cuando el periodo de isquemia es prolongado, la reperfusión también puede causar un daño neuronal. Se ha descrito que el daño provocado por la

reperfusión involucra la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Peters et al., 1998; Muranyi & Li, 2006; Tsuruta et al., 2009).

El estado redox puede definirse como el ambiente en donde existe un equilibrio entre moléculas oxidantes y reductoras. Las ERO son uno de los principales factores que determinan el estado redox celular; mientras que un nivel elevado de ERO induce un ambiente oxidante, un nivel disminuido de ERO induce un ambiente reductor. Otro factor que determina el estado redox celular es la concentración celular de glutatión (GSH), el principal agente antioxidante de la célula. El GSH es sintetizado por la glutamato cisteína ligasa (GCL), una enzima compuesta de dos subunidades, una catalizadora (GCLC) y otra moduladora (GCLM) (Huang et al., 1993). Se ha demostrado que agentes antioxidantes disminuyen el estrés oxidativo al neutralizar ERO o al incrementar la capacidad del sistema antioxidante endógeno mediante la regulación de la expresión de GCL (Myhrstad et al., 2002; Rawal et al., 2004; Moskaug et al., 2005).

En un modelo de isquemia inducido por 3 h de oclusión de la arteria cerebral media (OACM), se ha observado un marcado incremento en la expresión del ARNm de GLUT-1 a 1 h de reperfusión y un ligero incremento del ARNm de GLUT-3 a 3 h de reperfusión (Lee & Bondy, 1993). Hallazgos similares han sido reportados en un modelo de isquemia cerebral global en gerbos (Gerhar et al., 1996). El mecanismo responsable de la inducción de la expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3 en isquemia cerebral no se ha determinado. Sin embargo, se ha observado que el nivel de expresión de ambos transportadores aumenta en forma dependiente de la activación del factor inducido por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α ; de "Hypoxia-inducible factor") (Chen et al., 2001; Baumann et al., 2007; Ren et al., 2008).

HIF-1 α es un factor de transcripción que se expresa de manera constitutiva pero que, en condiciones normales de oxígeno, es degradado por vía proteosomal al ser modificado postraduccionalmente por prolin hidroxilasas (Bruick & McKnight, 2001). Cuando el oxígeno disminuye (e. g. en hipoxia y en isquemia), las prolin hidroxilasas son inactivadas y de esta forma HIF-1 α se estabiliza, puede translocarse al núcleo y activar la transcripción de sus genes blanco (Jiang et al., 1996).

Por otro lado, algunos reportes indican que tanto en normoxia como en hipoxia, el estado redox celular juega un papel determinante en la estabilización de HIF-1 α (Wang et al., 1995; Salceda & Caro, 1997; Guo et al., 2008).

El mecanismo por el cual el aumento en las ERO inducen la degradación de HIF-1 α no está definido, pero se ha propuesto que pueden promover la degradación de HIF-1 α a través de dos mecanismos. Primero, las ERO activan la vía de degradación proteosomal al oxidar a HIF-1 α (Kong et al., 2007) y al modificar a las prolil hidroxilasas en condiciones de hipoxia (Callapina et al., 2005). Segundo, se ha reportado que p53 media la degradación de HIF-1 α (Kaluzová et al., 2004). p53 es una proteína sensible al estado redox y puede ser activada en un ambiente pro-oxidante.

En este sentido, estudios recientes indican que en condiciones de hipoxia y normoxia, agentes antioxidantes (e. g. vitamina E, N-acetilcisteína, galangina, quercetina y epicatequina gallate) inducen un aumento en la expresión de HIF-1 α y la subsecuente expresión de sus genes blanco, entre los que se incluyen al transportador GLUT-1 y GLUT-3 (Wilson & Poellinger, 2002; Zhang et al., 2004; Park et al., 2008; Guo et al., 2008).

Por otro lado, existen reportes del efecto protector de agentes con propiedades antioxidantes en modelos de isquemia cerebral; entre estos destaca el efecto del extracto de ajo envejecido (EAE). Este compuesto es una preparación que resulta de la extracción etanólica del ajo fresco a temperatura ambiente durante 20 meses en un tanque de acero inoxidable (Wakunaga of America Co., 2006). El proceso de envejecimiento, transforma los compuestos irritantes del ajo en compuestos más estables y menos tóxicos (principalmente compuestos polares) (Weinberg et al., 1993).

Se ha reportado que el EAE protege en un 70% cuando es administrado al inicio de la reperfusión, en ratas sometidas a 2 h de isquemia cerebral inducida por OACM. La protección observada se encontró asociada a la capacidad del EAE de inhibir la formación de nitrotirosina y al restituir la actividad de enzimas con actividad antioxidante como la superóxido dismutasa y la GSH peroxidasa (Aguilera et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que la S-alilcisteína (SAC), el compuesto

mayoritario del EAE, atenúa el daño neuronal inducido por isquemia cerebral focal y global; este efecto protector de la SAC se ha atribuido a su capacidad de neutralizar peroxinitritos e inhibir la peroxidación lipídica (*Numagami et al., 1996; Numagami & Ohnishi, 2001; Ji et al., 2006*).

El efecto protector del EAE y de la SAC se ha atribuido a sus propiedades antioxidantes (*Numagami et al., 1996; Numagami & Ohnishi, 2001; Ji et al., 2006; Aguilera et al., 2009*), sin embargo no se ha estudiado a profundidad el mecanismo de acción. Como la expresión de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 es regulada a nivel transcripcional por HIF-1 α , y la activación de HIF-1 α está asociada a un ambiente redox reductor, el utilizar compuestos con propiedades antioxidantes podría generar un efecto en el patrón de expresión de los genes regulados por HIF-1 α , como son los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 en isquemia cerebral. Es por ello que en el presente trabajo evaluamos el efecto del EAE y de la SAC sobre el nivel de expresión de GLUT-1 y GLUT-3, con la finalidad de determinar si los transportadores participan en el mecanismo de acción de estos antioxidantes en isquemia cerebral. Además, evaluamos el efecto del EAE y de la SAC sobre el nivel de expresión de GCLC, esto con el propósito de evaluar el estado redox celular, ya que un aumento en el nivel de expresión de esta enzima es indicativo de un ambiente redox reductor y esto nos podría indicar que HIF-1 α estaría activado, incrementando la expresión de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Kiolic Aged Garlic Extract Liquid (WAKUNAGA de America Co., Ltd. Mission Viejo, California, USA); TriZol (Invitrogen, USA); Deoxynucleoside triphosphate set (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis USA); M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison USA); RNasin (Promega, Madison, USA); Randon Hexamers (Applied Biosystems, New Jersey USA); M-MLV Reverse Transcriptase Amortiguador (Promega, Madison USA); Ribosomal ARN Control Reagents (Applied Biosystem, California USA); TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystem, New Jersey USA).

2.2 Animales de Laboratorio

Se emplearon ratas macho adultas, de la cepa Wistar, de 280-350 g de peso (aproximadamente 16 semanas de edad). Los animales fueron divididos aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales (n= 6-8). Para cada análisis, se usaron grupos independientes. Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento. Durante el estudio, las ratas se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de 12 h luz/oscuridad). Todo los experimentos fueron realizados de acuerdo a la "NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

2.3 Tratamientos.

Se aplicó una dosis de 360 mg/kg de EAE (1.2 mL/Kg i.p.) o una dosis de 300 mg/Kg i.p. de SAC, al término de las 2 h de la OACM y las ratas fueron sacrificadas a las 2 h de reperusión. Se ocupó como control negativo una dosis de 1.2 mL/Kg i.p. de solución salina.

2.4 Modelo experimental de isquemia cerebral inducido por oclusión de la arteria cerebral media

La isquemia cerebral focal transitoria fue producida por la OACM, empleando el método descrito por *Longa et al., (1989)*. Los animales fueron anestesiados en una cámara de halotano (2%). Posteriormente, un monofilamento de nylon 3-0 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 h el filamento fue retirado para permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión). Las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos de perfusión (0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24 y 48h).

2.5 Pruebas conductuales para determinar el déficit neurológico

El estado neurológico de cada rata fue determinado empleando 5 pruebas conductuales: 1) *Flexión de la pata contralateral* a la lesión, las ratas se suspenden por la base de la cola y la postura de los miembros delanteros es observada; las ratas normales extienden ambos miembros hacia el suelo, mientras que los animales con daño doblan la pata contralateral a la lesión; 2) *Motilidad espontánea*, los animales se colocan en una superficie plana (0.5 metros de diámetro); los animales normales inician el movimiento antes de 10 segundos; 3) *Reflejo de agarrar*, las ratas se suspenden de la cola y un cable se coloca delante de los miembros delanteros; los animales normales se agarran simultáneamente con ambas patas; 4) *Prueba de la barra horizontal*, a las ratas que son capaces de asirse del cable en la prueba anterior, se les determina el tiempo que pueden mantenerse colgados; los animales normales soportan por lo menos 3 segundos; y 5) *Conducta de giro*, las ratas se sostienen por la base de la cola, permitiéndoles moverse libremente al apoyar 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. A cada prueba conductual se le asignó un valor de 0 si el animal presentaba una conducta normal y de 1 si presentaba daño. La suma de los valores obtenidos en las 5 pruebas fue utilizada como déficit neurológico. La evaluación se realizó 30 minutos antes de la perfusión. Las ratas con déficit neurológico mayor a

2 invariablemente presentan un daño por isquemia y reperfusión inducido por la OACM (*Modificada de Longa et al., 1989; Menzies et al., 1992; Modo et al., 2000*).

2.6 Evaluación del nivel de expresión del ARNm de los transportadores de glucosa y de GCLC.

Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc). En todo el procedimiento se utilizó material libre de ARNasas, para ello se utilizó material de plástico nuevo y el material de vidrio fue tratado durante 15 minutos con agua oxigenada y enjuagado con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Se hizo disección del cerebro y se extrajo la corteza frontoparietal. Se emplearon aproximadamente 50 mg de la corteza frontoparietal izquierda; a esta se le agregó 1 mL de Trizol y se homogeneizó mecánicamente empleando un pistilo de teflón (10 golpes en promedio). Las muestras fueron tratadas siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN total fue determinada por espectrofotometría a 260 nm. La síntesis del ADNc se realizó a partir de 5 µg de ARN total, el cual se mezcló con 2.5 µM de hexámeros al azar y se incubó durante 7 minutos a 65°C; transcurrido este tiempo se mezcló con amortiguador RT 5X (0.25 M Tris-HCl, 0.5 M KCl, 30 mM MgCl₂, 25 mM DTT), 1 mM de desoxinucleotidotrifosfatados, 40 U de ARNsin y 200 U de reverso transcriptasa M-MLV. La reacción fue incubada durante 1 h a 37°C. El ADNc se guardó en congelación a -20°C hasta su uso.

RT-PCR en tiempo real. En este procedimiento se utilizó un termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems. El análisis de la expresión de los transportadores (GLUT-1 y GLUT-3) y de GCLC, se realizó empleando ensayos prediseñados por Applied Biosystems, los cuales contienen oligonucleótidos sentido y antisentido en concentraciones no limitantes y una sonda TaqMan® MGB 6-FAM específicos. Secuencia de las sonda TaqMan®: GLUT-1, 5'-ACTGTGGTGTGCTGTTCGTCGTGG-3', (Rn00684729_g1); GLUT-3, GTTACTGAAGGATGAATATGAAGC C) (Rn01492963_m1) y (Rn00563101_m1) GCLC: CTCAAGTGGGGTGACGAGGTG GAGT), Applied Biosystem, California USA. Como control interno del ensayo se determinó la expresión del ARN ribosomal de la subunidad 18S, utilizando una sonda TaqMan®VIC. Cada experimento se repitió 2 veces y todas las reacciones de PCR

se realizaron por triplicado. Se incluyó un control negativo sin ADNc. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el proveedor: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y 1 minutos a 60°C. El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo Δ CT (*Livak & Schmittgen, 2001*).

Análisis estadístico: Los datos se expresaron como la media \pm D.E. y se aplicó un análisis de varianza de factorial completo. Posteriormente, se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usando el programa Prisma 3.01, Graph Pad. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. La isquemia/reperfusión cerebral aumenta la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3

Para determinar el efecto de la isquemia cerebral transitoria sobre el nivel de expresión del ARNm del transportador de células gliales y de células endoteliales de la barrera hematoencefálica, GLUT-1 y del transportador neuronal, GLUT-3, se emplearon muestras de corteza frontoparietal de ratas sometidas a 2 h de isquemia inducida por 2 h de OAMC y sacrificadas a diferentes tiempos de reperfusión (0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24 y 48 h) y se midieron los niveles de los mensajeros por RT-PCR en tiempo real.

Encontramos que el nivel de expresión de GLUT1 no se altera después de 2 h de isquemia. Durante la reperfusión observamos dos cambios importantes. El primero fue un aumento de 2.16 ± 0.82 veces (Tukey, $p < 0.05$) después de 1 h de reperfusión; posteriormente, entre 2 y 10 h de reperfusión la expresión del transportador regresó a su nivel basal. Un segundo aumento lo observamos a las 24 h de reperfusión (3.9 ± 1.6 veces, Tukey, $p < 0.001$), el cual se mantuvo hasta las 48 h (3.3 ± 1.6 veces, Tukey, $p < 0.001$) (Figura 1).

Un efecto similar en el patrón de expresión del ARNm de GLUT-1 lo encontramos para el ARNm del transportador neuronal GLUT-3. A 1 h de reperfusión el nivel del ARNm de GLUT-3 aumentó 2.21 ± 0.15 veces (Tukey, $p < 0.001$). El nivel expresión regresó al nivel basal entre las 2 y 10 h de reperfusión; a las 24 h de reperfusión volvió a aumentar 3.03 ± 0.37 veces (Tukey, $p < 0.001$). En este caso, el nivel de expresión regresó a su estado basal a las 48 h de reperfusión (Figura 1).

3.2 El EAE induce la expresión de GLUT-1 y GLUT-3 en isquemia/reperfusión cerebral

Poco se conoce acerca del mecanismo protector del EAE en isquemia cerebral. En nuestro estudio determinamos el efecto del EAE sobre el nivel de expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3, con el objetivo de determinar uno de

sus posibles mecanismos de neuroprotección. Se emplearon muestras de corteza frontoparietal de ratas sometidas a 2 h de OACM y 2 h de reperfusion, el tratamiento con el EAE (360 mg/kg *i.p.*) fue administrado al inicio de la reperfusion.

Las ratas isquémicas que recibieron el tratamiento con el EAE mostraron un aumento significativo en la expresi3n del ARNm de GLUT-1 (1.68 ± 0.17 veces, Tukey, $p < 0.05$) y de GLUT-3 (2.74 ± 0.34 veces, Tukey, $p < 0.001$) con respecto a las ratas isquémicas que no recibieron el tratamiento. Adicionalmente, observamos que en las ratas control (sin isquemia) que recibieron el tratamiento con el EAE, se produjo un aumento significativo en el ARNm de GLUT-1 (1.86 ± 0.48 , Tukey, $p < 0.05$) y de GLUT-3 (5.17 ± 0.62 , Tukey, $p < 0.05$) con respecto a las ratas control (Figura 2).

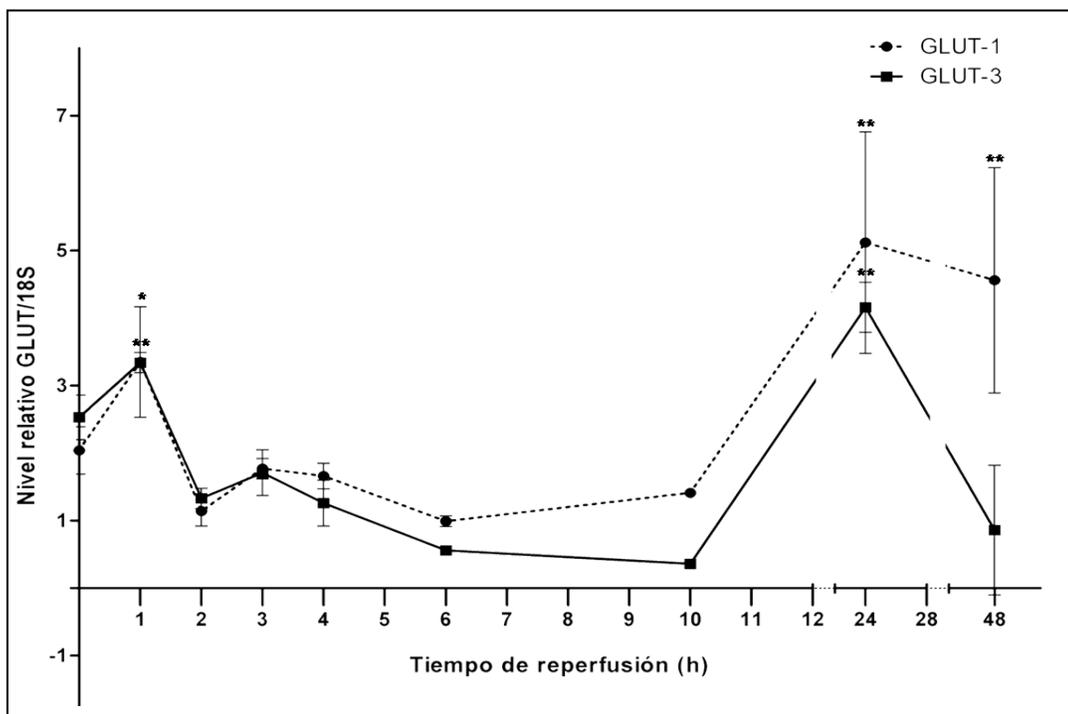


Figura 1. Efecto de la reperfusion cerebral en la expresi3n del ARNm de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3. Las ratas fueron sometidas a 2 h de OACM y fueron sacrificadas a diferentes tiempos de reperfusion (0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24 y 48 h). El ARN total fue extraido de corteza frontoparietal de cerebro y utilizado en la sntesis de ADNc. (●) Cambios en la expresi3n del ARNm de GLUT-1, (■) cambios en la expresi3n del ARNm de GLUT-3. La expresi3n de los transportadores se determin3 empleando sondas TaqMan, normalizando con la expresi3n del ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresi3n se emple3 el m3todo Δ CT. La expresi3n se expresa en n3mero de veces con respecto al grupo control (CT). Anova, Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

3.3 La SAC aumentó la expresión de GLUT-1 y GLUT-3 en isquemia/reperfusión cerebral

La SAC es el componente mayoritario del EAE (Lawson & Gardner, 2005). Está documentado que la SAC tiene un efecto neuroprotector en isquemia cerebral (Numagami & Ohnishi, 2001; Ji et al., 2006). En nuestro estudio evaluamos el efecto de la SAC sobre el nivel de expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3, con la finalidad de determinar si el efecto inducido por el EAE sobre el nivel de expresión de dichos transportadores, es atribuido a este principio activo. La SAC (300mg/kg *i.p.*) fue administrada al término de la isquemia y las ratas fueron sacrificadas a las 2 h de reperfusión.

En las ratas isquémicas tratadas con SAC, se observó un aumento estadísticamente significativo en el nivel de expresión de GLUT-3 (3.54 ± 0.9 veces, Tukey, $p < 0.001$), comparado contra las ratas isquémicas que no recibieron el tratamiento con SAC. En cambio, no se observó un incremento significativo en el nivel de expresión de GLUT-1 (0.70 ± 0.11 veces, Tukey, $p > 0.05$). Por otro lado,

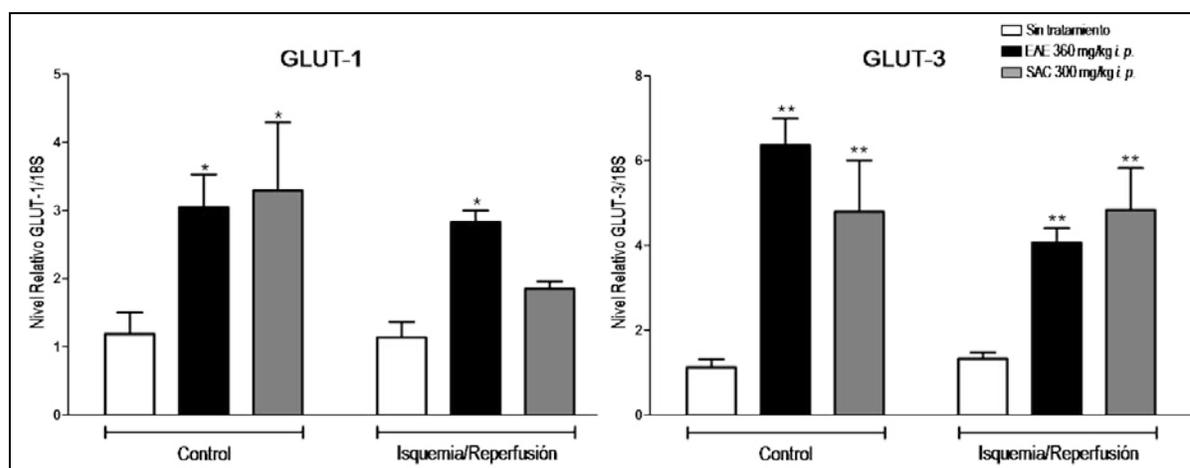


Figura 2. Efecto del EAE y de la SAC en la expresión de los ARNm de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3. Las ratas fueron sometidas a 2 h de OACM y fueron sacrificadas luego de 2 h de reperfusión. Se administró 360 mg/kg *i.p.* de EAE (1.2mL/kg *i.p.*) (barras negras) y 300 mg/kg *i.p.* de SAC (barra gris) al término de la isquemia. El ARN total fue extraído de corteza frontoparietal de cerebro y utilizado en la síntesis de ADNc. La expresión de los ARNm de los transportadores de glucosa se determinó empleando sondas TaqMan, normalizando con el ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método Δ CT. La expresión se cuantifica en número de veces con respecto al grupo control (CT). Anova, Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

encontramos que en las ratas control (sin isquemia) tratadas con SAC se observa un incremento significativo en el nivel de expresión de los ARNm de GLUT-1 (2.1 ± 1.7 , Tukey, $p < 0.05$) y de GLUT-3 (3.7 ± 1.2 veces, Tukey, $p < 0.001$) con respecto a las ratas control (Figura 2).

3.4 El EAE y la SAC aumentan la expresión de la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (GCLC) en isquemia/reperfusión cerebral

Determinamos el efecto del EAE y de la SAC sobre el nivel de expresión del ARNm de GCLC, con el objetivo de tener una referencia del estado redox celular. Los animales fueron tratados con el EAE y con la SAC al término de las 2 h de OACM y se sacrificaron después de 2 h de reperfusión.

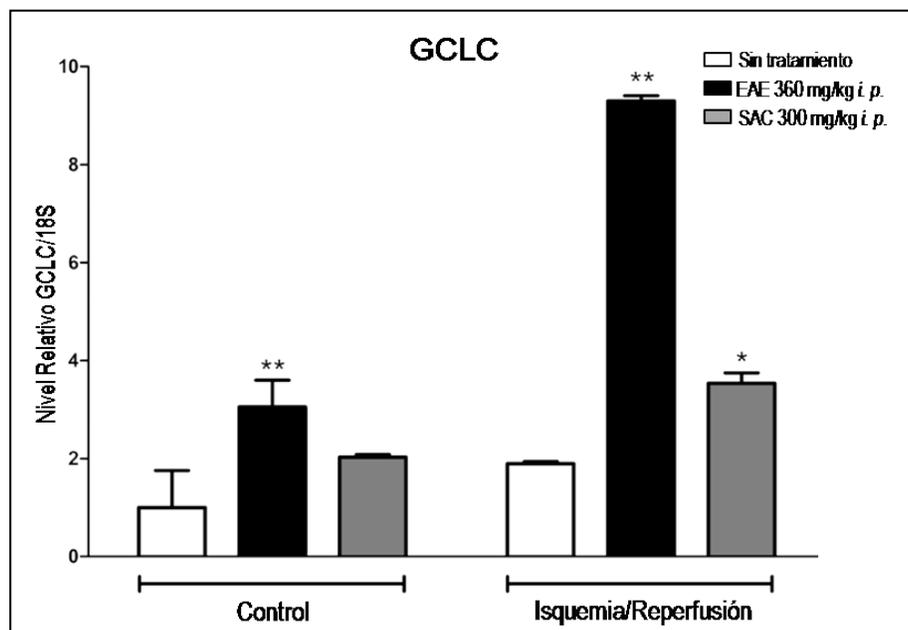


Figura 4. Efecto del EAE y de la SAC en la expresión del ARNm de GCLC. Las ratas fueron sometidas a 2 h OACM y fueron sacrificadas luego de 2 h de reperfusión. Se administró 360 mg/kg *i.p.* de EAE (1.2mL/kg *i.p.*) (barras negras) y 300 mg/kg *i.p.* de SAC (barra gris) al término de la isquemia. El ARN total fue extraído de corteza frontoparietal de cerebro y utilizado en la síntesis de ADNc. La expresión de ARNm de GCLC se determinó empleando sondas TaqMan, normalizando con el ARN ribosomal 18S. Para cuantificar el nivel de expresión se empleó el método Δ CT. La cuantificación representa el número de veces que cambia con respecto al grupo control (CT). Anova, Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

En las ratas isquémicas se observó que el tratamiento con el EAE induce un incremento significativo en la expresión de GCLC (7.90 ± 0.11 veces, Tukey, $p < 0.001$), con respecto a las ratas isquémicas sin tratamiento. Además, en las ratas control a las que se les administró el EAE se produjo un incremento significativo de 2.05 ± 0.53 veces (Tukey, $p < 0.001$) en el nivel de expresión de GCLC, comparado contra el de ratas control. Al evaluar el efecto de la administración de la SAC en la ratas isquémicas, encontramos un aumento estadísticamente significativo en el nivel de expresión del ARNm de GCLC (2.09 ± 0.21 veces, Tukey, $p < 0.05$); mientras que, en el grupo control tratado con SAC, no se observó un cambio significativo en el nivel de expresión de GCLC (Figura 3).

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

4.1 La isquemia/reperfusión cerebral aumenta la expresión del ARNm de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3

Estudios previos han examinado el efecto de la isquemia global y focal en la expresión de los transportadores de glucosa en cerebro de roedores adultos (*Lee & Bondy, 1993; Gerhart et al., 1994; McCall et al., 1995: 1996*). Sin embargo, este es el primer estudio en describir el curso temporal de la expresión genética de GLUT-1 y GLUT-3 posterior a un daño isquémico en cerebro de rata adulta, utilizando el método cuantitativo de la RT-PCR en tiempo real.

En el presente estudio demostramos que el daño ocasionado por la isquemia cerebral inducida por OACM en ratas, provoca alteraciones en el nivel de expresión del ARNm de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3. Encontramos un primer aumento en la expresión de ambos transportadores a 1 h de reperfusión. Este cambio representa un mecanismo de respuesta al requerimiento energético necesario para restaurar los gradientes iónicos neuronales e iniciar los mecanismos de reparación celular. De hecho, se sabe que la respuesta ante la falta de oxígeno induce la sobre expresión de genes que codifican para proteínas que participan en diversos procesos adaptativos ante la isquemia, como angiogénesis, proliferación, sobrevivencia celular, reactividad vascular, eritropoyesis y el metabolismo de la glucosa (*Semenza, 2001*).

El aumento en la expresión de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 puede resultar benéfico al favorecer el incremento de la concentración de glucosa intracelular en regiones cerebrales donde el suministro energético es bajo. *Urabe et al., (1996)*, evaluaron los cambios en la expresión de GLUT-1 y GLUT-3, utilizando Northern blot, en un modelo de isquemia inducida por OACM durante 3 h. Este grupo encontró un incremento del 300% en el nivel de GLUT-1 a 1 h de reperfusión, resultado similar al obtenido en nuestro estudio. Sin embargo, este grupo reportó que el nivel de expresión de GLUT-3 no se modifica hasta después de las 3 h de

reperfusión, donde observan un aumento del 300%; mientras que en nuestro estudio, detectamos un incremento en la expresión del ARNm de GLUT-3 desde la primera hora de reperfusión, la cual regresa a su estado basal a partir de las 2 h de reperfusión. Las diferencias observadas en ambos estudios pueden estar asociadas a la sensibilidad de las técnicas, debido a que la RT-PCR tiempo real es cuantitativa mientras que el Northern blot es semicuantitativo o incluso puede deberse al tiempo de isquemia utilizado por cada grupo.

Se desconocen los mecanismos de regulación de la expresión genética de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 en un proceso de isquemia cerebral; sin embargo, existen evidencias que sugieren tres diferentes mecanismos: 1) *la concentración de glucosa*. Estudios en cultivos celulares han reportado un incremento en el ARNm de GLUT-1 y GLUT-3 en respuesta a la concentración extracelular de glucosa (*Klip et al., 1994; Nagamatzu et al., 1994*), esto es importante ya que durante la isquemia/reperfusión se altera la concentración de glucosa; 2) *la concentración de calcio*. En cultivos de miocitos y fibroblastos la despolarización repetitiva induce un incremento en el ARNm de GLUT-1 (*Wertheimer et al., 1991*); una característica de la isquemia/reperfusión cerebral es inducir una intensa despolarización; y 3) *activación de HIF-1 α* . En cultivos no neuronales sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia se ha observado un incremento en el nivel de expresión de GLUT-1 y GLUT-3 en forma dependiente de HIF-1 α (*Chen et al., 2001; Baumann et al., 2007; Ren et al., 2008*); esto resulta interesante en el aspecto que la isquemia se caracteriza por la ausencia de oxígeno. El incremento observado en la expresión de ambos transportadores en isquemia cerebral a 1 h de reperfusión, podría estar asociado con la activación de HIF-1 α . En un modelo de isquemia inducido por arresto cardíaco, se encontró un aumento en el nivel de la proteína HIF-1 α a 1 h de reperfusión, provocando un incremento en la expresión de genes, entre los que se encuentra el transportador GLUT-1 (*Chávez & LaManna, 2002*).

Un segundo aumento en la expresión de GLUT-1 y GLUT-3 lo observamos a las 24 h de reperfusión. Sugerimos que el HIF-1 α también puede ser el responsable de la inducción de la expresión de los transportadores a tiempos largos, ya que en un modelo de isquemia cerebral inducido por 2 h de OACM, se encontró que el nivel de

la proteína HIF-1 α se incrementa desde las 6 h de reperfusión, y su máxima expresión se da a las 24 y 48 h de reperfusión (*Althaus et al., 2006*). Además, se demostró que el incremento en el nivel de HIF-1 α es funcional ya que se induce la expresión de sus genes blanco, como son eritropoyetina y el factor de crecimiento del endotelio vascular (*Althaus et al., 2006*).

El aumento en la expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3 (1 y 24 h) correlaciona con la concentración elevada de glucosa a 1 y 24 h de reperfusión reportada previamente por *Vannucci et al., (1994)*, en un modelo de isquemia cerebral inducido por ligación de la arteria carótida común. Esto nos sugiere que el incremento en la expresión del ARNm de ambos transportadores puede verse reflejado en un incremento en la concentración de la proteína y por lo tanto en el transporte de glucosa.

En un modelo de isquemia global, el flujo sanguíneo cerebral fue encontrado severamente reducido durante las primeras horas (16 % por debajo del control) y se mantuvo aproximadamente a la mitad del valor del control a los 2 días de la reperfusión (*Crumrine & LaManna, 1991*). Es probable que el incremento que observamos en el nivel de ARNm de ambos transportadores a las 24 horas, sea un mecanismo de defensa contra la hipoperfusión que se mantiene durante varias horas después de un periodo de isquemia, con la finalidad de suministrar sustrato energético y restablecer la función celular.

Por último, a las 48 h de reperfusión, encontramos un tercer incremento en el nivel de ARNm de GLUT-1; mientras que a este tiempo GLUT-3, regresó a su nivel basal de expresión. El incremento observado en GLUT-1, también podría estar asociado a la hipoperfusión observada al tercer día de reperfusión. La diferencia en la expresión observada entre ambos transportadores a las 48 h de reperfusión, podría estar asociada al tipo celular en el que se expresan los transportadores. GLUT-1 se expresa en astrocitos y en células endoteliales de la barrera hematoencefálica, mientras que GLUT-3 se expresa en neuronas, estos tipos celulares tienen diferentes funciones y diferente sensibilidad a la glucosa. El tráfico metabólico entre neuronas y astrocitos es complejo, la glucosa es captada predominantemente por los astrocitos; además, la glucosa por sí sola no es capaz de sostener la supervivencia de neuronas

in vitro. Resulta interesante que otros sustratos metabólicos (lactato y piruvato) pueden ser liberados por los astrocitos. Durante la actividad sináptica se observa una acumulación de glutamato en la hendidura sináptica, el transportador de glutamato astrocitico garantiza la remoción del glutamato de la hendidura sináptica, la entrada de Na⁺ cotransportado con glutamato activa la Na⁺/K⁺ ATPasa disminuyendo el nivel de ATP. Un nivel disminuido de ATP activa el flujo glucolítico estimulando la captación de glucosa en los capilares. El lactato y piruvato, principales productos de la glucolisis en astrocitos son liberado y tomado por las neuronas para obtener energía a través del ciclo de Krebs (Magistretti et al., 2000). Es muy probable que la explicación al incremento observado en GLUT-1 y la disminución de GLUT-3 tenga respuesta con lo mencionado anteriormente, donde se explica que no solo la glucosa sirve como sustrato para la obtención de energía por las neuronas.

4.2 El EAE y la SAC inducen la expresión de los ARNm de GLUT-1 y -3 en isquemia/reperfusión cerebral.

Se ha reportado que el EAE y la SAC tienen un efecto protector en isquemia cerebral (Numagami et al., 1996; Numagami & Ohnishi, 2001; Ji et al., 2006; Aguilera et al., 2009); sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido establecido. Previamente, se ha observado que la sobreexpresión de los transportadores de glucosa puede tener un efecto protector en isquemia cerebral (Lee & Bondy, 1993; Gerhar et al., 1996). GLUT-1 y GLUT-3 son regulados a nivel transcripcional por el factor de transcripción HIF-1 α (Chen et al., 2001; Baumann et al., 2007; Ren et al., 2008). La estabilización y consecuente activación de HIF-1 α , en condiciones de normoxia como en ausencia de oxígeno (e. g. isquemia cerebral), se ha asociado con el estado redox celular (Wang et al., 1995; Salceda & Caro, 1997; Guo et al., 2008). Es por ello que en el presente trabajo evaluamos el efecto del EAE y la SAC en el nivel de expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3 en isquemia cerebral, con la finalidad de determinar si este es uno de los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes.

En nuestros resultados observamos que en las ratas isquémicas que recibieron el tratamiento tanto con EAE como con SAC, se induce un incremento en

la expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3. Similar a datos reportados por otros investigadores donde en condiciones de normoxia *in vitro* y en un modelo de isquemia cerebral inducida por OACM se demostró que agentes antioxidantes (e. g. la vitamina E y quercetina) inducen un incremento en nivel de expresión GLUT-1 y GLUT-3 dependiente de la activación del HIF-1 α (Wilson & Poellinger, 2002; Zhang et al., 2004).

Es posible que este incremento en la expresión sea un mecanismo de protección; sin embargo, en datos no publicados por nuestro grupo de trabajo, encontramos que la SAC (300 mg/kg; *i.p.*) administrada al termino de la isquemia cerebral, no tiene un efecto protector a las 2 h de reperfusión. Dado que el efecto inducido por el extracto sobre la expresión de ambos transportadores es el mismo que el inducido por la SAC, podemos sugerir que este incremento no esta asociado al efecto protector. Al contrario, nos inclinamos por la idea de que el incremento en el nivel de expresión de ambos transportadores podría estar asociado a un mecanismo de neurotoxicidad. En este sentido, se ha demostrado que la exposición a una alta concentración de glucosa es tóxica para la célula (Shi & Liu, 2006).

El daño celular inducido por una concentración elevada de glucosa ha sido vinculado con la generación de ERO (Muranyi & Li, 2006; Tomlinson & Gardiner, 2008). En cultivos celulares se ha observado que una concentración óptima de glucosa (25 mM) mantiene un ambiente reducido en las neuronas; mientras que concentraciones por arriba de la concentración óptima (50-100 mM) favorecen condiciones de estrés oxidativo en el medio, incrementan la relación de GSH reducido/GSH oxidado y ocasiona muerte celular (Shi & Liu, 2006).

Por ello, sugerimos que el incremento en GLUT-1 y GLUT-3 inducido por el EAE y la SAC, aunque sea parte de una respuesta de neuroprotección, podría estar provocando neurotoxicidad. Sin embargo, para determinarlo, será necesario evaluar en nuestro modelo, si el efecto observado por los antioxidantes sobre la expresión de los transportadores de glucosa, también afecta el papel funcional de los transportadores lo que provocaría un aumento en la captación de glucosa, lo cual puede ser tóxico.

4.3 El EAE y la SAC inducen la expresión del ARNm de GCLC en isquemia/reperfusión cerebral.

En este estudio determinamos el efecto del EAE y de la SAC en el nivel de expresión del ARNm de GCLC, con la finalidad de tener un parámetro de la concentración de GSH y por lo tanto del estado redox celular. En nuestros resultados encontramos que en las ratas isquémicas, el tratamiento con el EAE y con la SAC induce un incremento en el nivel de expresión de GCLC. Este resultado es similar a los reportados por otros investigadores, quienes encontraron que plantas tropicales como la *Rubia cordifolia*, la *Fagonia cretica linn* y la *Tinospora cordifolia* (caracterizadas por tener un alto contenido de antioxidantes), así como agentes antioxidantes como el quercetin y epicatequina gallate, inducen un aumento en el nivel de expresión de GCLC en cultivos neuronales y en rebanadas hipocampales sometidas a condiciones de normoxia e isquemia. Es relevante hacer notar que el incremento en la expresión de GCLC lo vieron reflejado como un aumento en el nivel de GSH (Rawal et al., 2004, Guo et al., 2008; Kang et al., 2009). Esto sugiere que en nuestro modelo, el EAE y la SAC podrían favorecer un ambiente redox reductor, al actuar como atrapadores de radicales libres y al promover la síntesis de GSH mediada por el incremento en la expresión del ARNm de GCLC.

En nuestro estudio encontramos que el tratamiento con EAE produce un mayor incremento en la expresión de GCLC en las ratas isquémicas, que la SAC. Esta diferencia en el efecto del EAE sobre el nivel de expresión de GCLC, posiblemente esté asociado a su efecto protector y puede relacionarse a la complejidad del extracto, ya que contiene otros compuestos con propiedades antioxidantes como la S-alil-mercaptilcisteína, γ -glutamyl-S-alil-cisteína, etc. (Lawson & Gardner, 2005).

La expresión de GCLC es regulada principalmente a nivel transcripcional. El gen de GCLC contiene múltiples sitios de unión para factores de transcripción; estos sitios incluyen elementos de respuesta antioxidante (AREs), sitios de unión para el factor AP1 (de "activator protein 1") y sitios de unión para el factor SP1 (de "specificity protein 1") (Mulcahy et al., 1997; Tomonari et al., 1997). Los ARE son los principales elementos que regulan la transcripción del ARNm de GCLC a través de la

interacción con el factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor-2 (Nrf2) (*Li et al., 1996; Mulcahy et al., 1997; Wild et al., 1999*).

El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión de numerosos genes que codifican para enzimas detoxificantes o con actividad antioxidante, entre los que destaca el gen de la GCLC. Su actividad transcripcional es regulada tanto por agentes oxidantes como por antioxidantes. Por un lado, la actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplásmica llamada Keap1 (de “*Kelch-like ECH-associated protein 1*”) (*Kensler, 2007*). La dimerización de Keap1/Nrf2 induce la ubiquitinación de Nrf2 en residuos de lisina lo que promueve su degradación vía proteosomal. La translocación de Nrf2 al núcleo es regulada por agentes oxidantes, los cuales al oxidar a grupos sulfhidrilos de las cisteínas de Keap1 o al inducir la fosforilación de un residuo de serina de Nrf2, promueven la disociación del complejo Keap1/Nrf2 (*Kobayashi et al., 2006*). Por otro lado, *Venugopal & Jaiswal (1996)*, demostraron un incremento en la activación de Nrf2 en respuesta a antioxidantes (e. g. tert-butyl hydroquinone). Un estudio reciente reportó que el extracto acuoso *Acanthopanax senticosus* induce un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes (e. g. GCLC); este incremento se encontró dependiente de la activación de factor Nrf2 (*Wang et al., 2009*).

El incremento en la expresión de GCLC inducido por la SAC y el EAE podría estar asociado a la activación de Nrf2. Sin embargo, el mecanismo por el cual agentes antioxidantes inducen la expresión de Nrf2 no está determinado.

4.4 CONCLUSIONES

En resumen, este es el primer estudio en describir el curso temporal de la expresión genética de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3 en isquemia en cerebro de rata adulta, utilizando el método cuantitativo de la RT-PCR en tiempo real. Además, nuestros datos proporcionan la primera evidencia de que agentes antioxidantes como el EAE y la SAC promueven la expresión de los ARNm de GLUT-1 y GLUT-3. Por otro lado, la inducción de la expresión del ARNm de GCLC por el EAE y la SAC podría estar participando en el mecanismo de neuroprotección en isquemia cerebral.

5. ANEXOS

Anexo 1

Participación en el XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and function. Chicago, IL, USA. June 29 – July 3rd. 2009.



Brain poster session: neuroprotection

S438

tection was observed in male neurons infected with shRNA and additionally exposed to TRP channel inhibitors. Consistent with TRP inhibitor data, no protection was observed in female neurons infected with TRPM2 shRNA lentivirus.

Conclusions: Sexual dimorphism in ischemic injury after stroke is well documented and the effect of sex steroids in outcome has been well established. Using sex-specific cortical neuronal cultures, we report a gender-specific role for TRPM2 channel activation in neuronal damage following *in vitro* ischemia. These

data indicate that differential TRPM2 channel regulation following ischemia contributes to sex-specific outcome and that inhibition of TRPM2 channels may provide a novel neuroprotective strategy for improving stroke outcomes in men.

References

1. Herson PS, Ashford ML. *J Physiol* 1997;501.1, 59–662.
2. McNulty S, Fonfria E. *Pflugers Arch* 2005;451, 235–42.

499. Involvement of HIF pathway in the protective mechanisms of aged garlic extract in ischemia

C.D. Gomez-Martinez¹, P. Aguilera², M. Espinoza-Rojas³, P.D. Maldonado², A. Ortiz-Plata⁴ and M.E. Chanez-Cardenas²

¹Universidad Autonoma de Guerrero; ²Patologia Vasculiar Cerebral, Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia; ³Laboratorio de Biologia Molecular, Universidad Autonoma de Guerrero; ⁴Neuropatologia, Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia, Mexico, Mexico

Ischemia and reperfusion generate oxidative stress hence the use of antioxidants diminish disease progression. Aged garlic extract (AGE) is an odorless garlic presentation with antioxidant properties. In middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in rats the administration of AGE at the onset of reperfusion (R) significantly reduced the size of the infarct area. The treatment with AGE prevented the increase in nitrotyrosine positive cells and the decrease in antioxidant enzymes activity induced by MCAO. Several antioxidant compounds like vitamin E and quercetin decrease damage induced by ischemia partially through the hypoxia inducible factor (HIF) pathway. In order to determine if this pathway is involved in the protective mechanism of AGE, we evaluated the expression of HIF-1 alpha and its target genes hemoxygenase-1 (HO-1) and glucose transporter 1 and 3 (GLUT-1 and -3).

Methods: Rats were subjected to MCAO for 2h, treated with 1.2 mL/kg/i.p. of AGE at the beginning of reperfusion (R) and sacrificed after 2h (2I/2R group). Brain damage was determined measuring the infarct area by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining and evaluating motor impairment.¹ Total RNA was obtained from frontoparietal cortex and concentration was determined spectrophotometrically. Five micrograms of RNA were used to synthesize the cDNA. TaqMan probes were used for detection of HIF-1alpha, HO-1, GLUT-1 and -3 mRNA. 18S ribosomal RNA was used as an internal control. Amplification was performed utilizing an ABI PRISM 7500 sequence detection system from Applied Biosystems. Data were calculated utilizing the DCT method. Data are expressed as mean-fold change ± s.d. and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Tukey test

(SPSS 13.0). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: AGE reduced the infarct area in 2I/2R + AGE group by 70%. However, this treatment itself was not associated with a noticeable improvement in the neurological outcome. HIF-1 alpha mRNA in 2I/2R group (0.62 ± 0.04 -fold) showed an increase with the AGE treatment (1.84 ± 0.12 -fold). After this result we decided to analyze the response of HIF-1 target genes HO-1, GLUT-1 and -3. HO-1 mRNA showed an increase after 2I/1R and 2I/2R (16.23 ± 4.19 and 48.93 ± 20.70 -fold respectively). 2I/2R + AGE group did not induce any significantly change (61.24 ± 18.35 -fold). After 1h R, GLUT mRNA increased (GLUT-1, 2.43 ± 0.77 and GLUT-3, 3.16 ± 0.48 -fold) and returned to basal level after 2h R (GLUT-1, 1.03 ± 0.33 and GLUT-3, 1.33 ± 0.15 fold). AGE treatment after 2h R induces an increase in GLUT-3 mRNA in control+AGE and 2I/2R+AGE groups (6.62 ± 2.95 and 3.44 ± 1.42 -fold, respectively).

Conclusions: The increase observed in HO-1 and GLUT-1 mRNA in the 2I/1R group could be associated to the HIF-1 alpha protein stabilization or by activation of other transcription factors as part of brain endogenous protective mechanisms. Interestingly, HIF-1 alpha and GLUT-3 mRNA was increased by AGE treatment. Since HIF-1 alpha and its target genes could contribute to the establishment of tolerance in the brain, it is possible that AGE is contributing to protect brain through the activation of this pathway.

Reference

1. Longa EZ *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20:84–91.

Anexo 2

Participación en la XXIV Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

México, D. F. Mayo 21-22, 2009.

Suplemento I 2009

Resúmenes de investigación

Efecto de la isquemia/reperfusión cerebral en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en un modelo murino *in vivo*

Carlos Daniel Gómez-Martínez^{1,2}, Mónica Espinoza-Rojo², María Elena Cháñez-Cárdenas¹, Perla D. Maldonado¹, Alma Ortiz-Plata³, Penélope Aguilera¹

El daño inducido en la isquemia cerebral, se acrecienta debido al estrés oxidativo generado durante el período de reperfusión. Se ha propuesto que regular la concentración de glucosa que ingresa a las células es importante para prevenir el daño por estrés oxidativo. En el cerebro, el transporte de glucosa es dependiente de dos isoformas de los transportadores de glucosa: GLUT1, presente en células gliales, y GLUT3, expresado en neuronas.

Empleando un modelo murino *in vivo* de isquemia/reperfusión cerebral, determinamos por RT-PCR cuantitativa la expresión del RNAm de ambos transportadores en corteza frontoparietal. Las ratas fueron sometidas a 2 hs de isquemia (inducida por la oclusión de la arteria cerebral media) y posteriormente fueron sacrificadas a diferentes tiempos de reperfusión. Se sintetizó cDNA a partir de 5 µg de RNA total. Sondas TaqMan fueron empleadas en la detección del RNAm de GLUT-1 y GLUT-3. El RNA ribosomal 18S fue usado

como control interno. Los datos se expresan como veces de cambio \pm D.E. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey (SPSS 13.0). $P < 0.05$ fue considerado significativo.

Desde el inicio de la reperfusión, se observó un incremento en la expresión de ambos transportadores (GLUT-1, 1.54 ± 0.65 y GLUT-3, 3.07 ± 1.67), siendo significativo el cambio a 1 h de reperfusión (GLUT-1, 2.43 ± 0.77 y GLUT-3, 3.16 ± 0.48) y regresando al nivel basal a las 2 hs (GLUT-1, 1.03 ± 0.33 y GLUT-3, 1.33 ± 0.15).

Es probable que el incremento inmediato en la expresión genética de los transportadores responda al mecanismo de defensa debido a la depleción de los almacenes energéticos cerebrales. Paradójicamente, este incremento puede resultar tóxico para la célula debido a la asociación que se ha encontrado entre el incremento de glucosa intracelular con la producción de especie reactivas del oxígeno.

¹Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, ²Laboratorio de Neuropatología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. ³Laboratorio de Toxicología y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero

6. REFERENCIAS

- Aguilera P, Chánez M, Ortiz A, León D, Barrera D, Espinoza M, Villeda J, Sánchez A, Maldonado P (2009). Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine*.
- Althaus J, Bernaudin M, Petit E, Toutain J, Touzani O, Rami A (2006). Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochemistry International*. 48: 687–695.
- Baumann M, Zamudio S, Illsley N (2007). Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293: C477–C485.
- Bruick R & McKnight S (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 294: 1337–1340.
- Callapina M, Zhou J, Schmid T, Köhl R, Brüne B (2005). NO restores HIF-1 α hydroxylation during hypoxia: Role of reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*. 39: 925 – 936.
- Castrejón V, Carbó R, Martínez M (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista Educ Bioquímica*. 26 (2): 49-57.
- Chavez J & LaManna J (2002). Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in the Rat Cerebral Cortex after Transient Global Ischemia: Potential Role of Insulin-Like Growth Factor-1 *Journal of Neuroscience*. 22 (20): 8922–8931.
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail F, Maity A (2001). Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1. 276 (12): 9519–9525.
- Crumrine R & LaManna J (1991). Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 11: 272–282.
- Duelli R & Kuschinsky W (2001). Brain Glucose Transporters: Relationship to Local Energy Demand. *News Physiol. Sci*. 16: 71-76.
- Gerhart D, Leino R, Taylor W, Borson N, Drewes L (1994). GLUT1 and GLUT3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia: an in situ hybridization study, *Mol. Brain Res*. 25: 313–322.
- Guo S, Bragina O, Xu Y, Cao Z, Chen H, Zhou B, Morgan M, Lin Y, Jiang B, Liu K, Shi H (2008). Glucose up-regulates HIF-1 expression in primary cortical neurons in response to hypoxia through maintaining cellular redox status. *J. Neurochem*. 105: 1849–1860.
- Huang C, Chang L, Anderson M, Meister A (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*. 268: 19675–80.
- Ji K, Jae L, Namsoo C, Hyang S, Won K (2006). S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Radic Res*. 40 (8): 827-35.
- Jiang B, Semenza G, Bauer C, Marti H (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*. 271: C1172–C1180.
- Kaluzová M, Kaluz S, Lerman M, Stanbridge E (2004). DNA Damage Is a Prerequisite for p53-Mediated Proteasomal Degradation of HIF-1 α in Hypoxic Cells and Downregulation of the Hypoxia Marker Carbonic Anhydrase IX. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (13): 5757–5766.
- Kang J, Chang S, Jang H, Min J, Kim D, Lee S, Ko S, Park S, Needs P, Jo Y, Kim M (2009). Quercetin-Induced Upregulation of Human GCLC Gene Is Mediated by cis-Regulatory Element for

Early Growth Response Protein-1 (EGR1) in INS-1 Beta-Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 108: 1346–1355.

Kensler T, Wakabayashi N, Biswal S (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47: 89-116.

Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz P (1994). Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J*. 8: 43-53.

Kobayashi A, Kang M, Watai Y, Tong K, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of keap. *Mol Cel Biol*. 26: 221-229.

Kong X, Alvarez B, Lin Z, Castañón J, Caro J (2007). Constitutive/Hypoxic Degradation of HIF- α Proteins by the Proteasome Is Independent of von Hippel Lindau Protein Ubiquitylation and the Transactivation Activity of the Protein. *J Biol Chemistry*. 282 (21): 15498–15505.

Lawson L & Gardner C (2005). Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. *J Agric Food Chem*. 53(16): 6254-61.

Lee W & Bondy C (1993). Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression. *Endocrinology*. 133 (6): 2540-4.

Li S, Thompson S, Kavanagh T, Woods J (1996). Localization by in situ hybridization of gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA expression in rat kidney following acute methylmercury treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 141: 59–67.

Livak K & Schmittgen T (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta (CT)) Method. *Methods*. 25 (4): 402-8.

Longa E, Weinstein P, Carlson S, Cummins R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 20 (1): 84-91.

Magistretti P, Pellerin L, Martin J (2000). Brain Energy Metabolism. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*.

McCall A, Moholt M, Van A, Cherry N, Lessov N, Tiffany N, Thompson M, Downes H, Woodward W (1995). Progressive hippocampal loss of immunoreactive GLUT3, the neuron-specific glucose transporter, after global forebrain ischemia in the rat. *Brain Res*. 670: 29–38.

McCall A, Van A, Nipper V, Moholt M, Downes H, Lessov N (1996). Forebrain ischemia increases GLUT1 protein in brain microvessels and parenchyma. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 16: 69–76.

Menzies S, Hoff J, Betz A (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*. 31 (1): 100-6; discussion 6-7.

Modo M, Stroemer R, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods*. 104 (1): 99-109.

Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*. 81: 277S–283S.

Moustafa R & Baron J (2008). Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br J Pharmacol*. 153 (1): S44-54.

Mulcahy R, Wartman M, Bailey H, Gipp J (1997). Constitutive and betanaphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem*. 272: 7445–7454.

Muranyi M & Li P (2006). Hyperglycemia increases superoxide production in the CA1 pyramidal neurons after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 393 (2-3): 119-21.

Myhrstad M, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug J (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med.* 32: 386–393.

Nagamatsu S, Sawa H, Inoue N, Nakamichi Y, Takeshima H, Hoshino T (1994). Gene expression of GLUT3 glucose transporter regulated by glucose in vivo in mouse brain and in vitro in neuronal cell cultures from rat embryos. *Biochem. J.* 300: 125-131.

Numagami Y, Sato S, Ohnishi S (1996). Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int.* 29 (2): 135-43.

Numagami Y & Ohnishi S (2001). S-Allylcysteine Inhibits Free Radical Production, Lipid Peroxidation and Neuronal Damage in Rat Brain Ischemia. *J. Nutr.* 131: 1100S–1105S.

Park S, Bae I, Lee Y (2008). Flavonoids-Induced Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α /2 α Is Mediated Through Chelation of Iron. *Journal of Cellular Biochemistry.* 103: 1989–1998.

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. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 18: 196–205.

Qutub A & Hunt C (2005). Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res Rev.* 49 (3): 595-617.

Rawal A, Muddeshwar M, Biswas S (2004). *Rubia cordifolia*, *Fagonia cretica* linn and *Tinospora cordifolia* exert neuroprotection by modulating the antioxidant system in rat hippocampal slices subjected to oxygen glucose deprivation. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 4: 11.

Ren B, Deng L, Wang J, Zhu Y, Wei L, Zhou Q (2008). Hypoxia regulation of facilitated glucose transporter-1 and glucose transporter-3 in mouse chondrocytes mediated by HIF-1 α . *Joint Bone Spine.* 75 (2): 176-81.

Salceda S & Caro J (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272: 22642–22647.

Semenza G (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 7: 345-50.

Shi H & Liu K (2006). Effects of glucose concentration on redox status in rat primary cortical neurons under hypoxia. *Neurosci Lett.* 410 (1): 57-61.

Simpson I, Dwyer D, Malide D, Moley K, Travis A, Vannucci S (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295: E242–E253.

Tomlinson D & Gardiner N (2008). Glucose neurotoxicity. *Nature Publishing Group.* 9: 36-45.

Tomonari A, Nishio K, Kurokawa H, Fukumoto H, Fukuoka K, Iwamoto Y, Usuda J, Suzuki T, Itakura M, Saijo N (1997). Identification of cis-acting DNA elements of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 232: 522–527.

Tsuruta R, Fujita M, Ono T, Koda Y, Koga Y, Yamamoto T, Nanba M, Shitara M, Kasaoka S, Maruyamac I, Yuasa M, Maekawa T (2009). Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion

radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Res.*

Urabe T, Hattori N, Nagamatsu S, Sawa H, Mizuno Y (1996). Expression of glucose transporters in rat brain following transient focal ischemic injury. *J Neurochem.* 67 (1): 265-71.

Vannucci R, Yager J, Vannucci S (1994). Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14 (2): 279-288.

Vannucci S, Reinhart R, Maher F, Bondy C, Lee W, Vannucci R, Simpson I (1998). Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 107 (2): 255-64.

Vannucci S, Seaman L, Vannucci R (1996). Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16 (1): 77-81.

Venugopal R & Jaiswal A (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(25): 14960-5.

Wakunaga of America Co., LTD. Mission Viejo, CA, USA. Aged garlic extract (2006). Research excerpts from peer reviewed scientific journals and scientific meetings. Pp 1, 45.

Wang X, Hai C, Liang X, Yu S, Zhang W, Li Y (2009). The protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms aqueous extracts against oxidative stress: Role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *J Ethnopharmacol.*

Wang G, Jiang B, Semenza G (1995). Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 212: 550-556.

Wei Y, Chun L, Wen F (2008). Enhancement of Glucose Transporter Expression of Brain Endothelial Cells by Vascular Endothelial Growth Factor Derived from Glioma Exposed to Hypoxia. *Mol Pharmacol.* 73: 170-177.

Weinberg D, Manier M, Richardson M, Haibach F (1993). Identification and quantification of organosulfur compliance markers in a garlic extract. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1): 37-41.

Wertheimer E, Sasson S, Cerasi E, Ben-Neriah Y (1991). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (6): 2525-9.

Wild A, Moinova H, Mulcahy R (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 274: 33627-33636.

Wilson W & Poellinger L (2002). The dietary flavonoid quercetin modulates HIF-1a activity in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 293: 446-450.

Wood I & Trayhurn P (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 89 (1): 3-9.

Zhang B, Tanaka J, Yang L, Yang L, Sakanaka M, Hata R, Maeda N, Mitsuda N (2004). Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. *Neuroscience.* 126 (2): 433-40.