



Título del artículo.

Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa [GLUTs] en isquemia cerebral *in vivo*.

Título del artículo en idioma Inglés.

Effect of resveratrol on expression level of glucose transporters [GLUTs] in cerebral ischemia *in vivo*.

Autores.

Anahi Tornos-Reyes
Alma Ortiz-Plata
Ma Isabel Salazar Sánchez
José Pedraza-Chaverri
Penélope Aguilera
Mónica Espinoza-Rojo

Referencia bibliográfica:

MLA

Tornos-Reyes, Anahi, Alma Ortiz-Plata, Ma Isabel Salazar Sánchez, José Pedraza-Chaverri, Penélope Aguilera y Mónica Espinoza-Rojo. Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa [GLUTs] en isquemia cerebral *in vivo*. *Tlamati* 8.1, (2017): 27-32. Print.

APA

Tornos-Reyes, A., Ortiz-Plata, A., Salazar Sánchez, M. I., Pedraza-Chaverri, J., Aguilera, P. y Espinoza-Rojo, M. (2017). Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa [GLUTs] en isquemia cerebral *in vivo*. *Tlamati*, 8(1), 27-32.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Junio del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa [GLUTs] en isquemia cerebral *in vivo*

Anahi Tornos-Reyes^{1,2,*}
Alma Ortiz-Plata³
Ma Isabel Salazar Sánchez⁴
José Pedraza-Chaverri⁵
Penélope Aguilera²
Mónica Espinoza-Rojo¹

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Av. Lázaro Cárdenas s/n. CU SUR. Col. La Haciendita, Chilpancingo, México. Tel: +(52) 747 1223974.

² Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Laboratorio de Patología Vascular Cerebral,

³ Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Laboratorio de Neuropatología Experimental.

⁴ Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Inmunología

⁵ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Biología.

*Autor de correspondencia
atreyes_25@hotmail.com

Resumen

La isquemia resulta de la oclusión de una arteria cerebral importante, generando alteraciones metabólicas celulares, que se exacerba durante la reperusión. La disminución del flujo sanguíneo cerebral restringe la entrega de oxígeno y glucosa, disminuyendo el metabolismo energético e induciendo excitotoxicidad por glutamato. Antioxidantes como el Resveratrol [RSV] previenen el daño isquémico, mejorando el metabolismo energético al aumentar la función mitocondrial en las neuronas, proceso mediado por los transportadores de glucosa [GLUTs]. Nosotros investigamos si el RSV regula la expresión del ARNm de los GLUTs después de isquemia cerebral. Ratas Wistar macho (250-350 gr) se dividieron en: 1.Sham; 2.Control: (CT); 3.vehículo (VH), etanol 50%; 4.RSV 1 mg/kg, iv; 5.isquemia / reperusión (I/R), oclusión de la arteria cerebral media (2 h) seguido de reperusión (2, 4 y 24hrs.); 6.I / R-VH, y 7.I / R-RSV (administrada al inicio de la reperusión). Los experimentos de RT-PCR en tiempo real mostraron que a **2hI/2hR** existe una tendencia en el aumento de la expresión los GLUTs, principalmente de GLUT1 (1.7 veces en relación al CT). El VH y el RSV disminuyeron el ARNm de los tres GLUTs tanto en el grupo CT como en I/R. Tras **2hI/4hR** y **2hI/24hR** disminuyó la expresión de los tres GLUTs por debajo del CT, en tanto que la administración del RSV después de 4hR regresó a niveles basales la expresión de GLUT1 (2.41 ± 0.17), GLUT3 (2.97 ± 0.18) y GLUT4 (1.14 ± 0.36) mientras que a las **2hI/24hR** el RSV no tuvo efecto. La administración aguda del RSV al inicio de la R fue capaz de modificar la expresión del ARNm de los GLUTs después de un evento isquémico, el efecto más evidente del RSV fue a 2hI/4hR ya que previno la disminución del ARNm de los tres GLUTs inducida por I/R.

Palabras clave: Isquemia cerebral, GLUTs, Resveratrol

Como citar el artículo:

Tornos-Reyes, A., Ortiz-Plata, A., Salazar Sánchez, M. I., Pedraza-Chaverri, J., Aguilera, P. y Espinoza-Rojo, M. (2017). Efecto del resveratrol sobre el nivel de expresión de los transportadores de glucosa [GLUTs] en isquemia cerebral *in vivo*. *Tlamati*, 8(1), 27-32.

Abstract

Ischemia results from the occlusion of an important cerebral artery, generating cellular metabolic alterations, which is exacerbated during reperfusion. Decrease in cerebral blood flow restricts delivery of oxygen and glucose and decreasing energy metabolism and inducing excitotoxicity by glutamate. Antioxidants such as Resveratrol [RSV] prevent ischemic damage, improving energy metabolism by increasing mitochondrial function in neurons, a process mediated by glucose transporters [GLUTs]. We investigated whether RSV regulates the expression of ARNm of GLUTs after cerebral ischemia. Male Wistar rats (250-350 gr) were divided into: 1. Sham; 2. Control: (CT); 3. Vehicle (VH), 50% ethanol; 4. RSV 1 mg / kg, iv; 5. ischemia / reperfusion (I / R), occlusion of the middle cerebral artery (2 h) followed by reperfusion (2, 4 and 24 hrs.); 6. I / R-VH, and 7. I / R-RSV (administered at the beginning of reperfusion). Real-time RT-PCR experiments showed that at **2hI / 2hR** there is a tendency in the increase of GLUTs expression, mainly of GLUT1 (1.7 times in relation to CT). VH and RSV decreased the ARNm of all three GLUTs in both the CT and I / R groups. After **2hI / 4hR** and **2hI / 24hR** the expression of the three GLUTs decreased below the CT, while the administration of the RSV after 4hR returned to basal levels the expression of GLUT1 (2.41 ± 0.17), GLUT3 (2.97 ± 0.18) and GLUT4 (1.14 ± 0.36) while at **2hI / 24hR** the RSV had no effect. The acute administration of RSV at the beginning of the R was able to modify the expression of the ARNm of GLUTs after an ischemic event, the most evident effect of RSV was at 2hI / 4hR since it prevented the reduction of the ARNm of the three GLUTs induced by I / R.

Keywords: cerebral ischemia, GLUTs, Resveratrol

Introducción

En México la prevalencia del accidente cerebrovascular [ACV] es del 11.5% (Cabrera Rayo, Martínez Olazo, Laguna Hernández, Juárez Ocaña, Rosas Barrientos, Loria Castellanos, Medellín García et al., 2008) y se encuentra entre las 7 principales causas de muerte, ocupando el 3° lugar dentro de esta lista (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2010). Según su etiología el ACV se clasifica en hemorrágico e isquémico, siendo este último el responsable de más del 80% de los casos (Díez-Tejedor, Del Brutto, Álvarez-Sabín, Muñoz, Abiusi, 2001; Cabrera Rayo et al. 2008). La isquemia cerebral [I] es el resultado de la oclusión de una arteria cerebral importante en la mayoría de los casos es la arteria cerebral media [ACM] (Cabrera Rayo et al. 2008) e implica una cascada de eventos metabólicos que comienzan durante el insulto y prosiguen en la reperfusion [R] periodo de recuperación del flujo sanguíneo. El deterioro del flujo sanguíneo cerebral restringe el suministro de oxígeno, disminuye el meta-

bolismo de la glucosa e induce excitotoxicidad por glutamato y estrés oxidativo. La regulación del estrés oxidativo es importante sobre todo durante R, ya que la entrada de glucosa a la célula genera la producción de ERO's, en un ambiente en donde la actividad antioxidante endógena se encuentra disminuida. Con base en lo anterior surge la necesidad de combinar estrategias terapéuticas, de manera que se puedan minimizar los daños ocasionados por el estrés oxidativo celular asociado a la IC y la R. Estudios recientes revelan que el uso de una mezcla de antioxidantes resulta efectivo para minimizar los daños ocasionados por la trombólisis seguida de un infarto de miocardio, demostrando la utilidad de los antioxidantes en la aplicación clínica como tratamiento (Hicks, Montes-Cortes y Cruz-Dominguez, 2007). Adicionalmente, hemos demostrado que la administración del extracto de ajo envejecido y el resveratrol [RSV] al inicio de la R previenen el daño ocasionado por la oclusión de la arteria cerebral media [OACM] en el modelo experimental en rata (Cervantes, Montes de Oca Balderas, Gutiérrez-Baños, Orozco-Ibarra,

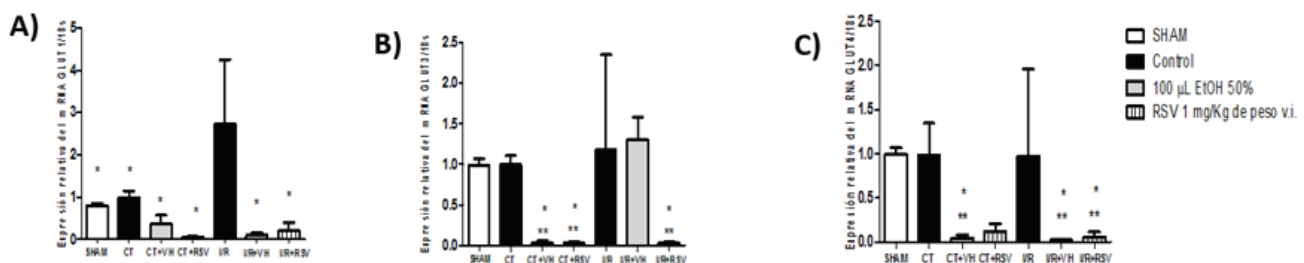


Figura 1. Efecto de la administración de RSV en la expresión relativa de los GLUTs a 2hI/2hR. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar agrupados en dos categorías 1) Control: animales con cirugía pero sin oclusión de la arteria cerebral (SHAM), animales sin ningún tipo de tratamiento (CT), animales control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

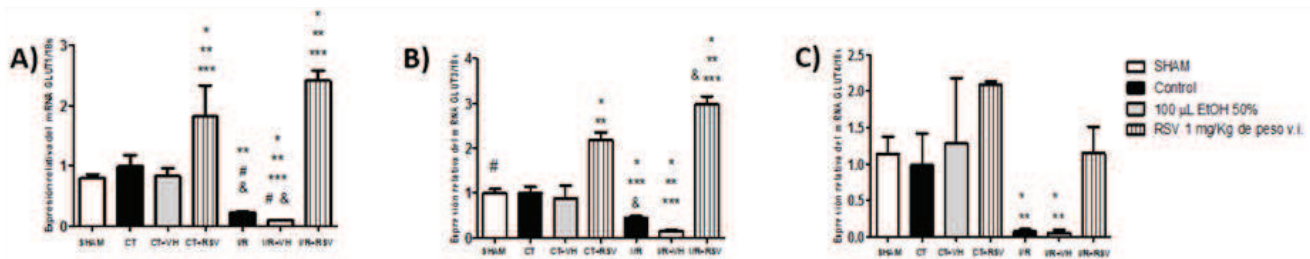


Figura 2. Efecto de la administración de RSV en la expresión relativa de los GLUTs a 2h/4hR. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar agrupados en dos categorías 1) Control: animales con cirugía pero sin oclusión de la arteria cerebral (SHAM), animales sin ningún tipo de tratamiento (CT), animales control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

Fernández-Rojas, Medina-Campos, Espinoza-Rojo, Ruiz-Tachiquín et al., 2013). Además, se le ha atribuido un efecto neuroprotector contra la lesión provocada por la I/R al restaurar significativamente la actividad del complejo respiratorio mitocondrial (Yousuf, Atif, Ahmad, Hoda, Ishrat, Khan e Islam, 2008), recuperar el contenido de ATP (Li, Yan, Yang, Chen, Li, Jiang y Zhang, 2010) y restablecer la actividad ATPasa Na^+/K^+ . Lo anterior, nos permite inferir que el efecto del antioxidante puede relacionarse con el aumento y/o regulación en la captación de glucosa, derivado posiblemente de la regulación de la expresión de sus proteínas transportadoras de glucosa [GLUTs]. Entonces debido a que la I/R provoca alteraciones en la expresión de los transportadores de glucosa en cerebro en un proceso dependiente del estado redox, en el presente estudio se evaluó el efecto del RSV sobre la regulación de ARNm de GLUT1, GLUT3 y GLUT4.

Materiales y métodos

Modelo animal

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar de 250-320 g de peso procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez". Durante el procedimiento experimental se siguieron las reglas de uso y manejo de animales establecido por la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a los principios éticos para las investigaciones médicas descritos por Helsinki (Asociación Médica Mundial).

Modelo experimental

Las ratas fueron divididas en: 1.Sham; 2.Control: [CT]; 3.vehículo [VH], etanol 50%; 4.RSV 1 mg/kg, iv; 5.isquemia / reperusión [I/R], oclusión de la arteria cerebral media (2 h) seguido de reperusión (2, 4 y 24hrs.); 6.I / R-VH, y 7.I / R-RSV (administrada al inicio de la reperusión). La isquemia cerebral transitoria se indujo

mediante OACM empleando el método descrito por Longa, et al. (1989). Las ratas del grupo VH, RSV y I/R se sacrificaron al término de los diferentes tiempos de R (2, 4, y 24 horas). Posteriormente se obtuvo la corteza frontoparietal de cerebros de ratas (n = 8 por grupo).

Diseño experimental

Se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para determinar el efecto del RSV en la expresión del ARNm de GLUT1, GLUT3 y GLUT4. ARN total fue extraído de la corteza parietal cerebral utilizando reactivo TRizol, posteriormente se realizó reverso transcripción y PCR en tiempo real por triplicado a 95 ° C durante 10 min y se sometieron a 40 ciclos empleando un detector ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) de como control interno del ensayo se determinó la expresión del RNA ribosomal de la subunidad 18S. Los valores de ciclo umbral (Ct) se determinaron por análisis automatizado utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. (Livak y Schmittgen 2001) de cuantificación relativa para determinar los niveles de expresión génica.

Ensayos enzimáticos

Ensayo de atrapamiento de radical peróxido ($\text{ROO}^\cdot$)

El ensayo para medir el porcentaje de atrapamiento del radical peróxido, se realizó a partir de una mezcla que contenía compuestos azoderivados de AAPH [2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro], para generar radicales peróxidos (ROO). El grado de protección antioxidante se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar. Los resultados de las muestras de ensayo se publican como "equivalentes de Trolox" (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan y Prior, 2002).

Ensayo de atrapamiento de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

El sistema xantina oxidasa fue usado para determinar la capacidad antioxidante del etanol (Bielski, Shlue, y Bajuk, 1980; Owen y Johns 1999). La generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y la actividad de la xantina oxidasa fueron medidas como el

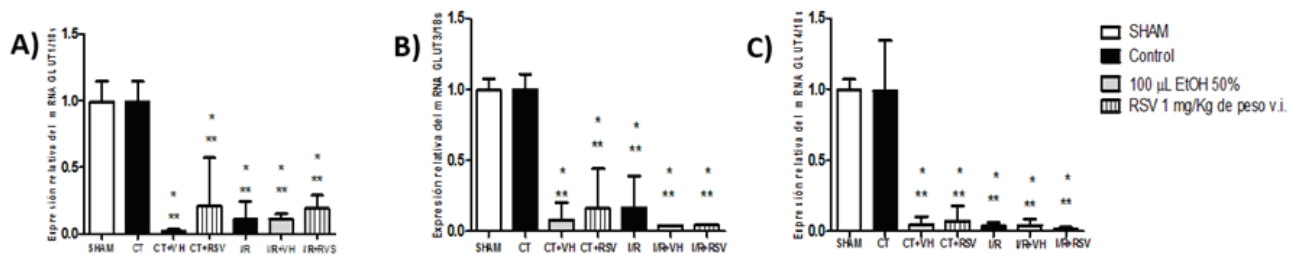


Figura 3. Efecto de la administración de RSV en la expresión relativa de los GLUTs a 2h/24hR. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar agrupadas en dos categorías: 1) Control: animales con cirugía pero sin oclusión de la arteria cerebral (SHAM), animales sin ningún tipo de tratamiento (CT), animales control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

grado de reducción del NTB y la producción de ácido úrico, usando un espectrofotómetro (Du-640 serie Beckman). La densidad óptica fue registrada a 295 nm (producción de ácido úrico) y 560 nm (producción de O_2^-).

Resultados

Expresión del ARNm de los GLUTs a 2h/24hR en corteza cerebral

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

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

Expresión del ARNm de los GLUT's a 2h/4hR en corteza cerebral

En el grupo control, observamos que la administración del RSV indujo un aumento en la expresión del ARNm de GLUT1 en un 83% (1.8 ± 0.51), GLUT3 en un 117% (2.17 ± 0.18), mientras que GLUT4 se mantuvo en niveles basales (1.0 ± 0.04). Por otro lado, la I/R disminuyó la expresión de GLUT1 (0.23 ± 0.01), GLUT3 (0.45 ± 0.04) y GLUT4 (0.07 ± 0.03). Esta disminución se previno en el grupo I/R+RSV tras la administración del RSV, observándose una expresión de 2.41 ± 0.17 para GLUT1, 2.97 ± 0.19 para GLUT3 y 1.15 ± 0.37 para GLUT4 (Tukey $P > 0.05$, 2h/4hR vs I/R+RSV).

Expresión del ARNm de los GLUTs a 2h/24hR en corteza cerebral

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

Capacidad antioxidante del etanol

Para entender el efecto del etanol, evaluamos su capacidad antioxidante. Encontramos que el etanol es capaz de

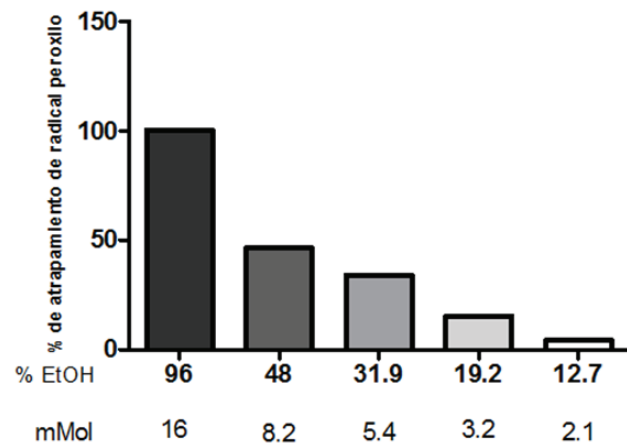


Figura 4. Porcentaje de atrapamiento de radical peroxilo. Se realizó el método ORAC a partir de diluciones en concentraciones decrecientes para determinar la capacidad antioxidante del etanol.

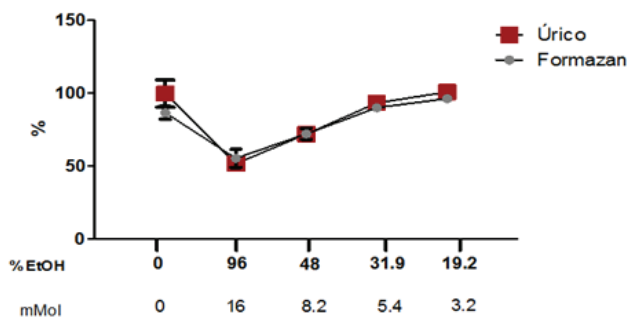


Figura 5. Porcentaje de atrapamiento de anión superóxido. Se utilizó el sistema Xantina Oxidasa para determinar la capacidad antioxidante del etanol a través del porcentaje de formación de úrico y formazán, a partir de soluciones en concentraciones decrecientes de etanol

atrapar el radical peróxido (véase figura 4) de 100 a 13 % (163 - 36 mM) y radical O_2^- (Figura 5) de 100 a 33 % (163 - 57 mM)

Discusión y conclusión

El aumento del RNAm de los GLUTs a 2h/2hR puede estar influenciado por el Factor inducible por Hipoxia [HIF-1]. Este factor es capaz de regular de la expresión de los GLUTs en condiciones de hipoxia/isquemia (Chavez y Lamanna 2002). Se ha demostrado que HIF-1 α se acumula en la primera hora de recuperación después de isquemia global transitoria inducida en corteza cerebral (Chavez y Lamanna, 2002) y que el mRNA de HIF-1 α se induce en la corteza adyacente al núcleo isquémico después de un infarto. Mientras que a 2h/4hR y a 2h/24hR se produce una disminución en la expresión de los GLUTs la cual creemos es ocasionada por el restablecimiento del flujo sanguíneo ya que bajo condiciones de normoxia (concentraciones de O_2 ~20-50 mM) HIF-1 reduce su vida media a 5 min y es degradado vía proteosoma, impidiendo que el complejo proteínico HIF-1 se pegue al promotor y se expresen los GLUTs. Por otro lado, se ha demostrado que el mRNA tanto de GLUT1 como de GLUT3 disminuyen con el aumento de los niveles de glucosa en sangre. En resumen nuestros resultados mostraron que la I/R provoca alteraciones en el nivel de expresión del mRNA de los GLUT's en la corteza frontoparietal ipsilateral a la lesión, incluyendo a GLUT4 del cual existen pocos estudios y que el incremento en la expresión de los GLUTs después de un trauma es parte de una respuesta de estrés neuronal para restablecer la energía requerida y activar procesos de reparación (Hamlin et al. 2001).

En relación al RSV los resultados muestran que fue capaz de regular el aumento en la expresión de los GLUTs provocado por 2h/2hR. Nosotros proponemos que la disminución del RNAm puede deberse al efecto antioxidante de RSV el cual disminuye el nivel de ERO's propiciando la regulación de la actividad de factores de transcripción sensibles a estrés oxidante que tienen como genes diana a los GLUTs. La inducción de 2h/4hR provocó disminución del mRNA en los GLUTs por debajo del nivel basal; entretanto la administración del RSV en ratas sometidas a I/R produjo un aumento en la expresión del mRNA de los

GLUTs. No se sabe con exactitud el mecanismo de acción del RSV; sin embargo con nuestros hallazgos podemos deducir que el RSV es capaz de actuar de acuerdo a las necesidades del entorno, modificando la respuesta de los GLUTs en base a los requerimientos celulares. Por otro lado, el RSV no previno la disminución del mRNA de los GLUTs provocada por 2h/24hR, tomando en cuenta la farmacocinética del RSV, podemos argumentar que la ausencia de efecto del RSV sobre la expresión de los GLUTs después de 24 horas de R se debe a su alta absorción y baja biodisponibilidad. A diferencia de otros trabajos, nosotros notamos que el VH (EtOH) mostraba un patrón de comportamiento similar al RSV sobre la expresión de los GLUTs por lo que decidimos evaluar su efecto antioxidante. Los resultados muestran que efectivamente el EtOH es capaz de atrapar radical peróxido y anión superóxido y que el efecto es dosis-dependiente, entre más concentrado se encuentre el etanol, mayor será su capacidad para atrapar ERO's; sin embargo sospechamos que el EtOH tiene mecanismos de acción diferentes al RSV.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la UAG, en Chilpancingo, Guerrero; en colaboración con la Dra. Penélope Aguilera del Laboratorio de Patología Vascular Cerebral del INNN "Manuel Velasco Suárez", México D.F. Agradecemos a la Dra. Alma Ortiz Plata (Investigadora del INNN "Manuel Velasco Suárez") por realizar la cirugía de OACM para inducir isquemia cerebral, y al Dr. José Pedraza Chaverri (Investigador de la Facultad de Química, UNAM) por su colaboración en el desarrollo de los ensayos enzimáticos.

Referencias

- Bielski, B., asShlue, G. y Bajuk, S., 1980. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals. *J Phys Chem.*, 84, pp.830-833.
- Cabrera Rayo, A., Martínez Olazo, O., Laguna Hernández, G., Juárez Ocaña, R., Rosas Barrientos, V., Loria Castellanos, J. Medellín García, R., Cerón Juárez, R., Sánchez Mata, F., Álvarez Torrecilla, L. y Rumbo Nava, U. (2008). Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med Int Mex*, 24(2), pp.98-103.
- Cervantes, M. I., Montes de Oca Balderas, P., Gutiérrez-Baños, J. de J., Orozco-Ibarra, M., Fernández-Rojas, B., Medina-Campos, O. N., Espinoza-Rojas, M. Ruiz-Tachiquín, M., Ortiz-Plata, A., Salazar, M.I., Rubio-Osornio, M., Castañeda-Saucedo, E., Pedraza-Chaverri, J., Calzada, F. y Aguilera, P. (2013). Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. *Food Chem.*, 1(140(1-2)), pp.343-52.
- Chavez, J. C. y LaManna, J. C. (2002). Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci*. Oct 15;22(20):8922-31.
- Díez-Tejedor, E., Del Brutto, O., Álvarez-Sabín, J., Muñoz, M., Abiusi, G. (2001). Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev. neuronal.*, 33(5), pp.455-464.

- Hicks, J.J. Montes-Cortes, D. H. y Cruz-Dominguez, M. P. (2007). Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation. *Front. Biosci.*, 12(1), pp.2029–2037.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. y Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.*, 50(16), pp.4437–4444.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2010) Mortalidad. Obtenido de: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107>
- Li, C., Yan, Z., Yang, J., Chen, H., Li, H., Jiang, Y. y Zhang, Z. (2010). Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochemistry international*, 56(3), pp.495–500.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8
- Owen, P. y Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol*, 62(2), pp.149–60.
- Yousuf, S. Atif, F., Ahmad, M., Hoda, N., Ishrat, T., Khan, B. e Islam, F. (2008). Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res.*, 1250, pp.242–253.