

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO: HSP 40, HSP 60, HSP70 Y HSP90 TRAS ADMINISTRACIÓN
DE N-ACETILCISTEINA INTRARTERIAL EN REPERFUSIÓN POST
ISQUÉMICA EN MEDULA ESPINAL EN RATAS WISTAR**

ANGELA MARÍA RODRÍGUEZ BERNAL

**DIRECTOR DE TESIS:
SERGIO HERNÁNDEZ VELA, MD**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Bogotá, Noviembre de 2009**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO: HSP 40, HSP 60, HSP70 Y HSP90 TRAS ADMINISTRACIÓN
DE N-ACETILCISTEINA INTRARTERIAL EN REPERFUSIÓN POST
ISQUÉMICA EN MEDULA ESPINAL EN RATAS WISTAR**

ANGELA MARÍA RODRÍGUEZ BERNAL

APROBADO

**DR. ERNESTO BARBOSA
JURADO**

**DRA. LUDIS MORALES
JURADO**

**DR. ROBERTO DIAZ
JURADO**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
SUMMARY	9
INTRODUCCION	10
OBJETIVOS	13
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1. ISQUEMIA CEREBRAL	14
1.2. REPERFUSIÓN	16
1.3. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN ISQUEMIA	16
1.4. ANTIOXIDANTES	18
1.5. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	19
1.6. N-ACETILCISTEINA	25
2. METODOLOGÍA	28
2.1. ANIMALES	28
2.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA	28
2.3. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	29
2.4. ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEINA Y DE SOLUCIÓN SALINA	29
2.5. OBTENCIÓN DEL TEJIDO DE LA MÉDULA ESPINAL	30
2.6. DETERMINACIÓN POR INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO HSP90, HSP 70, HSP60 Y HSP40.	30
2.7. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MÉDULA ESPINAL	31
2.8. ELISA	32
2.9. ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT	32
3. RESULTADOS	34
3.1. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOCITOQUÍMICA	34

3.2. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE MÉDULA ESPINAL DE RATA	37
3.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO POR WESTERN BLOT	40
3.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO POR ELISA	42
3.5 ANALISIS ESTADISTICO	45
4. DISCUSION	46
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema de las múltiples penumbras moleculares después del stroke.

FIGURA 2. La penumbra de proteínas denaturadas.

FIGURA 3. Determinación de las proteínas de choque térmico por elisa.

FIGURA 4. Cortes histológicos desparafinados de médula espinal de rata.

FIGURA 5. Inmunofluorescencia de cortes histológicos de médula espinal de rata.

FIGURA 6. Inmunocitoquímica de las proteínas hsp70 y hsp60 en cortes histológicos de médula.

FIGURA 7. Corrido electroforético de muestras proteicas obtenidas tras una extracción con la mezcla de detergentes.

FIGURA 8. Corrido electroforético de muestras proteicas obtenidas de médula espinal de rata.

FIGURA 9. Corrido electroforético de muestras proteicas obtenidas de médula espinal de rata.

FIGURA 10. Electroforesis de proteínas extraídas de médula espinal de rata.

FIGURA 11. Determinación de la proteína hsp70 por western blot.

FIGURA 12. Determinación de la proteína hsp60 por western blot.

FIGURA 13. Determinación de las proteínas de choque térmico por Elisa.

FIGURA 14. Determinación de proteínas de choque térmico por Elisa

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

- A todos los profesores de La Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias por los conocimientos brindados.
- Al Doctor Sergio Hernández director de esta tesis por sus aportes y apoyo durante este proceso
- Al Doctor Iván Solarte Decano Académico de la Facultad de Medicina de la Universidad Javeriana por su apoyo incondicional en el desarrollo de este estudio
- A la Doctora Ludis Morales, por sus constantes consejos y apoyo, fundamentales para culminar con este proyecto.
- Al Dr. Jesús Daza, por facilitarnos los equipos especiales para el procedimiento quirúrgico.
- Y a todas las demás personas que hicieron posible la realización de este proyecto de vida.

RESUMEN

En el tejido nervioso las neuronas son altamente sensibles a varios tipos de daño como la isquemia, la hipoxia, la hipoglicemia, la infección y el trauma. Al respecto, también se sabe que la sensibilidad de las neuronas a estos tipos de daño varía entre diferentes zonas cerebrales. En el tratamiento de patologías como aneurismas del sistema nervioso, o durante procedimientos como la angioplastia intracraneana, con frecuencia es necesario realizar la oclusión temporal de una arteria lo que bloquea el flujo sanguíneo hacia determinadas zonas del Sistema Nervioso. Esto conlleva a la falta de oxígeno en las neuronas no irrigadas, y por lo tanto al desarrollo de fenómenos isquémicos en el tejido nervioso. El daño consecuente de proteínas constitutivas de la membrana celular induce la activación o la formación de proteínas de choque térmico (proteínas chaperonas), que buscan corregir o minimizar dicho daño. Una vez revertida la oclusión arterial, viene la reperfusión en la cual el flujo sanguíneo se restituye. Al iniciarse la irrigación hay una gran suplenencia de oxígeno para las células y éste constituye el sustrato principal para la síntesis aumentada de especies reactivas de oxígeno o radicales libres, que empeora la lesión del tejido.

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que están implicadas en la patología de la isquemia cerebral y del trauma craneoencefálico, a través de un proceso conocido como estrés oxidativo, el cual finalmente, puede llevar a la muerte celular. Los radicales libres se forman como un producto de la cadena respiratoria y de otros procesos metabólicos normales intracelulares, pero en algunos casos en los cuales los procesos bioquímicos celulares normales se ven alterados, la célula produce más radicales libres o la contraparte antioxidante no es suficiente para contrarrestar su efecto deletéreo.

Adicionalmente, existen otros sitios de producción de radicales libres como la superficie de los leucocitos polimorfo nucleares y de los macrófagos activados, así como también en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, que también son afectadas por el fenómeno de isquemia/reperfusión.

Un aspecto muy importante de la respuesta adaptativa y de regeneración cerebral a la isquemia es la inducción de las proteínas de choque térmico, cuya expresión se aumenta tanto en neuronas como en células de la glía. Al producirse la isquemia y la posterior reperfusión, como consecuencia de la producción de radicales libres y otros eventos moleculares, se induce la desnaturalización de proteínas. Las proteínas denaturadas activan a su vez a factores activadores de choque térmico, los cuales activan la transcripción de genes codificantes de proteínas de choque térmico como las proteínas HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90. Estas proteínas protegen a las neuronas contra varios tipos de daños, entre ellos el generado por la reperfusión postisquémica.

SUMMARY

In the central nervous system, neurons are highly sensitive to different types of insults such as: ischemia, hypoxia, hypoglycemia, infection and trauma. Nevertheless, this sensitivity varies throughout different areas of the brain.

During some types of neurosurgical procedures such as aneurysm clipping or endovascular angioplasty and stenting, it can be necessary to occlude temporarily an artery which consequently diminishes blood flow to those brain areas which the vessel irrigates. This process can lead to hypoxia and secondary ischemia in a group of neurons. Secondary damage to cellular membrane proteins, leads to the reactive formation of thermal shock proteins (also called chaperones), which attempt to minimize the damages. Once the occluded vessel is released, cerebral blood flow ensues and an increased amount of oxygen is delivered to the ischemic cells. This constitutes the main molecular substrate for the formation of new reactive oxygen species and free radicals which can worsen cellular damage.

Free radicals are highly reactive molecules which are implicated in the pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma through a process known as oxidative stress which leads to cell death. These radicals are commonly produced through normal cellular processes. Nonetheless, when cellular homeostasis is altered, an excess of free radicals can be produced or anti oxidative mechanisms can be defective in counteracting the deleterious effects of these molecules

INTRODUCCION

En la práctica clínica puede ser necesario disminuir la perfusión del tejido nervioso llevándolo a isquemia, en estas situaciones controladas la reperfusión (restitución del flujo sanguíneo) genera un exceso de la producción de radicales libres. Por ejemplo, en cirugías de aneurismas, se ocluye transitoriamente la arteria o arterias de la cual nace el aneurisma para poder realizar la disección del cuello de la lesión, posteriormente al liberar o al retirar el elemento ocluidor se realiza la reperfusión. Adicionalmente, en pacientes con hipertensión intracraneana de cualquier etiología, las manifestaciones clínicas se dan por oclusión de las arterias cerebrales secundaria al desplazamiento del tejido cerebral (hernia cerebral) y cuando se realiza una craniectomía descompresiva, se corrige la hipertensión endocraneana y se presenta un fenómeno de reperfusión especialmente en las zonas del cerebro que están comprimidas. Como se conoce, el cerebro tiene una tolerancia mínima a la isquemia, debida, en parte, a la falta de la suplencia de oxígeno, lo que conduce al desencadenamiento de una cascada de eventos moleculares que llevan a la expresión de varios genes y proteínas que pueden provocar la muerte celular. Este es un proceso que se instaura desde los primeros minutos de iniciada la isquemia y se ha observado que durante la reperfusión se logra la restauración del aporte de oxígeno y nutrientes a las neuronas isquémicas, aunque existe riesgo de generación de sustancias deletéreas para el tejido como los radicales libres que pueden aumentar su producción durante la reperfusión.

Entre los genes que se activan tras un período isquémico cerebral, se encuentran los genes que codifican para las proteínas de choque térmico (HSP). Estas proteínas que se encuentran en forma constitutiva en todas las células procariontas y eucariotas, cumplen diversas funciones fisiológicas:

colaboran en la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas en formación, interviniendo en su ensamble, translocación y secreción, así como también en la degradación o reparación de proteínas anormales, actuando como *chaperonas* moleculares.

Cuando las células son sometidas a distintos estímulos como el estrés del shock calórico, radiaciones, diversas drogas, infecciones virales, etc, las HSP se sobreexpresan. De esta manera confieren protección a las células, volviéndolas resistentes a la apoptosis.

Entre la familia de las HSP se encuentran algunas proteínas con expresión constitutiva, como la hsc70 que se expresa sin aumentar significativamente después de un período isquémico global o focal. Por el contrario, existen otras HSP cuya expresión se induce significativamente tras cualquier tipo de daño celular, entre ellos el daño desencadenado por la isquemia cerebral. Entre este grupo de proteínas encontramos las HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90.

Debido al aumento en la producción de radicales libres durante la reperfusión post isquémica, se han utilizado varias aproximaciones experimentales como el uso de sustancias antioxidantes, con el fin de disminuir el efecto deletéreo de estas moléculas. Entre estas aproximaciones se encuentra la administración de N-acetilcisteína (NAC), la cual es una molécula altamente reductora y precursora del glutatión, lo que potencia su actividad antioxidante.

Con base en lo observado en la práctica clínica, existe una gran necesidad de contrarrestar los efectos deletéreos de la reperfusión post isquémica del tejido nervioso ya que, de no hacerlo, se aumenta la probabilidad de la aparición de déficit neurológicos de menor o mayor grado en los pacientes. Adicionalmente, es necesario minimizar el impacto psicosocial y económico de la morbilidad secundaria a la isquemia.

Por las razones antes expuestas, en este trabajo se evalúa el efecto protector de la NAC, administrada por vía intra arterial durante la reperfusión post

isquémica en un modelo murino, sobre la expresión de proteínas de choque térmico HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la expresión de las proteínas de choque térmico HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90 tras la administración de N-acetilcisteína intrarterial en la arteria aorta abdominal, por debajo del nacimiento de las arterias renales en ratas Wistar, previo a la reperfusión post isquémica del tejido nervioso de la médula espinal.

ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica abierta de isquemia medular, por oclusión de la arteria aorta abdominal por debajo del nacimiento de las arterias renales en ratas Wistar.
2. Estandarizar la técnica de reperfusión post isquemia medular en la arteria aorta abdominal, por debajo del nacimiento de las arterias renales de ratas Wistar.
3. Estandarizar la técnica de la inyección directa de medicaciones en la arteria aorta abdominal, por debajo del nacimiento de las arterias renales de ratas Wistar.
4. Evaluar la expresión de las proteínas de choque térmico HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90 en médula espinal de ratas Wistar luego de la isquemia/ reperfusión.
5. Determinar el efecto de la N-acetilcisteína intra arterial post isquémica sobre la presencia de las proteínas de choque térmico HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90 en ratas Wistar.
6. Establecer si hay diferencia significativa entre la aplicación pre-reperfusión post isquémica de NAC versus Solución Salina Normal.

MARCO TEÓRICO

1.1. ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia se define como un proceso en el cual un tejido o parte de él pierde la suplencia de sangre y por consiguiente de oxígeno (1). En el caso específico del cerebro, la isquemia se puede producir por varias causas, por ejemplo es común después de daño cerebral, mal funcionamiento cardíaco y shock. Al respecto, también se conoce que el treinta por ciento de los pacientes con daño cerebral tienen un episodio de hipotensión sistémica significativa (1, 2). La importancia clínica de la hipotensión sistémica es manifestada por múltiples alteraciones; entre ellas, es frecuente el déficit en la memoria en estos pacientes comparados con pacientes con daño cerebral que no han sufrido hipotensión sistémica. El déficit en la memoria resulta del daño neuronal de la región CA1 del hipocampo y el daño en esta área que se observa en humanos es reproducible en un modelo animal en ratas tras isquemia de los hemisferios cerebrales en el prosencéfalo (1, 2).

La isquemia cerebral puede causar muerte celular la cual es iniciada por cambios que resultan directamente de la inhibición de la fosforilación oxidativa (3). Adicionalmente otros cambios incluyen disminución del pH, disminución de ATP, iniciación de la producción de radicales libres y despolarización de la membrana como resultado de la disminución de ATP necesario para la bomba de Na-K (3).

La falta de oxígeno durante un periodo isquémico afecta el normal funcionamiento de las células neuronales a nivel genético y bioquímico y tales trastornos pueden llevar a la muerte celular por apoptosis. Los

mecanismos que contribuyen a la muerte neuronal hipocampal incluyen factores tales como la acumulación de calcio intracelular, liberación de aminoácidos excitatorios, activación de proteasas sensibles a calcio, peroxidación lipídica, generación de radicales libres (4) y expresión de chaperonas y proteínas de choque térmico. A pesar de la multiplicidad de factores, hay una considerable interacción entre ellos, y según varios estudios, una vía común en el daño neuronal puede ser la producción de radicales libres. Por ejemplo Pellegrini-Giampietro y cols. (4) demostraron que la producción y liberación de glutamato es aumentada por radicales libres. Adicionalmente, la naturaleza neurotóxica de las proteasas sensibles a calcio y la peroxidación lipídica está relacionada con la producción de radicales libres (4).

1.2. REPERFUSIÓN

Si después del periodo de isquemia focal o global se restituye el flujo sanguíneo, las neuronas son nuevamente irrigadas y una cantidad significativa de oxígeno alcanza a estas células (5). A partir de los modelos animales y de los estudios en humanos, se ha podido determinar que la lesión por reperfusión es el principal factor promotor del estrés oxidativo en las zonas de penumbra de las lesiones isquémicas, donde se encuentra tejido cerebral viable (5, 6). Sin embargo, actualmente la reperfusión temprana se acepta como una opción terapéutica. Con la lesión por reperfusión, el daño de los vasos sanguíneos cerebrales y la activación del proceso inflamatorio pueden producir transformación hemorrágica del tejido infartado y edema cerebral grave (6). El daño inducido por la reperfusión se basa en la alteración celular provocada por el periodo isquémico, aprovechando cambios enzimáticos y metabólicos que facilitan los mecanismos fisiopatológicos de la lesión (6). Se conoce que los radicales libres son producidos y liberados durante la reperfusión post isquémica (7). Varias investigaciones realizadas en modelos animales de isquemia cerebral han sugerido un papel particular de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los fenómenos que acompañan el daño por reperfusión (7).

1.3. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN ISQUEMIA

Tras periodos de isquemia cerebral se aumenta la producción de radicales libres (8), los radicales libres pueden ser importantes en la muerte neuronal después de isquemia cerebral temporal.

Los radicales libres de oxígeno u oxidantes han sido implicados en el desarrollo de muchos desórdenes neurológicos y disfunciones cerebrales (8,9). Un papel de los radicales libres en el daño cerebral parece involucrar la reperfusión después de isquemia cerebral. Tanto en la isquemia cerebral global como en la focal, el flujo sanguíneo está significativamente disminuido en las regiones del cerebro que son suplidas con el oxígeno transportado por el vaso ocluido. La reoxigenación durante la reperfusión provee oxígeno para sostener la viabilidad celular y también provee oxígeno como sustrato de numerosas reacciones de oxidación enzimática lo que lleva a la producción de oxidantes altamente reactivos (9). Adicionalmente, la restitución del flujo sanguíneo después de la oclusión frecuentemente causa un incremento en los niveles de oxígeno a niveles que no pueden ser utilizados por las mitocondrias (10). Esta producción constante de radicales libres en las mitocondrias es contrarrestado por las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Otros antioxidantes, incluyendo el glutatión, ácido ascórbico y vitamina E están también involucrados en la detoxificación de los radicales libres.

El estrés oxidativo aumenta cuando hay un desbalance entre los oxidantes y los antioxidantes, y se asume que este balance juega un papel importante en condiciones fisiológicas como el envejecimiento y las patologías de una gran variedad de enfermedades (11). Entre estas se encuentran enfermedades a nivel cardiovascular, hepático, respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar), renal (falla renal Terminal, nefropatía crónica post trasplante) y neurológico (12–18). En isquemia y reperfusión, el cambio rápido en la presión parcial de oxígeno es la principal adaptación al estrés. El daño por isquemia/reperfusión está acompañado por una importante tasa de morbi/mortalidad y este daño tiene que ver con factores

inflamatorios activados por los ROS como son la activación del factor de transcripción NF- κ B el cual lleva a la expresión de TNF- α y a la generación de otras citoquinas pro inflamatorias (11).

Durante la reperfusión, la perturbación de los mecanismos de defensa antioxidante se da como resultado de la sobreproducción de radicales de oxígeno, inactivación de sistemas de detoxificación, consumo de antioxidantes y falla en una adecuada suplencia de antioxidantes en el tejido cerebral isquémico (9).

1.4. ANTIOXIDANTES

Las células producen radicales libres a partir del oxígeno y del nitrógeno como resultado del metabolismo normal celular. Ya que estos radicales libres son especies químicas altamente oxidantes y reactivas, las células poseen mecanismos antioxidantes de diferentes tipos. Entre las defensas antioxidantes encontramos enzimas, vitaminas y el glutatión. Las principales enzimas con actividad antioxidante son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. En cuanto a las vitaminas se encuentran la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E (tocoferol). El glutatión, por otro lado es un tripéptido (L-glutamil,L-cisteinil, L-glicina) el cual contiene un grupo sulfhidrilo (-SH) con capacidad reductora.

La prevención de la producción de radicales libres ha llevado a la promoción de la supervivencia neuronal en algunos modelos animales (4). También se ha observado que el aumento de las moléculas que atrapan los radicales libres como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, mejoran la supervivencia neuronal después de isquemia focal (19). Dentro de los estudios en que se ha buscado una molécula antioxidante para neutralizar los radicales libres producidos tras un periodo isquémico se encuentra el uso de la enzima glutatión peroxidasa, como una alternativa de un sistema endógeno barredor de radicales libres.

En el trabajo de Dawson DA y cols (20) se encontró que el ebseleno es un compuesto que aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa lo que llevó a disminución de los radicales libres producidos, y en el trabajo de Matsui T y cols (21), los autores encontraron que esta molécula disminuye el tamaño del infarto cortical después de isquemia focal. Un compuesto alternativo es la N-acetilcisteína (NAC), la cual ha sido ampliamente utilizada en clínica gracias a sus propiedades reductoras (ver más adelante)

1.5. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas juegan varios papeles importantes dentro de las células para lo cual es indispensable que conserven su estructura tridimensional adecuada para cumplir sus funciones. Cuando las proteínas se están sintetizando en los ribosomas otras proteínas las ayudan a plegarse en su estructura tridimensional nativa y funcional. Estas proteínas se conocen como una gran familia de proteínas llamadas Chaperonas. Estas chaperonas no solo cumplen su función durante la síntesis de proteínas sino también en situaciones de estrés para la célula en las cuales se puede alterar la estructura tridimensional de las proteínas. Dentro de esta familia de chaperonas se encuentran las chaperoninas, proteínas de choque térmico y la familia de proteín disulfuro isomerasas (PDI). Entre las situaciones de estrés se encuentra la falta de oxígeno por un evento isquémico global o focal y la disminución en la suplenencia de oxígeno en las células desencadena eventos intracelulares bioquímicos y genéticos.

En el caso de isquemia cerebral, el tejido responde aumentando la expresión de proteínas de choque térmico tanto en neuronas como en células de glia (22).

Aunque la penumbra ha sido clásicamente descrita sobre la base del flujo sanguíneo y parámetros fisiológicos, se han descrito una variedad de penumbras isquémicas en términos moleculares (23). Los genes

relacionados con apoptosis que son inducidos después de isquemia cerebral focal pueden contribuir a la muerte celular. La proteína de choque térmico HSP70 es inducida en las células de la glía en los bordes del infarto y en las neuronas frecuentemente a alguna distancia del sitio del infarto (23).

Las proteínas HSP70 son inducidas en las células en respuesta a la presencia de proteínas desnaturalizadas lo cual ocurre como resultado de la falta temporal de energía (Sharp). Adicionalmente, también se ha observado que el factor inducible de hipoxia (HIF) es también activado tras isquemia focal en regiones que pueden extenderse más allá de la inducción de HSP70. Se ha propuesto que la región de activación de HIF representa el área de disminución del flujo sanguíneo y disminución en la suplenencia de oxígeno (23). Los genes tempranos son inducidos en el cortex, hipocampo, tálamo, y otras regiones cerebrales. Estos cambios distantes en la expresión de genes ocurren por la despolarización inducida por la isquemia lo que puede contribuir a cambios en el cerebro después del trauma craneoencefálico (23).

La inducción de genes en el cerebro, particularmente después del evento cerebrovascular, no puede ser estudiado en condiciones aisladas, esto quiere decir que hay que tener en cuenta las bases espaciales, temporales y celulares para conocer el cambio de la expresión genética (23). Se conoce que los genes inducidos después de isquemia temporal en cerebro pueden reflejar el papel prominente de los radicales libres y el estrés oxidativo (23), mientras que los mismos genes pueden jugar un papel menos importante en la oclusión arterial permanente. Los genes inducidos en células inflamatorias en el core de un infarto tienen diferentes implicaciones para los mecanismos de daño y terapia del evento cerebrovascular más que los genes inducidos en las neuronas fuera del sitio del infarto durante el mismo periodo de tiempo (24).

Cada gen en cada célula puede variar espacial y temporalmente con varios grados de isquemia, haciendo una representación de una tremenda simplificación (Figura 1) (23).

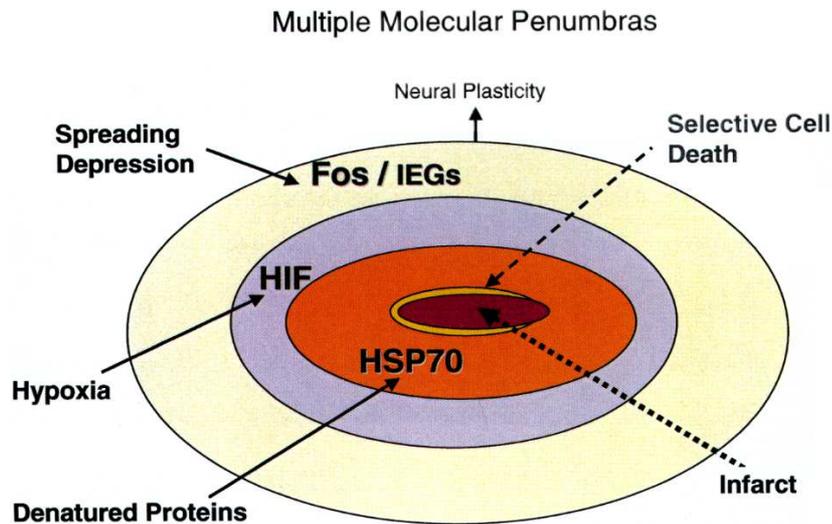


Figura 1. Esquema de las múltiples penumbras moleculares después del evento cerebro vascular. Una zona de muerte neuronal selectiva en los bordes del infarto. La zona de desnaturalización de proteínas se extiende alrededor de esta zona y es demarcada como expresión de proteínas HSP70 en las neuronas dañadas. El factor inducible de hipoxia (HIF) es inducido en áreas donde el flujo sanguíneo ha disminuido, a sí como también la suplencia de oxígeno. La dispersión de la isquemia induce la expresión de c-fos y muchos otros genes tempranos a la misma distancia de la zona del infarto, incluyendo los lóbulos ipsilateral, occipital y frontal, cortex contra lateral y muchas estructuras subcorticales (23).

La inducción de las proteínas de choque térmico (HSPs) después de la isquemia focal y global continúa siendo de interés ya que ellas son las únicas entre la mayoría de los genes estudiados que son específicamente inducidos en células que responden al daño post isquémico (23) y estos genes protegen a las células contra un amplia variedad de daños.

HSP70 es la principal proteína de choque térmico inducible y constitutiva y es expresada en niveles bajos en todas las células. Cualquier daño que contribuya a la denaturación de las proteínas lleva a la activación transcripcional de hsp70, incluyendo la isquemia, choque térmico, metales pesados, hipoglicemia, bajo pH y estados de enfermedad (23). La presencia de proteínas denaturadas parece ser el principal estímulo para la inducción de hsp70 (25). La activación transcripcional de hsp70 ocurre a través de factores de choque térmico (HSFs). Los HSF se unen a HSP90 en las células

normales en un estado inactivado. Ante la aparición de proteínas denaturadas, la proteína HSP90 se une a éstas liberando HSFs, los cuales por medio de fosforilación son activados y forman un trímero. Una vez han sido activados, los HSFs se unen a proteínas de choque térmico, como HSP70 y otros estimulando la respuesta al choque térmico (23).

Entonces la zona de inducción de HSP70 después de isquemia focal puede ser vista como la zona de desnaturalización de proteínas asociado a daño (figura 2) (23). Ya que HSP70, en unión con HSP90 y otras proteínas de choque térmico actúan para reparar las proteínas denaturadas, la inducción de HSP70 representa la zona de denaturación de proteínas y la esperada renaturación de las mismas. Después de isquemia permanente o isquemia focal temporal severa, el mRNA de HSP70 no puede ser expresado en el core de un infarto si el ATP es limitante. Sin embargo, aun en la oclusión de un vaso que lleva a infarto MCA, el mRNA de hsp70 puede ser expresado dentro y fuera de la región de infarto, con la mayoría del mRNA de hsp70 dentro de la zona del infarto (23).

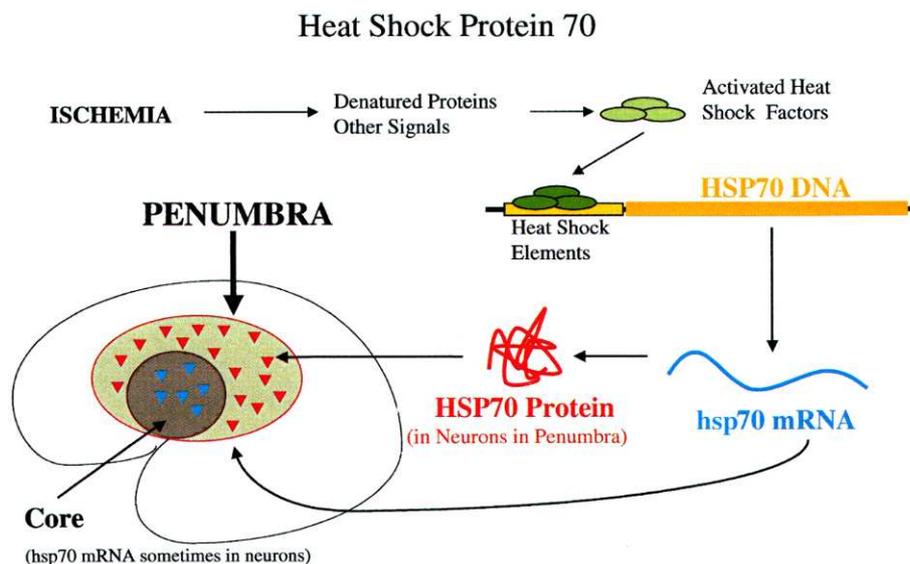


Figura 2. La penumbra de proteínas denaturadas. La inducción de HSP70 después de un trauma craneoencefálico delinea una región que incluye el core (zona interna) del infarto y las regiones adyacentes donde la presencia de proteínas denaturadas dentro de las células señala la inducción de hsp70. El mRNA de hsp70 puede ser detectado en el core del infarto con isquemia focal moderada, pero puede no ser sintetizada después de oclusiones permanentes en los vasos sanguíneos donde el ATP rápidamente disminuye. El mRNA de hsp70 y la proteína son expresados en algunas células gliales en muchas neuronas a una distancia del infarto en la penumbra definida enteramente por la expresión de la molécula (23).

La proteína HSP70 es expresada principalmente en los vasos sanguíneos y algunas veces en microglia y astrocitos en áreas dentro del infarto (23). Como se explicó previamente, la expresión neuronal de HSP70 puede ser interpretada como una penumbra molecularmente definida de denaturación de proteínas. La zona de denaturación de proteínas se extiende más allá de de la zona de muerte neuronal, esto se conoce por los hallazgos hechos después del evento cerebrovascular en los cuales se encontraron células teñidas para TUNEL (técnica para evidenciar daño por ruptura en el DNA) en la zona adyacente a la zona del infarto, mientras que las neuronas teñidas para HSP70 se encontraron e distancias mucho mayores del sitio del infarto en los mismos cortes de cerebro (26, 27, 28).

La expresión de HSP 70 parece proteger las células contra varios tipos de daño. Sin embargo esta proteína no protege a las células contra la apoptosis o daño más severo. De manera más importante, la sobre expresión de HSP70 puede proteger el corazón y el hipocampo tras un periodo de isquemia.

HSP27: Hay muchas otras proteínas de choque térmico, por ejemplo la proteína HSP27 es otra HSP inducible expresada en bajos niveles en la mayoría de las células del cerebro. De manera notable, HSP27 es expresada en altos niveles en las neuronas motoras en el tallo cerebral y médula ósea. HSP27 también es inducida dentro y fuera de las áreas de infarto tras isquemia focal en roedores (29,30), aunque su papel es claramente diferente al de HSP70. HSP27 es expresada casi totalmente en astrocitos y puede ser inducida por estímulos que no alternen las proteínas. Ya que la expresión de HSP27 no parece reflejar la zona de denaturación de proteínas, pero refleja la región donde las células se encuentran en estrés en astrocitos a través de un mecanismo no dilucidado aun (23). HSP27 puede estar asociada con actina y otras a proteínas estructurales para proteger la glía durante el estrés y tal vez, pueda contribuir a activar los astrocitos (23).

HSC70: es una proteína de choque térmico constitutiva encontrada en todas las células. Ésta probablemente tenga acción de chaperona sobre todas las

proteínas. Esta proteína es modestamente inducida después de isquemia global o focal y muchos otros tipos de daño (23).

HSP32: (HO-1) La proteína heme oxigenasa-1 (HO-1) es un complejo, una proteína de choque térmico inducible (también llamada HSP32) que metaboliza el grupo heme a biliverdina, monóxido de carbono y hierro. El sistema HO es análogo a la NOS ya que la HO-2 es la forma constitutiva de HO de manera similar a las NOS-1 que es encontrada en las neuronas y no es inducible. La inducción de HO-1 por choque térmico e isquemia sugiere que las células deben metabolizar proteínas que contengan grupos heme durante los periodos de estrés (31).

HO-1 juega un papel importante en metabolizar los grupos heme liberados de la hemoglobina después de la hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral. HO-1 también es inducida después de isquemia cerebral, por ejemplo tras isquemia focal cerebral (23).

Otra proteína de choque térmico regulada por ATP, pero también por hormonas esteroideas, es la HSP-28, y aunque su función específica se desconoce, se postula su asociación con procesos de crecimiento y diferenciación celular (39).

Por otro lado, el proceso de plegamiento de proteínas mitocondriales defectuosas tiene que ver con el autoensamblaje de éstas a chaperoninas tales como la HSP-60 (GroEL), formada estructuralmente por 2 anillos y relacionada con la HSP-10 (GroES) de estructura anular sencilla, para su posterior desacople y restablecimiento de la forma funcional de la proteína, luego de múltiples ciclos de acople y desacople de la proteína alterada y estas HSP. (37,39).

A estas chaperoninas se han atribuido también funciones en la replicación del DNA, la división celular, la secreción de proteínas la síntesis, el acople de

enzimas mitocondriales y el tráfico y permeabilidad membranal de proteínas desde el citoplasma hacia el exterior de la célula y viceversa. (36).

No se conoce con certeza que induce a estos tipos de HSP al ensamblaje y autoensamblaje de proteínas, que llevan al restablecimiento de las funciones que les fueron conferidas a éstas, aunque estudios de ciertos investigadores han podido comprobar que estos procesos de plegamiento y reconfiguración de la estructura proteica nativa, dependen del acople de las chaperonas o chaperoninas previamente citadas a la proteína anómala a través de sus aminoácidos hidrofóbicos expuestos, mediante fuerzas termodinámicas. Al final, la disociación de este complejo se logra una vez la proteína ha recuperado su configuración funcional y así el ATP puede fijarse a estas HSP. (37,39,40)

Una de las chaperonas más abundantes y con mayor actividad en fenómenos de crecimiento celular eucariótico es la HSP-90, la cual con su forma de bastón y estructura dimérica de cadenas α y β garantiza las funciones reguladoras de la conformación fosforilada y defosforilada de moléculas que hacen parte de las vías de señalización intracelular, en particular de proteínas tirosina kinasa asociadas al virus del sarcoma de Rous como la pp60src, de receptores para hormonas esteroideas y de la síntesis de proteínas, pues modifica la actividad del factor iniciador de la traducción en eucariotas, eIF-2. Sin embargo, su mecanismo de acción específico en células eucariotas no está aún lo suficientemente aclarado. (39)

El listado de chaperonas moleculares queda finalmente configurado por la HSP-110, la cual incrementa su producción al aumentar la temperatura, ya sea en el citoplasma celular, el núcleo o el nucleólo. Esta proteína de choque térmico es considerada por lo tanto la más termotolerante de las HSP (38,41)

1.6. N-ACETILCISTEINA

La N-acetilcisteína (NAC) fue introducida como un agente mucolítico para la enfermedad crónica pulmonar hace 50 años. Su efecto se basa en el

rompimiento de los puentes disulfuro de las glicoproteínas de alto peso molecular en el moco, lo que lleva a la reducción en la viscosidad (11). Los efectos favorables de la NAC pueden, sin embargo, extenderse mucho más allá de la bronquitis crónica ya que esta molécula tiene una gama muy amplia de propiedades las cuales pueden ser aprovechadas ampliamente en la práctica clínica. Casi todos los efectos benéficos de la NAC se relacionan con su efecto sobre el estrés oxidativo (11). Como se mencionó previamente, en las células animales las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas como un subproducto del metabolismo normal durante la conversión de oxígeno a agua. Los ROS tienen funciones específicas dentro de las células como combatir los microorganismos por los macrófagos y servir como mediadores en diferentes vías de señalización y expresión de genes. Pero estas especies reactivas también pueden causar daño a través de la oxidación de macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA (32)

El glutatión (GSH) es el tiol más abundante en las células animales y juega un papel central en la defensa antioxidante contra los ROS. Para la síntesis de glutatión en las células, la suplenencia de cisteína es el determinante limitante y uno de los precursores efectivos de la cisteína es su derivado sintético N-acetilcisteína (11). La NAC puede proveer grupos sulfhidrilo (-SH) y neutralizar radicales libres. Muchos medicamentos y venenos son detoxificados a través de la conjugación con GSH, la cual se provee por administración de NAC (11). Adicionalmente a su función antioxidante, la NAC tiene otros mecanismos de acción, como la inhibición de la activación de neutrófilos, disminución de la adhesión microbial y vasodilatación (11).

En el campo de la investigación, la NAC ha sido ampliamente estudiada en varios tipos de patologías (tabla 1) (11).

Research subject	Results
Inflammation, infection, immunity	Attenuating, alleviating, adding resistance, healing and strengthening the immune response, including Leishmania infection and influenza [12, 16–20]
Endothelial cells	Protection against several hazardous factors, including urban air fine particles and tobacco smoke [2, 14, 21]
Vascular wall	Several protective effects [2, 22, 23]
Experimental models of cardiovascular diseases, cardiac surgery	Favourable effects in hypertension, in hypertensive cardiac injury, cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury/myocardial infarct and cardiopulmonary bypass [24–27]
Lungs	Protective effect in injuries by different toxins (including tobacco smoke), in lung transplantation, in lung reperfusion injury, attenuation of pulmonary fibrosis [2, 28–30]
Nervous system	Neuroprotection in transient hypoxic injury (Alzheimer-type) to cortical neurones, prevention of primary sensory neuronal death, beneficial effects in deficits of learning and memory and in hearing loss [31–34]
Gastroenterology	Favourable effect in acute pancreatitis and liver injuries, inhibition of the growth of <i>Helicobacter pylori</i> [2, 11, 35, 36]
Endocrinology/pregnancy	Protection against complications of diabetes, insulin resistance, and oestrogen-deficiency bone loss, restores nitric oxide-mediated effects in the fetoplacental circulation in pre-eclampsia [37–40]
Articular structures	Protection against various injuries [2]
Miscellaneous	Protection against acute high-dose irradiation, photoageing of human skin, decreases plasma total homocysteine levels in healthy volunteers [41–43]

Tabla 1.N Acetil Cisteína en la investigación. Tomada de referencia 11.

Desde hace unos años se ha venido experimentando con la administración de NAC antes del evento isquémico en ratas y se ha encontrado una disminución de los efectos deletéreos de la reperfusión post isquémica. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Khan y cols. Utilizaron la NAC administrada por vía intraperitoneal antes de inducir un evento cerebrovascular en ratas. En este estudio, los autores encontraron que los animales que habían sido tratados con NAC presentaron una disminución significativa de en el área y volumen del infarto así como una mejora en los niveles de glutatión y en la evaluación neurológica.

2. METODOLOGÍA

2.1. ANIMALES

En este trabajo se utilizaron ratas machos Wistar (Instituto Nacional de Salud) de 200 g aproximadamente, siguiendo los protocolos establecidos. Los animales se mantuvieron en jaulas con comida (Rodentia®) y agua *ad libitum* sometidas a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Se definieron cuatro grupos de estudio y se incluyeron 6 animales dentro de cada uno de los grupos así:

Grupo 1: Grupo control, animales sin intervención quirúrgica, sin tratamiento con NAC

Grupo 2: Animales con intervención quirúrgica (isquemia) sin tratamiento post isquémico

Grupo 3: Animales con intervención quirúrgica (isquemia) y reperfusión post isquémica con NAC.

Grupo 4: Animales con intervención quirúrgica (isquemia) y reperfusión post isquémica con solución salina.

De cada grupo de animales se destinaron 3 animales para perfusión intracardiaca y se realizaron cortes histológicos del tejido medular; los otros 3 animales se sacrificaron por sobredosis de anestésicos, se extrajo la médula espinal y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. A partir de este tejido se obtuvieron las proteínas de interés por ELISA y western blot (ver más adelante).

2.2. TAMANO DE LA MUESTRA

El número de individuos utilizados para el presente estudio fue de 6 por grupo, como consecuencia de la estandarización de la técnica

2.3. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (90 mg/kg) /xilasina (12 mg/ kg). El procedimiento se realizó bajo magnificación con microscopios quirúrgicos Vasconcellos® a 4 y 10 aumentos. Una vez anestesiados, a cada rata se le afeitó el abdomen y se limpió con isodine. Se realizó una incisión xifopúbica por línea media atnto de la piel como del plano muscular de la pared abdominal. La aorta abdominal se expuso después de la apertura del retroperitoneo. La oclusión de la aorta se realizó con la colocación de un clip para aneurisma cerebral con una fuerza de cierre de 50-g (Yasargil FE 693, Aesculap, Germany) en la aorta abdominal por debajo del origen de las arterias renales, por un periodo de 45 min (32,33). La interrupción del flujo sanguíneo se verificó por ausencia de flujo anterógrado. Para los grupos experimentales 3 y 4, tras los 45 min de isquemia se realizó la perfusión con solución salina (grupo 4) o NAC (grupo 3), y luego se retiró el clip de aneurisma. El cierre de la herida se realizó con sutura absorbible de ácido poliglicólico (Vicryl® 3/0) y con monofilamento 3/0.

2.4. ADMINISTRACION DE N-ACETILCISTEINA Y DE SOLUCION SALINA NORMAL.

Para el grupo 3, la dosis de NAC (Fluimucil®, Rhopson Pharmaceutics) que se utilizó fue de 150 mg/kg, preparada en dilución al 50% en DAD 5%, según recomendación del fabricante para la administración parenteral de NAC. Se administró al final del período de isquemia de 45 min, antes de la restitución del flujo sanguíneo medular, mediante infusión lenta controlada por punción directa de la arteria aorta. Al terminar la infusión del medicamento, se retiró el clip de la arteria aorta para reiniciar el flujo sanguíneo de la médula espinal.

En el grupo 4, el volumen a administrar de SSN (Solución Salina 0.9%, Baxter) se calculó por extrapolación de la dosis de NAC que correspondería a cada individuo. El método de administración de la SSN fue el mismo de la NAC.

2.5. OBTENCIÓN DEL TEJIDO DE LA MÉDULA ESPINAL

A las 24 horas de la intervención quirúrgica, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100mg/kg) y se realizó perfusión transcardiaca con 200 ml de Phosphate Buffer Saline (PBS) (0.05mol/l) seguido por 200 ml de Paraformaldehído al 4%. Se removió la médula espinal y fueron post fijados en paraformaldehído toda la noche a 4 °C y embebidos en parafina para realizar los cortes en micrótopo y realizar inmunocitoquímica e inmunofluorescencia (ver más adelante).

2.6. DETERMINACION POR INMUNOHISTOQUIMICA E INMUNOFLUORESCIENCIA DE LAS PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO HSP90, HSP70, HSP60 Y HSP40

Para detectar la presencia de las proteínas de choque térmico, se realizó la determinación por inmunocitoquímica. Para esto, los cortes histológicos de 8 µm fueron desparafinados y luego se aplicó PBS-tritón al 1% por 10 min, se retiró, se lavaron los cortes y se colocó el anticuerpo monoclonal anti-HSP90, anti-HSP70, anti-HSP60 o anti-HSP40 (Santa cruz) en dilución 1:50, se incubaron por una hora a 37°C, se realizaron tres lavados con PBS (Phosphate Buffer Saline) cada uno de 5 min. Se adicionó el anticuerpo secundario IgG-conjugado con peroxidasa (HRP horseradish peroxidase Santa Cruz) en dilución 1:3000 (Santa Cruz) para inmunocitoquímica.

Las láminas para inmunocitoquímica se revelaron utilizando como sustrato aminoetilcarbazole 0,64 mg/ml (AEC) en buffer acetato (acetato de sodio 0,030 M-ácido acético 0.012 M) y peróxido de hidrógeno al 0,36%. El AEC se

preparó previamente a 4mg/ml en dimetilformamida; los cortes se incubaron hasta observar células marcadas positivamente por coloración roja. Una vez coloreadas se colocaron en glicerol tamponado, se cubrieron con una laminilla para evitar la deshidratación y poder almacenar las láminas para su posterior análisis en el microscopio de luz.

Para fluorescencia, después de la permeabilización de los cortes se eliminó la fluorescencia basal con cloruro de amonio (50 mM) por 20 min. Se lavó y se incubaron los cortes con anticuerpo primario, para inmunocitoquímica, tras los lavados, se colocó el anticuerpo secundario (FITC-SC2024 Santa Cruz) 1:3000 por 20 min.

Las láminas para inmunofluorescencia se mantienen a -20°C protegidas de la luz para el análisis en el microscopio de fluorescencia. Como control se utilizaron cortes en los que no se colocó el anticuerpo primario, pero si el secundario.

2.7. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MÉDULA ESPINAL

Los animales anestesiados se sacrificaron y se realizó la disección de la médula espinal bajo el estereoscopio. El tejido se congeló en nitrógeno líquido, una vez congelado, se cortó en trozos pequeños cuidando de mantenerlos congelados. Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido hasta ser procesados. Se sacaron los tubos del nitrógeno líquido uno por uno, mientras la muestra estaba aun congelada y se colocaron en presencia de una mezcla de detergentes, para cada médula espinal se colocó 1 ml de: Tritón 1%, DOC 0.5%, CHAPS 1%, Tween 0.2%, Nonident P-40 1%, PMSF 100 ug/ml y EDTA 1mM. Se dio vortex por 5 min y se incubó 1 h a 37°C. al cabo de ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm 20 min, se recuperó y se guardó el sobrenadante a 4°C (primera extracción). Al pellet, se le colocó nuevamente el buffer anterior y se repitió todo el proceso cuatro veces con el fin de realizar cuatro extracciones para separar los lípidos de las proteínas del tejido.

El pellet que quedó tras las cuatro extracciones se incubó con hidrocloreuro de guanidina 6M toda la noche en agitación continua, con el fin de desnaturalizar y precipitar las proteínas que pudieron haber quedado en el pellet. Al otro día se agregó 3 volúmenes de acetona y se conservó a -70°C por una hora, al cabo de ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió, en diferentes buffer dependiendo si se iba a realizar ELISA o SDS-PAGE (ver más adelante)

2.8. ELISA

A partir del extracto proteico obtenido del tejido de médula espinal, se tomaron 50 µl de este extracto y se colocaron en una placa para ELISA toda la noche a 4°C. Al otro día se retiraron las muestras y se lavaron tres veces con PBS por 5 min cada lavado. Luego la placa se bloqueó con leche en polvo descremada 5% durante una hora a 37°C, se retiró la leche y se lavó la placa tres veces con PBS durante 5 min cada lavado. Luego se colocó el anticuerpo primario: anti-HSP90, anti-HSP70, anti-HSP60 y anti-HSP40 (Santa cruz) en dilución 1:1000, la placa se incubó por 1 h a 37°C. Se lavó tres veces con PBS (5 min cada lavado) y se colocó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Santa Cruz) 1:5000 durante una hora a 37°C. La placa se reveló utilizando como sustrato OPD (O-Fenilenediamina dihidrocloruro) (Pierce) diluido en buffer peroxidasa durante 15 a 20 minutos. El revelado se detuvo con ácido sulfúrico 2,5 M y se leyó a 492 nm en un lector de ELISA. Como control negativo se utilizaron pozos tratados con los anticuerpos anteriormente descritos pero sin antígeno. Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS.

2.9. ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

A partir de las proteínas obtenidas y purificadas de la médula espinal de las ratas se realizó electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Para esto se tomaron alícuotas de las proteínas extraídas y se adicionó un

volumen de buffer Laemli SDS 1x (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol y 5% 2-mercaptoetanol correspondientes a 10x el peso húmedo de la muestra. Se dio vortex por 1 min a temperatura ambiente. Se aseguró que el tejido estuviese solubilizado. Luego las muestras se hirvieron por 5 min.

Una vez corrida la electroforesis, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana PVDF a temperatura ambiente en una cámara semihúmeda, durante toda la noche a 32 mA. Se retiró la membrana de la cámara. Se bloqueó con leche en polvo semi descremada al 5% durante 1h a 37°C o toda la noche a 4°C. Al otro día se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 min, con PBS y se incubó con anticuerpo primario monoclonal anti-HSP90, anti-HSP70, anti-HSP60 o anti-HSP40 (Santa cruz) en dilución 1:1000 por 1 h a 37°C. Luego se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 min, con PBS, después, se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Santa Cruz) 1:1000 y se reveló usando como sustrato carbazole (ver arriba).

3. RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOCITOQUÍMICA

Para determinar si la isquemia/reperfusión tenía algún efecto sobre la expresión de las proteínas de choque térmico, se realizaron cortes histológicos de las médulas espinales de tres individuos de cada uno de los grupos experimentales. Para la inmunodetección se emplearon anticuerpos específicos que reconocían las proteínas HSP90, HSP70, HSP60 y HSP40. Inicialmente se examinaron los cortes histológicos desparafinados. En este caso, las células fueron negativas para los anticuerpos evaluados (Figura 3)

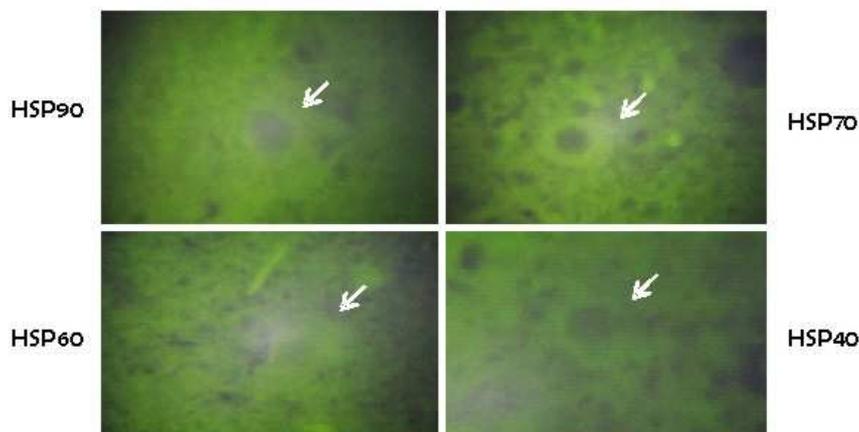


Figura 3. Cortes histológicos desparafinados de médula espinal de rata pertenecientes al grupo experimental 2 (Isquemia) donde se muestran células negativas para los anticuerpos anti-HSP90, anti-HSP70, anti-HSP60 o anti-HSP40 determinado por inmunofluorescencia. Aumento 100x, microscopio Vanguard.

Al desparafinar la muestra, en el cual se utilizan alcoholes como el xilol, dado que éste solubiliza lípidos, es de esperar que las células queden permeabilizadas. Sin embargo queda la posibilidad de que no estén bien

permeabilizadas y esto explicase el resultado negativo de la figura 3. Por esta razón los cortes se incubaron con PBS + Tritón 1% por 10 min y se repitió la inmunofluorescencia para las mismas proteínas.

En la Figura 4 se muestra que, a pesar del tratamiento con el detergente Triton X-100 las células fueron negativas para los cuatro anticuerpos evaluados en el grupo de animales denominado control negativo (G1). En el grupo G2, isquemia/reperfusión, se encontró un 30% de células positivas para las proteínas HSP70 y HSP60, los grupos G3 isquemia/reperfusión con NAC presentó un 25% de células positivas, pero la fluorescencia, en promedio es menos intensa que el grupo G2. El grupo G4, isquemia/reperfusión tratado con NaCl, presentó un 30% de células positivas. En conclusión las diferencias entre el número de células o la intensidad de la fluorescencia entre los grupos de isquemia/reperfusión (G2) y los grupos de reperfusión con NAC o NaCl (G3, G4), lo que explica la baja sensibilidad del método de inmunofluorescencia para este tipo de proteínas, ante la presencia de lípidos, a pesar de que se hicieron varios tratamientos con detergente, probablemente influyo en el resultado. No obstante, se observa una tendencia en número e intensidad de fluorescencia en el grupo isquemia/reperfusión o isquemia/reperfusión tratado con NaCl, respecto a los grupos isquemia/reperfusión tratado con NAC.

Figura en la pagina siguiente.

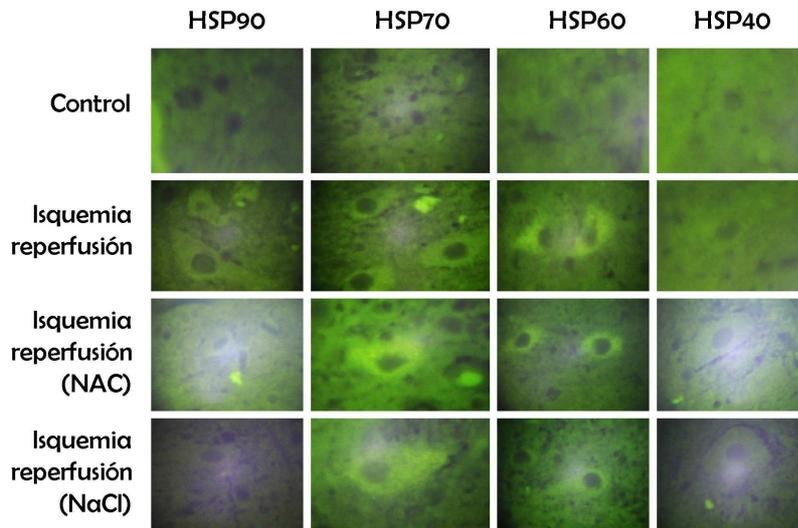


Figura 4. Inmunofluorescencia de cortes histológicos de médula espinal de rata pertenecientes a los cuatro grupos experimentales (G1: control, G2: isquemia/reperusión, G3: isquemia/reperusión con NAC y G4: isquemia/reperusión con NaCl). Las muestras fueron incubadas con anticuerpos anti-HSP90, anti-HSP70, anti-HSP60 o anti-HSP40 (1:100, Santa Cruz). Aumento 100X, microscopio VanGuard.

Se conoce que la inmunofluorescencia es un método sensible para determinar la presencia de proteínas específicas en un tejido, pero a pesar de la sensibilidad de este método no se detectaron de manera significativa las proteínas de choque térmico evaluadas, ver arriba. A pesar de que la inmunocitoquímica es un método menos sensible que la inmunofluorescencia, se utilizó para corroborar el resultado. Adicionalmente, se quiso determinar si hay alguna correlación entre células positivas para las proteínas HSP70 y HSP60 y la fragmentación de la cromatina, ya que se conoce que las células que están expuestas a estrés por isquemia aumentan la expresión de las proteínas de estrés y éstas actúan como chaperonas y como proteínas antiapoptóticas. Para evaluar esto, se empleó la técnica de inmunocitoquímica, aunque es un método menos sensible que la inmunofluorescencia, permite combinarse simultáneamente con una tinción fluorescente como el Hoechst.

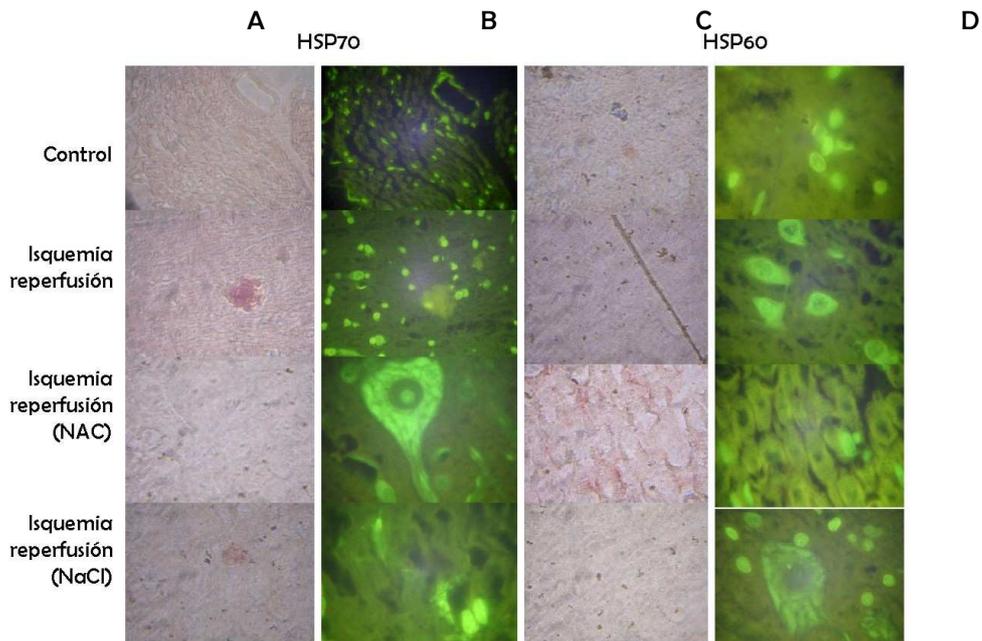


Figura 5. Inmunocitoquímica de las proteínas HSP70 y HSP60 en cortes histológicos de médula. **A y C.** Inmunohistoquímica de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP60 para cada uno de los cuatro grupos experimentales. G1: control, G2: isquemia/reperusión, G3: isquemia/reperusión con NAC y G4: isquemia/reperusión con NaCl. **B y D** el mismo campo con tinción de hoescht. Aumento 100X, microscopio VanGuard.

La figura 5 muestra que las proteínas de choque térmico evaluadas (HSP70 y HSP60) por inmunocitoquímica, en general, son negativas para los cortes de los cuatro tratamientos. Sin embargo los cortes isquemia/reperusión y isquemia/repercusión NaCl presentaron un porcentaje aproximado de 10% de células positivas mientras que los de isquemia/reperusión tratados con NAC mostraron menos del 5% de células positivas para las proteínas de choque térmico. La figura muestra que estas células positivas tienen una coloración con la tinción de hoescht menos intensa que otras células. Es probable que la coloración con EAC (sustrato de la peroxidasa) esté interfiriendo con la adherencia de la con tinción de hoescht. Sin embargo, si existe correlación entre las células uniformemente teñidas con la coloración de hoechst y las células negativas para peroxidasa.

3.2. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE MÉDULA ESPINAL DE RATA

Debido a que el tejido nervioso posee gran cantidad de lípidos, fue necesario estandarizar un método de extracción y purificación de las proteínas para garantizar que por los métodos de ELISA y western blot se pudieran determinar las proteínas de interés.

Cuando se utilizó solamente una extracción con la mezcla de detergentes (ver materiales y métodos) no se observó una separación de las bandas proteicas en el SDS-PAGE.

En la figura 6, se observa el corrido electroforético para los cuatro tratamientos y se observan bandas muy tenues y distorsionadas en los carriles 1 y 4, esto indicaba que las muestras podrían estar contaminadas, probablemente con lípidos.

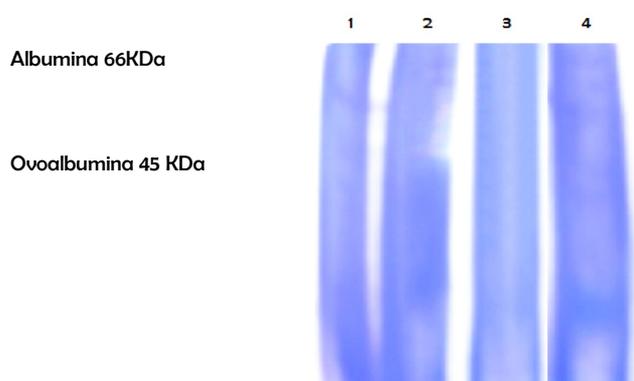


Figura 6. Carrido electroforético de muestras proteicas obtenidas tras una extracción con la mezcla de detergentes. Los carriles del 1 al 4 corresponden a G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión con NaCl, respectivamente. El gel fue teñido con azul de coomassie.

Con base a los resultados anteriores se procedió a realizar más extracciones con la mezcla de detergentes. El mejor resultado se obtuvo realizando cuatro extracciones con los detergentes.

Como se describió en materiales y métodos, se utilizaron dos estrategias para purificar las proteínas: la mezcla de detergentes y el hidrocloreuro de

guanidina, para verificar si existían diferencias entre estos dos tratamientos en cuanto a la purificación de proteínas, se realizó una electroforesis SDS-PAGE comparándolos.

En la figura 7 se muestra que en el tratamiento con los detergentes, tras 4 extracciones, se observan bandas aunque aun no son del todo claras (carriles 2-5). Por otro lado, en los carriles 6 y 7 se observan bandas más nítidas las cuales corresponden al tratamiento con hidrocloreuro de guanidina. Según este resultado, a las muestras procesadas con los detergentes se les adicionó hidrocloreuro de guanidina y se siguió el protocolo según materiales y métodos, con el fin de alcanzar una mayor purificación de las proteínas. En la figura 8 se observa que tras tratar las proteínas purificadas con los detergentes y con hidrocloreuro de guanidina se obtienen bandas más claras en el corrido electroforético.

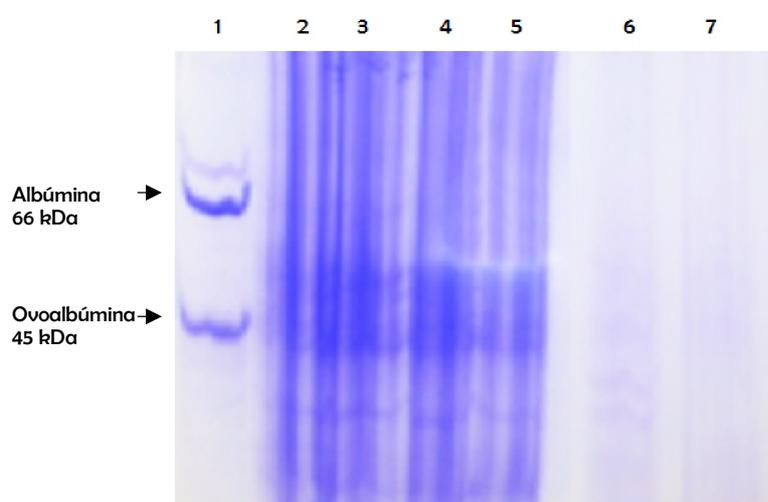


Figura 7. Corrido electroforético de muestras proteicas obtenidas de médula espinal de rata. Carril 1: marcador de peso molecular albúmina y ovoalbúmina. Carriles 2-5: proteínas extraídas tras cuatro extracciones con la mezcla de detergentes, corresponden a G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión con NaCl, respectivamente. Los carriles 6 y 7: proteínas extraídas con hidrocloreuro de guanidina. El gel fue teñido con azul de coomassie.

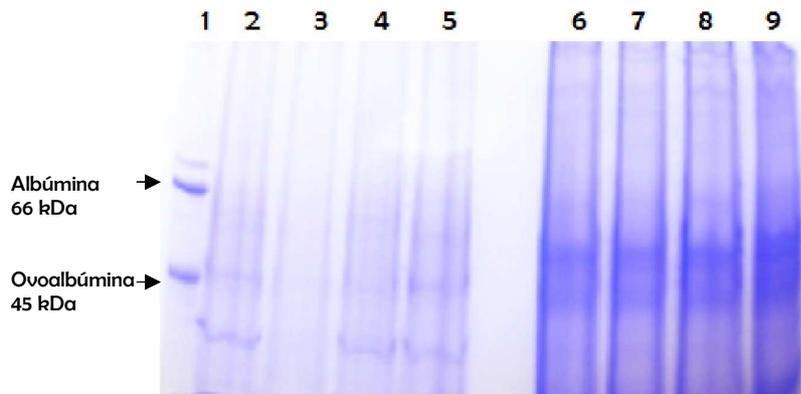


Figura 8 . Carrido electroforético de muestras proteicas obtenidas de médula espinal de rata. Carril 1: marcador de peso molecular albúmina y ovoalbúmina. Carriles 2-5: proteínas extraídas tras cuatro extracciones con la mezcla de detergentes y tratamiento con hidrocloreuro de guanidina, corresponden a G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión con NaCl, respectivamente. Los carriles 6-9: proteínas extraídas con hidrocloreuro de guanidina, corresponden a los cuatro grupos experimentales (G1-G4). El gel fue teñido con azul de coomassie.

Una vez se comprobó que el extracto de proteínas estaba libre de moléculas que interfirieran con su carrido electroforético, se procedió a calcular que cantidad del extracto se debía correr en la electroforesis para realizar el western blot.

En la figura 9 se observan las concentraciones evaluadas (0.05 mg/ml, 0.035 mg/ml, 0.0175 mg/ml, 0.00875 mg/ml, 0.00437 mg/ml, 0.0021 mg/ml, 0.001 mg/ml y 0.0005 mg/ml) las cuales fueron calculadas con base en la concentración de albúmina y ovoalbúmina del patrón de peso molecular. Teniendo en cuenta este resultado, se decidió realizar las electroforesis para western blot con un volumen de 0.05 mg/ml de extracto proteico.

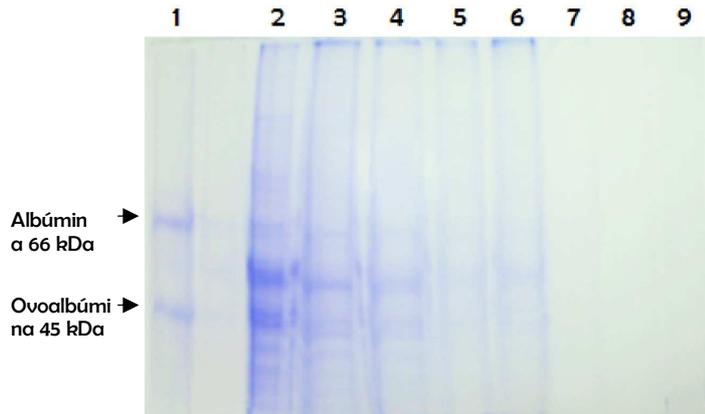


Figura 9 . Electroforesis de proteínas extraídas de médula espinal de rata. Se muestran diferentes concentraciones del extracto. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2 (0.05 mg/ml), carril 3 (0.035 mg/ml), carril 4 (0.0175 mg/ml), carril 5 (0.00875 mg/ml), carril 6 (0.00437 mg/ml), carril 7 (0.0021 mg/ml), carril 8 (0.001 mg/ml), carril 9 (0.0005 mg/ml). El gel fue teñido con azul de coomassie.

3.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO POR WESTERN BLOT

Con el fin de determinar la presencia o cambios en la expresión de las proteínas de choque térmico, se realizó electroforesis SDS-PAGE y western blot.

En la figura 10 se observa que entre los cuatro grupos experimentales existen pequeñas diferencias en cuanto a la cantidad de proteína HSP70. El grupo que corresponde a isquemia/reperfusión (G1G2, carril 2) mostró una intensidad similar con isquemia/reperfusión tratado con NaCl (G4, carril 4). Estos dos a su vez tienen una intensidad mayor que el grupo control el cual está formado por animales a los cuales se anestesiaron, se les realizó la incisión abdominal pero no se les realizó isquemia ni reperfusión. Es interesante que el grupo isquemia/reperfusión tratado con NAC (G3, carril 3) presente una intensidad menor que aquellos que solo recibieron NaCl o no recibieron nada, aunque presenta una intensidad mayor que el grupo control. Esto sugiere que la isquemia si aumenta la expresión de la proteína HSP70 y que el tratamiento con NAC disminuye la expresión de dicha proteína. Es probable que la acción sea indirecta es decir a través de mecanismos de oxidación-reducción.



Figura 10. Determinación de la proteína HSP70 por western blot. Se corrieron 0.05 mg/ml de proteínas extraídas de médula espinal de rata por SDS-PAGE. Se realizó el western blot según materiales y métodos. Carril corresponde a grupo control, sin isquemia ni reperusión. Carril 2 corresponde isquemia/repercusión (G1G2). Carril 3, isquemia/reperusión tratado con NAC (G3). Carril 4 isquemia/reperusión tratado con NaCl (G4).

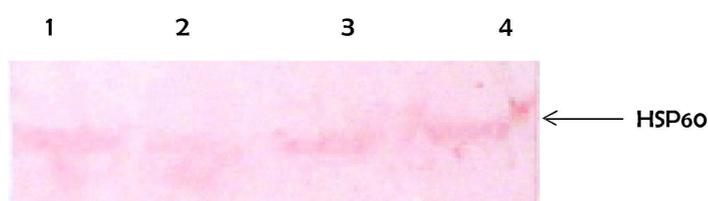


Figura 11. Determinación de la proteína HSP60 por western blot. Se corrieron 0.05 mg/ml de proteínas extraídas de médula espinal de rata por SDS-PAGE. Se realizó el western blot según materiales y métodos. Carril corresponde a grupo control, sin isquemia ni reperusión. Carril 2 corresponde isquemia/repercusión (G1G2). Carril 3, isquemia/reperusión tratado con NAC (G3). Carril 4 isquemia/reperusión tratado con NaCl (G4).

En la figura 11 se observa que entre los cuatro grupos experimentales no existen diferencias en cuanto a la cantidad de proteína HSP60. El grupo que corresponde a isquemia/reperusión (G1G2, carril 2) mostró una intensidad menor respecto a los demás tratamientos. Sin embargo los tres tratamientos restantes muestran intensidades similares. No tenemos explicación adecuada para esta disminución, dado que se utilizó la misma muestra para la figura 8. Esto sugiere que la isquemia no aumenta la expresión de la proteína HSP60 o por lo menos no se hace evidente por esta técnica.

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO POR ELISA

Para determinar la presencia de las proteínas de choque térmico en los tejidos provenientes de los cuatro tratamientos, se procedió a realizar su cuantificación por ELISA a partir de los extractos proteicos purificados.

En la figura 12 muestra valores de absorbancia relativamente bajas, sugiriendo que no hay una expresión abundante de las proteínas de choque térmico en ninguno de los cuatro tratamientos o que la proporción de estas proteínas es baja respecto a las demás y al aplicarlas a la placa de ELISA, la competencia entre todas las proteínas hace que se adhieran en baja proporción. No se observan grandes diferencias entre las muestras de los cuatro tratamientos. Sin embargo hubo un aumento en la expresión de la proteína HSP70 en el grupo 2 (isquemia/reperfusión) y una disminución significativa de esta proteína en el tratamiento de isquemia/reperfusión con NAC. Esto sugiere que la proteína HSP70 aumenta en el tratamiento isquemia/repercusión y que el tratamiento con NAC atenúa dicho aumento.

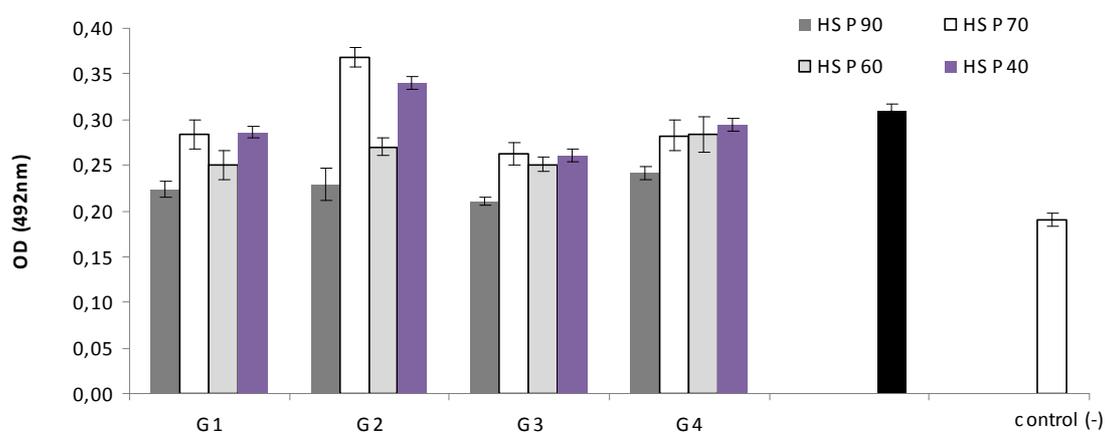


Figura 12. Determinación de las proteínas de choque térmico por ELISA. Se realizó ELISA directo según materiales y métodos. Como controles positivo y negativo de la técnica se utilizaron HSC70 recombinante humana, como control interno de la técnica. Los grupos de tratamiento corresponden a grupo sin isquemia ni reperfusión, G1: control. G2: isquemia/reperfusión. G3: isquemia/reperfusión tratados con NAC y G4: isquemia/reperfusión tratados con NaCl. Se muestra el promedio \pm desv prom.

3.5 ANALISIS ESTADISTICO

Dado el número reducido de individuos de este estudio, el análisis estadístico se plantea en forma descriptiva, teniendo en cuenta las diferencias encontradas en cada uno de los grupos planteados.

Los resultados de este estudio muestran una tendencia del grupo 3 isquemia y reperfusión con NAC a la disminución en la expresión de proteínas de choque térmico HSP70, lo cual corrobora la hipótesis inicial del estudio, basada en el efecto antioxidante en las células de la N-acetilcisteína reduciendo la disponibilidad de radicales libres, la administración intra arterial de este compuesto en reperfusión pos isquémica en tejido nervioso de medula espinal de ratas, generó un aumento en la biodisponibilidad del antioxidante para su utilización por el tejido sometido al estrés oxidativo;

Por otro lado se calcularon los promedios, y se graficó encontrando en la Figura 13, diferencias significativas en cada una de las proteínas de choque térmico.

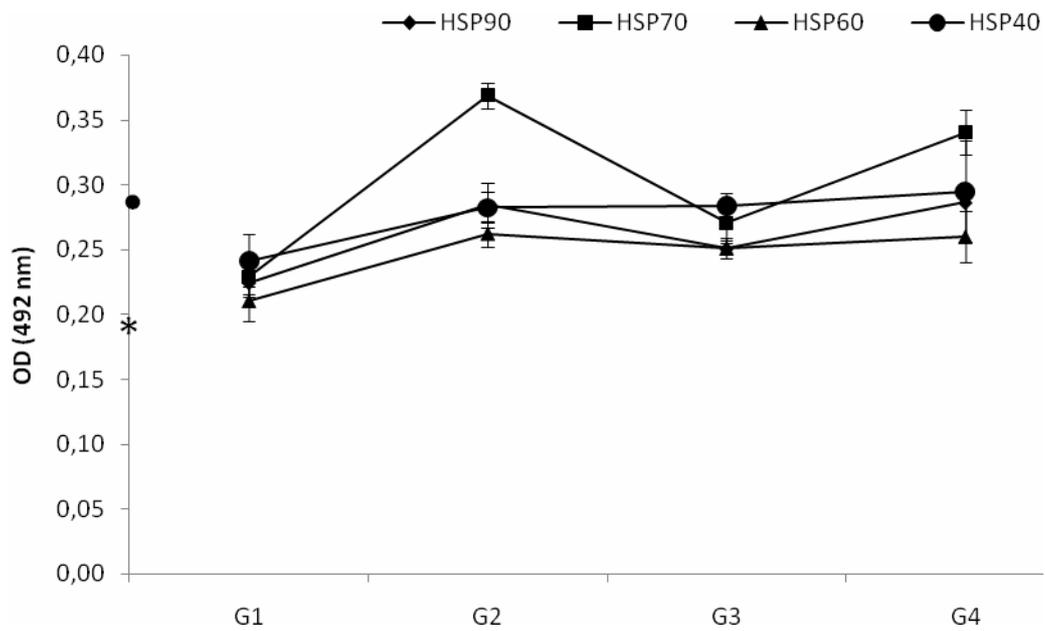


Figura 13. Determinación de las proteínas de choque térmico por ELISA. Se realizó ELISA directo según materiales y métodos. Como controles positivo y negativo de la técnica se utilizaron HSC70 recombinante humana, como control interno de la técnica. Los grupos de tratamiento corresponden a grupo sin isquemia ni reperusión, G1: control. G2: isquemia/reperusión. G3: isquemia/reperusión tratados con NAC y G4: isquemia/reperusión tratados con NaCl. Se muestra el promedio \pm desv prom (ver capítulo 7)

4. DISCUSION

Las proteínas de choque térmico también se conocen como proteínas de respuesta ante mecanismos de estrés celular que incluyen depleción de aminoácidos, aumento de radicales libres intracelulares, aumento o disminución de temperaturas y demás factores que alteren el plegamiento normal de las proteínas. La anoxia generada por disminución de la perfusión sanguínea es un factor de estrés que puede aumentar la presencia de radicales libres, por esto, se espera el aumento la expresión de proteínas de choque térmico, en un tejido determinado al disminuirse la perfusión sanguínea.

En nuestro experimento se obstruyó la perfusión sanguínea de la arteria aorta abdominal por debajo de las arterias renales, utilizando un clip para aneurisma durante 45 minutos, con el cual se pretendía disminuir la circulación sanguínea de la médula espinal.

Al hacer los cortes histológicos de la médula, en la figura 3 se observa que a pesar de tratar los cortes con diferentes alcoholes para desparafinar la muestra e incubar con anticuerpos específicos contra las proteínas de choque térmico, no hay una buena resolución de fluorescencia. Es conocido que el sistema nervioso es rico en lípidos y se sospechó una permeabilidad parcial, es decir, que los alcoholes utilizados para desparafinar no hubiesen permeabilizado completamente el tejido. Por esto se procedió a tratar los cortes con Tritón-X 100 al 1% y se repitió la inmunofluorescencia. Como se observa en la figura 4 los anticuerpos detectan mejor los antígenos, dado que la inmunofluorescencia es más intensa, en especial para HSP70, seguido de HSP60. La proteína HSP70 es una proteína inducible y constitutiva, es decir aumenta su expresión en casos de estrés agudo. Dado que el número de

células positivas para las proteínas de estrés es de 30%, significa que probablemente el tiempo de exposición para obstruir la perfusión no es 100% efectiva como consecuencia de la perfusión colateral de la médula espinal. Probablemente las proteínas de choque térmico HSP70 necesitan más tiempo de Isquemia y o de radicales libres o agentes inductores para sobre expresarse en mayor proporción.

A pesar que la inmunocitoquímica es menos sensible que la inmunofluorescencia, se procedió a realizar esta técnica dado que permite combinarla con una técnica fluorescente como el Hoechst. Como se aprecia en la figura 5 las células que son positivas para la inmunocitoquímica no incorporaron el Hoechst lo cual sugiere que el sustrato empleado (carbazol) para revelar la inmunocitoquímica está interfiriendo con el ingreso del Hoechst al DNA celular. Por esta razón no se puede determinar si la sobreexpresión de HSP70 o HSP60, en aquellas células que se colorearon en la inmunocitoquímica, protegen a las células de la apoptosis. A pesar de que el carbazol utilizado en la inmunocitoquímica no permite evidenciar claramente la fragmentación del DNA, se alcanza a observar hay células con un núcleo fragmentado. Esto sugeriría que algunas células sobre-expresan HSP70 pero esto no impide que entren en apoptosis. Es decir sería interesante determinar si en las células sometidas a estrés por isquemia y reperfusión existe una correlación entre expresión de proteínas de choque térmico y protección contra apoptosis, adicionalmente, teniendo en cuenta que la médula espinal es un tejido complejo formado por diferentes tipos de células, es posible que el efecto que tenga la isquemia/reperfusión sea diferente entre las poblaciones celulares y por lo tanto exista diferencias entre la expresión de las HSP entre células de la glía, neuronas y células endoteliales. Se conoce que las proteínas de choque térmico son antiapoptóticas y se sobreexpresan en condiciones de hipoxia, por ejemplo en los tumores sólidos. Sin embargo, observamos que el número de células que sobre-expresan las proteínas de estrés son muy bajas en la inmunofluorescencia.

Otra técnica utilizada para determinar la expresión de las proteínas de estrés fue el Western Blot. Para esto se aislaron las proteínas totales de la médula espinal, pero uno de los inconvenientes es la gran cantidad de lípidos que posee este tejido. Inicialmente se lisó el tejido medular empleando varios detergentes, a concentraciones utilizadas para lisar otros tejidos, pero esto no fue suficiente, como se evidencia en la figura 6. Por esta razón, luego de lisar, centrifugar y retirar el sobrenadante, se repitieron las extracciones al precipitado y luego de esto el precipitado remanente se desnaturizó completamente con Guanidina 6 M. Esta técnica desnatura completamente las proteínas y solo de esta manera se pudo obtener corridos electroforéticos con bandas definidas, como se aprecia en las figuras 7 a 9. Lo anterior sugiere que el alto contenido de lípidos y la composición de los mismos no son fácilmente solubilizados por detergentes utilizados comúnmente para lisar otro tipo de células. Una vez estandarizada la obtención y purificación de proteínas, para todos los tratamientos examinados en este trabajo, se procedió a realizar el Western Blot, previa calibración de las concentraciones y volúmenes corridos por SDS-PAGE. Como se observa en la figura 10, la banda correspondiente a la proteína HSP70 claramente aumenta en el grupo 2 de isquemia/reperfusión (G2) e isquemia/reperfusión tratado con NaCl (G4), comparado con el grupo control (G1) o al grupo isquemia/reperfusión tratado con NAC (G3). Este resultado apoya fuertemente la idea que el tratamiento isquemia/reperfusión sobre-expresa la proteína HSP70 y que si se trata con NAC disminuye dicha sobre-expresión.

La NAC está compuesta por el aminoácido cisteína, el cual actúa como agente reductor y forma parte del glutatión, molécula importante implicada en los mecanismos de oxidación - reducción celular. Es probable que al disminuir la irrigación sanguínea la médula entre en hipoxia y esto aumente la expresión de las proteínas de choque térmico como mecanismo necesario para evitar la desnaturización de proteínas debidas al aumento de radicales libres y a un fenómeno generalizado de oxidación o reducción de los mecanismos de reducción celular. Al suministrar NAC, este aminoácido restablece las condiciones de reducción por su acción como donador de cisteína y ser precursor del glutatión. Esto a su vez puede llevar a disminuir

los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico, dado que disminuye la oxidación celular y de esta manera se reduce los niveles de proteínas desnaturalizadas.

Se conoce que HSP70 es una proteína inducible y constitutiva y es la que primero se eleva cuando hay condiciones agudas de estrés celular, en cambio las demás proteínas como las HSP60 y HSP90, tienen una respuesta retardada o se elevan más ante eventos crónicos y menos ante eventos agudos, como es el caso del presente trabajo. Esto concuerda con lo observado en la figura 11, la cual indica que HSP60 no tiene cambios evidentes en los diferentes tratamientos. Sin embargo, HSP60 se evidencia por inmunofluorescencia, junto con HSP70, sugiriendo que la sobreexpresión de HSP60 es leve y solo se puede detectar mediante técnicas sensibles como la inmunofluorescencia pero no por técnicas menos sensibles como el Western Blot. Esta apreciación se corrobora con la técnica de ELISA de la figura 12, en la cual se evidencia que HSP70 está en aumento respecto a las demás proteínas. La técnica de ELISA es tan sensible como la inmunofluorescencia, sin embargo en este caso HSP60 no aumenta respecto a HSP90 o HSP40, esto se puede explicar porque la concentración de HSP60 no es muy alta y al aplicar la totalidad de proteína extraídas de la médula espinal a la placa de ELISA las demás proteínas compiten y desplazan a HSP70 impidiendo una unión adecuada al pozo de la placa de ELISA. Es decir, la concentración de HSP60 es baja y la cantidad de proteína que se adhiere a la placa es muy baja y no se puede detectar a pesar de la sensibilidad de la técnica.

En su conjunto, los resultados del presente trabajo sugieren que al disminuir la perfusión, e inducir anoxia, como compensación por la disminución de los mecanismos de reducción celular y posible aumento de proteínas desnaturalizadas, la célula sobre-expresa las proteínas de choque térmico. De estas proteínas se aumenta principalmente la de respuesta aguda, HSP70 seguido de la HSP60. No se evidenciaron cambios en la expresión de HSP90 ni HSP40. Igualmente, al administrar NAC probablemente se restablece la capacidad reductora de la célula y de manera indirecta restaura a niveles basales de expresión de las proteínas HSP70.

CONCLUSIONES

Se logró estandarizar el método de isquemia y reperfusión medular, por oclusión de la arteria aorta abdominal por debajo del nacimiento de las arterias renales en ratas Wistar durante 45 minutos.

Se estandarizó la técnica para obtener y purificar las proteínas. Para esto se aislaron las proteínas totales de la médula espinal, por su alto contenido de lípidos que posee este tejido. Se lisó el tejido medular empleando varios detergentes, a concentraciones utilizadas para lisar otros tejidos, luego de lisar, centrifugar y retirar el sobrenadante, se repitieron las extracciones al precipitado y luego de esto el precipitado remanente se desnaturizó completamente con Guanidina 6 M. Esta técnica desnaturiza completamente las proteínas y solo de esta manera se pudo obtener corridos electroforéticos con bandas definidas.

La sobre expresión de proteínas de choque térmico en respuesta al daño de proteínas estructurales de membrana durante la Isquemia y Reperfusión del tejido nervioso puede ser modificada por el uso o administración de N Acetil Cisteína inmediatamente previa a la reperfusión.

Las proteínas de choque térmico se expresan en su mayoría durante la isquemia. Es posible que por esta razón la administración de medicamentos antes o durante la reperfusión, no modifique en forma exagerada la presencia de dichas proteínas. Sin embargo, los resultados del estudio sugieren que sí hay una diferencia estadísticamente significativa entre administrar y no administrar el medicamento.

A partir de estos resultados se pueden plantear estudios adicionales como la administración de la NAC al inicio del período isquémico comparada con la no administración del medicamento. Son necesarios además, estudios adicionales que comparen otros esquemas y dosis de administración de la NAC.

En general, las posibles aplicaciones clínicas de los resultados de este estudio representan una esperanza de disminución de la morbilidad y de la mortalidad asociada a la isquemia transitoria pero prolongada del tejido nervioso, así como del riesgo de transformación hemorrágica del tejido isquémico tratado con trombolisis intravascular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009. 111(6):483-95. Epub 2009 May 14.
2. Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem.* 2009, 109 Suppl 1:133-8. Review.
3. Lipton P. Ischemic death cell in brain neurons. *Physiol Rev.*;79:1431-568. 1999.
4. Knuckey,. N.W., Palm, D., Primiano, M., Epstein. M.H., Johanson, C.E. N-acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke*, 1995; 26: 305-311.
5. Hu M, Zhang X, Liu W, Cui H, Di N Longitudinal changes of defensive and offensive factors in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats.. *Brain Res Bull.* 2009 May 14.
6. Gill R, Soriano M, Blomgren K, Hagberg H, Wybrecht R, Miss MT, Hofer S, Adam G, Niederhauser O, Kemp JA & Loetscher H. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002, 22: 420–430.
7. Spranger, M., Krempien, S., Schwab, S., Donneberg, S., Hacke, W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. *Stroke* 1997; 28: 2425-2428

8. Titova E, Ostrowski RP, Rowe J, Chen W, Zhang JH, Tang J. Effects of superoxide dismutase and catalase derivatives on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2008;105:33-5.
9. Chan, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27 (6): 1124-1129, 1996
10. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1973;134:707-716.
11. Aitio, M.L. N-acetylcysteine – passe-partout or much ado about nothing?. *Br J Clin Pharmacol.* 2006 January; 61(1): 5–15.
12. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:6–20.
13. De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, Mitra D, Watanabe N, Nakamura H, Tjioe I, Deresinski SC, Moore WA, Ela SW, Parks D, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest.* 2000;30:915–29.
14. Galli F, Ghibelli L, Buoncristiani U, Bordoni V, D'Intini V, Benedetti S, Canestrari F, Ronco C, Floridi A. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:1592–600.
15. Himmelfarb J, Hakim RM. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003;12:593–8.
16. Molnar Z, Szakmany T, Koszegi T. Prophylactic N-acetylcysteine decreases serum CRP but not PCT levels and microalbuminuria following major abdominal surgery. A prospective, randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Intensive Care Med.* 2003;29:749–55.

17. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003;42:1075–81.
18. Raj DS, Lim G, Levi M, Qualls C, Jain SK. Advanced glycation end products and oxidative stress are increased in chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2004;43:154–60.
19. Matsumiya N, Koehler RC, Kirsch JR, Traystman RJ. Conjugated superoxide dismutase reduces extent of caudate injury after transient focal ischemia in cats. *Stroke*. 1991;22:1193-1200.
20. D. A. Dawson^a, H. Masayasu^b, D. I. Graham^a and I. M. Macrae. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. Volume 185, Issue 1, 6 February 1995, Pages 65-69
21. Matsui T, Johsita H, Asano T, Tanaka J. Effect of a free radical scavenger, ebselen, on cerebral ischemia. In: Krieglstein J, Oberpichler H, eds. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Publishers; 1990:363-367.
22. MacManus, J.P., Linnik, M.D. Gene expresión induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspectiva. *Journal of Cerebral blood flow and Metabolism*. 1997,17(8):815-832.
23. Sharp, F.R., Aigang, L., Tang, Y., Millhorn, D.E. Multiple molecular penumbras alter focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral Blood Flow and Metabolism*. 20(7):1011 2000
24. Gregory J. del Zoppo, MD; Richard Milner, MD, PhD; Takuma Mabuchi, MD, PhD; Stephanie Hung, MS; Xiaoyun Wang, MS; Greta I. Berg, MA James

A. Koziol, PhD. Microglial Activation and Matrix Protease Generation During Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*. 2007;38:646.

25. Ananthan J, Goldberg AL & Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. 1986. *Science* 232: 522–524

26. States BA, Honkaniemi J, Weinstein PR & Sharp FR. DNA fragmentation and HSP70 protein induction in hippocampus and cortex occurs in separate neurons following permanent middle cerebral artery occlusions. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996, 16: 1165–1175.

27. Planas AM, Soriano MA, Rodriguez-Farre E & Ferrer I. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain. *Neurosci Lett* 1995, 200: 187–190.

28. Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zhang RL & Garcia JH. Neuronal survival is associated with 72-kDa heat shock protein expression after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 1993, 120: 187–194.

29. Plumier JC, Armstrong JN, Wood NI, Babity JM, Hamilton TC, Hunter AJ, Robertson HA & Currie RW. Differential expression of c-fos, Hsp70 and Hsp27 after photothrombotic injury in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997, 45: 239–246.

30. Plumier JC, David JC, Robertson HA & Currie RW. Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997, 17: 781–790.

31. Dwyer BE, Nishimura RN, De Vellis J & Yoshida T. Heme oxygenase is a heat shock protein and PEST protein in rat astroglial cells. *Glia* 1992, 5: 300–305.
32. Tumerdem B., Benli F., Mete Ozgur., Tekeli Fatma. The effect of vitamin C on Ischemia Reperfusion Injury Because of Prolonged Tourniquet Application With Reperfusion Intervals. *Annals of plastic Surgery* 2009, 62: 194-199
33. Erturk E, Cekic B, Gexe & Kemimoglu S. Comparison of the effect of propofol and N- acetyl Cysteine in preventing ischaemia- reperfusion injury. *European Journal of Anesthesiology* 2009, 26: 219-284
34. Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2007; 139 : 274-279
35. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative Stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15: 7-10
36. Berger NM, Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: evidencia and practice. *Nutr Clin Pract.* 2006;21:438-449
37. Welch W.J. How cells respond to stress. *Scientific American.* 1993:56-64.
38. Welch W.J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure, function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews.* 2006 ; 4 : 1063-1081.
39. Lewin B. Chaperones may be required for protein folding. In: *Genes VII.* Oxford 2.000:194-198.

40. Wickner S., Maurizi M.R., Gottesman S. Posttranslational Quality Control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 1.999;286:1888-1893.
41. Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Ann Rev. Biochem.* 2.001;70:603-649.
42. Urano F., Wang X., Zhang Y., et al. Coupling of stress in the ERK to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2.000;287:664-666.
43. Sakurai M, Masashi A, Abe K. Selective Motor Neuron death and heat shock protein induction after spinal cord ischemia in rabbits. *J. Torac. Cardiovascular Sur.* 1997;113: 159-164
44. Endres M., Dirnagil U., Moskowitz M. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. *H. Clinical Neurology.* 2009;92: 29-41
45. Durukan A., Tatlisumak T., Animal models of Ischemic Stroke. *H.Clinica Neurology.* 2009;92:43-66
46. Ning M., Wang X., Lo E. Reperfusion injury after stroke: neurovascular proteases and the blood-brain barrier. *H. Clinical Neurology.* 2009: 92 : 116-135
47. Yang Y., Yang T., Li Q. A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: a comparison study. *J. Neurosci methods.* 2002: 118: 199-206
48. Wang CX., Yang Y., Yang T. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats. Introduction and evaluation. *Brain Res Brain Res .* 2002: 7:115-120
49. Wahl F., Allix M., Plotkine M. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1992: 23: 267-272

50. Tamura A., Graham DI., McCulloch J. Focal Cerebral Ischemia in the rat. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1: 53-60.
51. Guadagno JV., Donnan GA., Markus R. Imaging the ischaemic penumbra. *Curr Opin Neurol.* 2004; 17:61-67.
52. Hossmann K A. Collateral circulation of the brain: Heart, brain, kidney, limb, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1993; pp. 291-315.
53. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 1994; 36: 557-565.
54. Kubic CS., Adams RD. Occlusion of the basilar artery: a clinical and pathological study. *Brain.* 1946; 69: 73-121

