

*Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional*

Unidad Zacatenco

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**“Participación de las proteínas 14-3-3 γ , PEBP1 y NDKA en la
isquemia/reperfusión sanguínea tempranas en la corteza parietal en un
modelo de rata”**

Tesis que presenta

M. en C. Hugo Sánchez Hernández

Para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de tesis:

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Dra. Alma Ortiz Plata

México D.F.

30 de junio de 2015

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con claves #83866 y #156906, y del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF): PIFUTP09-298, en el Laboratorio de Entomología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y en el Laboratorio de Neuropatología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN-MVS) de la Secretaría de Salud (SSA), bajo la Cotutoría del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández y de la Dra. Alma Ortíz Plata.

Durante el desarrollo de la tesis se recibió el apoyo de una beca de Doctorado del CONACYT con número de registro 209869.

Agradecimientos

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández y a la Dra. Alma Ortiz Plata por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y poder llevar a cabo éste proyecto de investigación científica.

A la Bióloga Experimental Leticia Cortés Martínez por sus asesorías técnicas y su colaboración en la estandarización de las técnicas de proteómica usadas en el laboratorio.

A la Bióloga Aurora Sánchez García por su asesoría para la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica en el INNN-MVS.

A las Doctoras Febe Elena Cázares Raga, Rosa María del Ángel Nuñez de Cazerres, María Esther Orozco Orozco, María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido y María Elena Chánez Cárdenas por ser miembros del jurado de tesis doctoral y por sus asesorías para el desarrollo de éste proyecto.

A los señores Juan García Jiménez y Juan Manuel Ceballos Ramírez por su apoyo técnico.

A todos mis compañeros y amigos del CINVESTAV por su apoyo académico y moral.

Dedicatorias

**A mis padres, hermanos, familia y amigos, en especial a mi abuelita Concha
por sus enseñanzas de vida.**

A David Estudillo y al tío Fili...

A todas las personas que han sufrido de la enfermedad vascular cerebral.

**Al CINVESTAV y al INNN-MVS por permitir la expresión de espíritus
curiosos.**

Índice de contenido

Lista de figuras y tablas.....	9
Lista de abreviaturas.....	13
1) Resumen.....	16
Abstract	
2) Antecedentes.....	19
2.1) Introducción.....	19
2.1.1) Enfermedad cerebral vascular.....	19
2.1.2) Enfermedad cerebrovascular isquémica (isquemia cerebral).....	20
2.1.3) Reperusión sanguínea.....	20
2.1.4) La cascada isquémica.....	21
2.1.4.1) Excitotoxicidad.....	22
2.1.4.2) Inlujo de calcio en la isquemia.....	23
2.1.4.3) Estrés oxidativo.....	24
2.1.4.4) Radicales libres.....	24
2.1.4.5) Óxido nítrico.....	25
2.1.4.6) Señalización celular en la isquemia cerebral.....	27
2.1.5) Muerte celular.....	29
2.1.5.1) Apoptosis.....	29
2.1.5.2) Necrosis.....	30
2.1.6) Expresión genética en la isquemia cerebral.....	31

2.1.7) Proteómica e isquemia cerebral.....	32
2.1.8) Fisiopatología de las células gliales en la isquemia cerebral.....	32
2.1.8.1) Activación de la macroglía.....	32
2.1.8.2) Activación de la microglía.....	37
2.1.9) Proteínas con cambios en el nivel de expresión bajo condiciones de isquemia cerebral focal y reperusión sanguínea tempranas en la corteza parietal de rata.....	38
2.1.9.1) Proteína 14-3-3 γ	38
2.1.9.2) Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1 (PEBP1).....	39
2.1.9.3) Nucleósido difosfato cinasa A (NDKA).....	40
3) Planteamiento del problema.....	42
3.1) Justificación.....	42
3.2) Hipótesis.....	44
3.3) Objetivo general.....	44
3.3.1) Objetivos particulares.....	44
3.4) Metodología.....	45
3.4.1) Estrategia experimental.....	45
3.4.2) Materiales y métodos.....	46
3.4.3) Inducción de isquemia cerebral focal.....	46
3.4.4) Extracción de las proteínas.....	48
3.4.5) Electroforesis de las proteínas.....	50
3.4.5.1) Electroforesis en una dimensión.....	50

3.4.5.1) Electroforesis en dos dimensiones.....	50
3.4.6) Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS).....	52
3.4.7) Western blot.....	52
3.4.8) Inmunohistoquímica.....	54
4) Resultados.....	55
4.1) Daño en la corteza parietal durante la isquemia temprana.....	55
4.2) Perfil de proteínas de la corteza parietal de la rata con condiciones de isquemia cerebral focal y reperfusión sanguínea tempranas.....	57
4.3) Expresión de 14-3-3 γ	62
4.4) Vías PI3K/Akt y RAS/MEK/ERK y expresión de la proteína Bad.....	65
4.5) Expresión de PEBP1.....	67
4.6) Expresión de NDKA.....	71
5) Discusión.....	73
5.1) Enfermedad vascular cerebral.....	73
5.2) Modelo de isquemia cerebral focal en rata y reperfusión sanguínea.....	73
5.3) Proteína 14-3-3 γ	74
5.4) Activación de las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK y fosforilación de la proteína Bad.....	75
5.5) Proteína de Unión a Fosfatidil Etanolamina 1.....	79
5.6) Proteína Nucleósido Difosfato Cinasa A.....	81
6) Conclusiones.....	84
6.1) Proteína 14-3-3 γ	84

6.2) Proteína de Unión a Fosfatidil Etanolamina (PEBP1).....	84
6.3) Proteína Nucleósido Difosfato Cinasa A (NDKA).....	85
7) Perspectivas del proyecto de investigación.....	86
7.1) 14-3-3 γ	86
7.2) PEBP1.....	86
7.3) NDKA.....	86
8) Referencias bibliográficas.....	87

Lista de figuras y tablas

Tabla 1. Valores obtenidos con el sistema de espectrometría de masas LTQ Orbitrap Hybrid a partir del análisis densitométrico de los puntos con cambios de concentración en los geles bidimensionales. Los valores fueron comparados con el proteoma de la rata en el software Protein Pilot. Las proteínas se reportaron con una confianza mayor al 99% (unused ProtScore >2.0).

Figura 1. Síntesis de óxido nítrico. La óxido nítrico sintetasa, neuronal y epitelial son las isoformas dependientes de calcio, mientras que la óxido nítrico sintetasa inducible es independiente de Ca^{2+} . Modificada de Diez Tejedor, 2001.

Figura 2. Detección macroscópica del volumen de isquemia temprana del hemisferio izquierdo de la CP de la rata (flechas) *in vivo*, en cortes (anterior (abajo), medio y posterior (arriba)) del cerebro de rata teñidos con la técnica del TTC. A) Cerebro de rata intacta (control normal), B) Cortes del cerebro de rata Sham, C) Cerebro con 1h de ICF, D) Cerebro con ICF/RP. Se muestra el daño debido a la isquemia en la región color blanco (no teñida por el TTC). H=hipocampo, CP=corteza parietal, CE=cuerpo estriado.

Figura 3. Secciones de la CP de la rata teñidas con hematoxilina y eosina; se muestran los efectos de la ICF y la ICF/RP. A) Control, B) Sham, C) 1h de ICF, D) 1h de ICF con 24h de RP. Se muestran las células de la unidad neurovascular. Neuronas (N), Células de la glía (G), Vasos sanguíneos (VS). Barra=20 μ m

Figura 4. Figura representativa del perfil de proteínas de la CP del hemisferio izquierdo de la rata con condiciones de ICF e ICF/RP sanguínea tempranas. Se resolvieron 150 μ g de proteínas con electroforesis bidimensional (rango de IEF= 4-7; PAGE-SDS al 15%). Teñidos con azul de Coomassie coloidal. A) Perfil de proteínas de la CP de ratas intactas usadas como control, B) Control Sham, C) 1h de ICF y D) 1h de ICF/RP (Las flechas indican los puntos de las proteínas identificados por espectrometría de masas).

Figura 5. Proteínas identificadas en la CP con cambios con 1h de ICF con y sin 24h de RP en el cerebro de rata con espectrometría de masas. Se realizó la densitometría para obtener la densidad de las manchas con el software Image Master 2D Platinum. El punto correspondiente a la proteína 14-3-3 no mostró cambios, sin embargo, el punto correspondiente a la isoforma gamma de 14-3-3 incrementa de forma significativa con 1h de ICF. Mientras que PEBP1, NDKA, SOD1 y la actina citoplasmática 2 disminuyen en ambas condiciones de ICF/RP tempranas. Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles. Con un valor de $p < 0.05$ considerándose significativo.

Figura 6. La proteína 14-3-3 γ varía bajo condiciones de isquemia y RP tempranas. Se muestra la concentración en 3D de cada punto reconocido por el anticuerpo en los recuadros derechos inferiores de cada condición experimental. Las proteínas totales de la CP de la rata fueron resueltas con 2DE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, incubadas posteriormente con un anticuerpo policlonal específico contra la proteína 14-3-3 γ . A) Control normal, B) Control Sham, C) 1h de ICF con aumento de la expresión de la proteína 14-3-3 γ , D) 1h de ICF con 24h de RP con la expresión disminuida de la proteína 14-3-3 γ .

Figura 7. Localización de la proteína 14-3-3 γ en el citoplasma de las neuronas (N) de la CP del hemisferio cerebral izquierdo de la rata. Fue realizada dirigiendo un anticuerpo policlonal contra la proteína, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado y se reveló con la reacción de DAB. A) Control normal. B) Control sham. C) 1h de ICF; 14-3-3 γ que aumentó en el citoplasma de las neuronas. D) ICF/RP provocaron la disminución del número de neuronas positivas. El citoplasma de las neuronas con la señal positiva para 14-3-3 γ está señalado con las flechas. Barra= 20 μ m.

Figura 8. Análisis de los cambios de expresión y fosforilación de Bad, PI3K y RAS. Las proteínas de la CP de la rata con ICF e ICF/RP se analizaron mediante western blot (figura representativa) para la detección de la activación de las vías PI3K/Akt

y RAS/MEK/ERK; involucradas en la fosforilación de la proteína Bad. Para la proteína Bad se detectó su cantidad y fosforilación en los tres residuos (S136, S112 y S155) involucrados en la interacción con las proteínas 14-3-3. Carriles A) Control normal. B) Control Sham. C) 1h de ICF. D) ICF/RP. Los asteriscos indican diferencia significativa al comparar con los controles con una $p < 0.001$ (ANOVA). Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles.

Figura 9. La PEBP1 no varió en su concentración en ICF y ICF/RPF. Las proteínas totales de la CP de la rata fueron resueltas por electroforesis en PAGE-SDS y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, incubadas posteriormente con un anticuerpo específico contra PEBP1. A) Control normal, B) Control Sham, C) 1h de ICF, D) ICF/RP. Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles.

Figura 10. A) Gel bidimensional del perfil de proteínas de la CP de la rata donde se muestra la localización del punto (B) identificado con MS como PEBP1. C) WB 2D donde se observan los cambios de concentración entre los tres puntos reconocidos con el anticuerpo específico anti-PEBP1 con el mismo peso molecular pero con diferente punto isoeléctrico. D) WB 2D contra la forma fosforilada de PEBP1 en el residuo S153. Se puede observar la disminución de la expresión con 1h de ICF, siendo más evidente ésta disminución con ICF/RP. E) Gráfico donde se muestran los cambios de concentración del punto correspondiente a PEBP1 en el gel 2DE teñido con azul de Coomassie coloidal. F) Cambios de concentración de los tres puntos que el anticuerpo anti-PEBP1 reconoció. G) Gráfico que muestra la disminución de la forma fosforilada de PEBP1 en el residuo de S153. Los asteriscos indican diferencia significativa al comparar con los controles con una $p < 0.005$ (ANOVA).

Figura 11. Figura representativa de la localización de la proteína PEBP1 en el citoplasma de las neuronas (N) de la CP del hemisferio izquierdo de la rata. A)

Control normal, B) Control sham, C) 1h de ICF. D) ICF/RP. La señal positiva para PEBP1 está señalada con las flechas. Barra= 20 μ m.

Figura 12. Cambios en la concentración de la proteína NDKA. Las proteínas de la CP de la rata se analizaron mediante western blot bajo condiciones de ICF y RP para detectar la NDKA. A) Control normal, B) Control Sham, C) 1h de ICF, D) ICF/RP. Los asteriscos indican diferencia significativa al comparar con los controles con una $p < 0.005$ (ANOVA). Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles.

Figura 13. Localización de la proteína NDKA en el núcleo y citoplasma de las neuronas (N) de la CP del hemisferio izquierdo. Fue realizada dirigiendo un anticuerpo policlonal contra la proteína, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado y se reveló con la reacción de DAB. A) Control normal. B) Control Sham. C) 1h de ICF; NDKA disminuyó en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas, D) ICF/RP; provocaron la disminución del número de neuronas positivas. El núcleo y citoplasma de las neuronas con la señal positiva para NDKA están señalados con las flechas. Barra= 20 μ m.

Figura 14. Modelo para la interacción de la proteína Bad fosforilada con la proteína 14-3-3 γ y su efecto en la ICF temprana en la CP de la rata. En condición basal, Bad esta fosforilada en los residuos S136 y S112 debido a las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK, mientras que el residuo S155 por PKA. Al ocurrir la ICF, los receptores tirosina cinasa (RTKs) podrían ser fosforilados por diversos factores de crecimiento activados por la isquemia, y en este caso, la vía Ras/MEK/ERK no muestra sobreactivación pero PI3K/Akt sí se sobreactiva, aumentando la fosforilación de Bad en los residuos S136 y S112 a pesar de la disminución del ATP por la isquemia. Mientras que de forma simultánea, Bad S155 podría estar siendo fosforilada por la PKA sobreactivada. El aumento de la fosforilación de Bad en sus tres residuos, podría aumentar su asociación con la proteína 14-3-3 γ evitando la muerte celular.

Lista de abreviaturas

ACC: Arteria carótida común

ACE: Arteria carótida externa

ACI: Arteria carótida interna

ACM: Arteria cerebral media

ADP: Difosfato de adenosina

AMP: Monofosfato de adenosina

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ATP: Trifosfato de adenosina

CE: Cuerpo estriado

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio] propano sulfonato

CP: Corteza parietal

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DTT: Dithiothreitol

EGP-314: Glicoproteína epitelial 314

eNOS: Sintetasa de óxido nítrico epitelial

EVC: Enfermedad cerebral vascular

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GFAP: Proteína acídica glial fibrilar

H: Hipocampo

HCNP: Péptido neuroestimulador colinérgico

ICF: Isquemia cerebral focal

IEG: genes de expresión inmediata

IL: Interleucina

iNOS: Sintetasa de óxido nítrico inducible

kDa: Kilo Daltones

LM-PCR: Ligand-mediated Polymerase Chain Reaction

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MS: Espectrometría de masas
NADPH: Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato
NDKA: Nucleósido difosfato cinasa A
NDPK: Nucleósido difosfato fosfato cinasa
NFκB: Factor nuclear κB
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico
nNOS: Sintetasa de óxido nítrico neuronal
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP: Poli-ADP-Ribosa Polimerasa
PEBP1: Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1
pI: Punto isoelectrico
PKA: Proteína cinasa A
PKB: Proteína cinasa B
PKC: Proteína cinasa C
RKIP: Proteína inhibidora de la Raf cinasa
ROS: Especies reactivas de Oxígeno
RP: Reperfusión sanguínea
rt-PA: Activador del plasminógeno tisular
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en Transcripción Reversa
SDS: Dodecil-Sulfato de Sodio
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
TEMED: Tetrametiletilendiamina
TGS: Trizma base, Glicina y SDS
TNF: Factor de necrosis tumoral
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
Trizma: Tris
TTC: Cloruro de tetrazolio
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling

UA: Unidades arbitrarias

WB: Western blot

1) Resumen

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es cualquier alteración en el cerebro producida por un proceso patológico de los vasos sanguíneos, en el cual se afecta un área del encéfalo por isquemia o por hemorragia. Dentro de estos trastornos, está la isquemia cerebral focal (ICF), que es la disminución del flujo sanguíneo en una región específica del cerebro, disminuyendo la disposición de oxígeno y de glucosa, agravándose el daño, en ocasiones, con la reperfusión sanguínea (RP). El análisis de la expresión y la localización de proteínas durante la ICF temprana es necesario para conocer los mecanismos celulares y moleculares fisiopatológicos involucrados en este proceso, para proponer intervenciones terapéuticas pertinentes que disminuyan las secuelas del daño.

En el presente proyecto se utilizó un modelo de ICF, inducida en el cerebro de ratas macho Wistar durante 1h y 1h de ICF más 24h de RP. Al término de estos tiempos tempranos se sacrificaron las ratas para extraer los cerebros y obtener la corteza parietal (CP) para analizar las proteínas y su posible participación en el evento isquémico. Se encontró que la proteína 14-3-3γ aumentó su concentración con ICF, pero disminuyó con 1h de ICF y 24h de RP sanguínea en el citoplasma de las neuronas. Concordando estos resultados con la activación de la vía PI3K/Akt y con el aumento de expresión de la proteína Bad total y Bad fosforilada en sus residuos de serina 112 (S112), serina 136 (S136) y serina 155 (S155), necesarios para que 14-3-3γ interaccione para inhibir la muerte celular como un posible mecanismo de neuroprotección.

La proteína de unión a fosfatidil etanolamina 1 (PEBP1) se localizó tanto en el citoplasma de las neuronas como de astrocitos y el WB mostró un cambio de concentración en tres posibles isoformas de esta proteína. Uno de ellos; en el residuo serina 153 (S153), necesario para la activación/desactivación de la vía de señalización celular Raf1/MEK/ERK y del receptor alfa adrenérgico involucrados en la respuesta al daño isquémico.

Finalmente, la proteína nucleósido difosfato cinasa A (NDKA) se encontró disminuida con isquemia temprana y se localizó el núcleo de neuronas.

Abstract

Vascular cerebral disease is a pathological process produced in the brain vessels, affecting a zone due to ischemia or a hemorrhagic process. The focal cerebral ischemia is one of them where is diminished the blood supply in a specific brain zone, diminishing the glucose and oxygen and appearing the injury due to ischemia and sanguineous reperfusion. The protein expression analysis and their location during early focal cerebral ischemia, is necessary to know the cellular and molecular mechanisms involved in this process, to propose therapeutics options and preventing the injury expansion.

We used a focal cerebral ischemia model where ischemia was induced in the male brain rat for 1h and in other group 1h of focal cerebral ischemia and 24h of sanguineous reperfusion. After that, the rats were sacrificed to obtain the brains, specifically the parietal cortex to analyze their proteins and their possible role in the ischemic event. We found that 14-3-3 γ increased its concentration with focal cerebral ischemia, but decreased with focal cerebral ischemia and 24h of sanguineous reperfusion in the cytoplasm of neurons. Besides these results, the PI3K/Akt pathway increased its activation and the Bad protein increased its total concentration, as well as its phosphorylations in S112, S136 and S155 specifically with 1h of ischemia. These phosphorylated residues are necessary to the association of 14-3-3 to avoid the cellular death, possibly as a neuroprotection mechanism.

The Phosphatidyl ethanolamine binding protein 1 (PEBP1) was located in cytoplasm of neurons and glia cell. The western blot showed changes in concentration of three possible isoforms. One of them in S153, necessary to the activation/deactivation of raf1/MEK/ERK pathway and the alpha-adrenergic receptor both involved in the response to the ischemic injury,

Finally, we found the NDKA protein diminished with early focal cerebral ischemia and it was found in the nucleus of neurons.

2) Antecedentes

2.1) Introducción

2.1.1) Enfermedad vascular cerebral

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es cualquier alteración en el cerebro producida por un proceso patológico de los vasos sanguíneos. Desde el punto de vista fisiopatológico y anatomopatológico (Díez-Tejedor, 2001), es conveniente clasificar la enfermedad vascular cerebral en dos tipos:

1) Enfermedad cerebrovascular isquémica (hipoxia, isquemia e infarto), consecuencia de la alteración del flujo sanguíneo y de la re-oxigenación del tejido del sistema nervioso central (SNC) y se presenta con un porcentaje del 84% del total de la EVC.

2) Enfermedad cerebrovascular hemorrágica (hemorragia por la rotura de los vasos sanguíneos del SNC). La hemorragia ocasiona la presencia de sangre, ya sea en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral), o en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea) y su prevalencia es del 16% de la EVC (Díez-Tejedor, 2001).

En ambos casos, se puede agravar el daño con la RP, ya que la restauración del flujo sanguíneo ocasiona una descarga de oxígeno dependiendo del tiempo de isquemia y de la intensidad del EVC (Sakata, 2015).

Los efectos de la EVC y la RP han sido estudiados solo a tiempos largos después del accidente isquémico (Yang, 2014) debido, entre otras razones, a la falta de disponibilidad del material biológico humano adecuado. Sin embargo, conocer el estado de los tejidos poco después del evento isquémico, en el período que aún no ha ocurrido un daño irreversible en el tejido cerebral, será útil para proponer intervenciones terapéuticas oportunas que disminuyan o eviten las secuelas del daño (Zhan, 2014).

La EVC es la patología neurológica con mayor prevalencia en el mundo (Wang, 2014); la OMS calcula que 15 millones de personas sufren de EVC en el mundo, de las cuales 5 millones mueren, 5 millones se recuperan y 5 millones quedan con algún tipo de discapacidad. Una de estas es la demencia vascular que ocupa el segundo lugar en demencias solo después de la enfermedad de Alzheimer (Xin, 2014).

2.1.2) Enfermedad cerebrovascular isquémica (isquemia cerebral)

Cuando el flujo sanguíneo que irriga una porción del cerebro se ve reducido, la supervivencia del tejido en riesgo depende de un número de factores que modifican la gravedad del daño: la disponibilidad de circulación colateral, la gravedad de la isquemia (Stetler, 2014), la magnitud y rapidez de la reducción de flujo. Estos factores determinarán a su vez, la localización anatómica precisa y el tamaño de la lesión, en consecuencia, el déficit clínico.

Los dos tipos principales de isquemia aguda son:

- a) La isquemia cerebral global; que se produce cuando hay una reducción generalizada de la perfusión cerebrovascular debido a una falla hemodinámica, como en el paro cardíaco, el shock o la hipotensión grave.
- b) La ICF; causada por la reducción o cese del flujo sanguíneo en una zona localizada del cerebro, por la obstrucción de un vaso sanguíneo de gran calibre (por oclusión embólica o trombótica arterial, a menudo en el marco de la aterosclerosis), o por la enfermedad de vasos pequeños (como en la vasculitis o en la oclusión secundaria a las lesiones arterioescleróticas que se ven en la hipertensión) (Díez-Tejedor, 2001).

2.1.3) Reperusión sanguínea

La restitución del flujo sanguíneo es capaz de evitar la progresión del infarto cuando tiene lugar antes de una hora (reperusión temprana), pues de no ser así, la cascada de mediadores de daño isquémico no sólo resulta imparable, sino que

además se ve potenciada por la RP (Wu, 2008). Igual que para el daño por isquemia, el daño por RP depende del tiempo que se haya mantenido la reducción del flujo sanguíneo cerebral (Stetler, 2014).

Mecanismos que participan en la producción del daño por RP:

- Producción de radicales libres como consecuencia de la normalización del aporte de oxígeno (Starke, 2013).
- Aumento de la producción de NO, acelerando la translocación del factor inductor de apoptosis de la mitocondria al núcleo acelerando el proceso de la muerte celular (Liu, 2015).
- Se favorece la diseminación de metabolitos producidos durante la isquemia como H^+ , agentes con acción vasoactiva, sustancias osmóticas y agua, que inducen la formación de edema (Taxin, 2014).
- Las sustancias quimiotácticas acumuladas durante la isquemia se distribuyen y pueden actuar sobre las células inflamatorias aportadas por el flujo sanguíneo (Chalouhi, 2012).

En concreto, durante la RP se podrían agravar o facilitar los fenómenos desencadenados por la isquemia, dependiendo primordialmente del tiempo, dentro de este contexto, es cuando se considera correcto hablar de daño por isquemia/RP (Li, 2015).

2.1.4) La cascada isquémica

Cuando se interrumpe el flujo sanguíneo cerebral se origina un foco de infarto en el que ocurre muerte celular inmediata por necrosis, rodeado de otra zona perinfarto denominada “penumbra isquémica”. Esta zona está sometida a isquemia menos intensa, gracias a la existencia de perfusión sanguínea colateral, aunque no es suficiente para el mantenimiento de la función celular normal, pero conserva una actividad metabólica parcial que preserva la integridad estructural celular un determinado tiempo (Taxin, 2014). El cese de flujo sanguíneo que se

produce a consecuencia de la isquemia cerebral, altera el equilibrio regulado entre los componentes de la unidad neurovascular la cual la componen neuronas, células de la glía (macroglía y microglía) y capilares sanguíneos (células endoteliales y pericitos) (Mergenthaler, 2012).

El desajuste entre la demanda metabólica y la reducción del aporte energético, ocasionan la alteración de los flujos iónicos de forma no uniforme, haciendo que disminuya la actividad eléctrica por los cambios en el potencial de membrana de la unidad neurovascular. Por lo mismo, el área de penumbra es heterogénea; no todas las células tienen la actividad eléctrica disminuida pero tampoco todas mantienen la homeostasis. En este escenario para un paciente, después del establecimiento de los síntomas, la intervención médica es pertinente en un periodo corto (ventana terapéutica), en el cual la restitución del flujo y/o la inhibición de los mediadores del daño cerebral isquémico evitarán la muerte en cadena de las células en riesgo. Sin embargo, si se sobrepasa éste tiempo, cualquier medida terapéutica para evitar la extensión del infarto no resultará (Mergenthaler, 2012).

2.1.4.1) Excitotoxicidad

Cuando surge la isquemia, inmediatamente el contenido energético de las células; ATP y fosfocreatina desciende, en consecuencia, cesan también todas las reacciones y los mecanismos dependientes de ATP, entre los que se encuentran las bombas intercambiadoras de iones como la de Sodio y Potasio. Con el descenso de ATP, la célula va perdiendo la capacidad de recaptura K^+ y sufre despolarizaciones isquémicas, que resultan en la despolarización anóxica con entrada masiva de Ca^{2+} y el consiguiente incremento de su concentración intracelular. Otros flujos relevantes son la entrada de Na^+ y agua con el posterior desarrollo de edema celular, expandiéndose y ocasionando aumento de la presión intracraneal y con ello, aumentando la gravedad del daño al tejido cerebral (Mergenthaler, 2012).

Como consecuencia de la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, le sigue la liberación masiva de neurotransmisores al espacio extracelular. De todos los neurotransmisores liberados, el glutamato es el que causa principalmente el daño por excitotoxicidad en las neuronas. Los efectos celulares del glutamato están mediados por receptores específicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxanol propionato (AMPA) y kainato (KA), y los efectos tóxicos son generados por la sobrecarga de Ca^{2+} al interior celular, ocasionando muerte celular isquémica (Traynelis, 2010). Por otra parte, la liberación de otros neurotransmisores como noradrenalina y adenosina, activan la adenilato ciclasa que está en la membrana de las células glía, haciendo que los niveles de AMPc y la permeabilidad de estas aumenten, captando Na^+ , Cl^- y agua. De esta forma, contribuyen al incremento del edema astrocítico perivascular y perineuronal (edema vasogénico y citotóxico respectivamente) (Taxin, 2014). Otro aspecto importante de la función de glutamato es su retirada desde la hendidura sináptica: durante la neurotransmisión normal, las moléculas del glutamato que no se han unido a sus receptores son retiradas de la hendidura sináptica por el transportador de glutamato, una proteína presente en la membrana de las neuronas y de los astrocitos. Con una carga energética normal, ambos tipos celulares recapturan y procesan el glutamato no unido a receptores, proceso que está acoplado al gradiente de concentración trans-membrana Na^+/K^+ . Como consecuencia del fallo energético durante la isquemia, este gradiente desaparece y la recaptura de glutamato cesa; por lo tanto, la acumulación de glutamato en el espacio sináptico aumenta y así, la sobrecarga de Ca^{2+} continúa (Mergenthaler, 2012).

2.1.4.2) Influjos de calcio en la isquemia

Otro mecanismo que contribuye al incremento de la concentración de calcio es la acidosis inducida por la isquemia. Ante la imposibilidad de metabolizar la glucosa por vía aeróbica normal, se activa su degradación por vía anaeróbica, generando ácido láctico que se acumula y disminuye el pH hasta valores de 6.5. Esta acidosis

desplaza el Ca^{2+} de su unión a proteínas intracelulares y hace aumentar su concentración intracelular (Stutzmann, 2011).

La disfunción del retículo endoplásmico es otro mecanismo responsable del incremento de la concentración de Ca^{2+} . En la célula intacta, los sistemas transportadores de Ca^{2+} aseguran los gradientes adecuados entre los compartimentos extracelular e intracelular por una parte, y entre el citosol y el retículo endoplásmico por otra. La despolarización anóxica por acumulación de K^+ inhibe la $\text{Mg}^+/\text{Ca}^{2+}$ ATPasa del retículo endoplásmico hasta el citosol, con el consiguiente incremento de la concentración de Ca^{2+} (Pivovarova, 2010).

El incremento de la concentración de Ca^{2+} ocupa un lugar central en la cascada isquémica porque activa numerosas enzimas catabólicas que contribuyen a la muerte celular [proteasas, lipasas y peroxidasas] (Arango, 2008; Pivovarova, 2010).

2.1.4.3) Estrés oxidativo

2.1.4.3.1) Radicales libres

Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno (ROS) están implicados en el funcionamiento normal de las células. En condiciones fisiológicas, los radicales libres y las ROS son eliminados por mecanismos enzimáticos; superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y NADPH reductasa, así como por mecanismos no enzimáticos; vitaminas E y C, glutatión, carotenos y Selenio (Kalogeris, 2014).

En comparación con otros órganos, el cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo (Montaner, 2007) por los siguientes motivos:

1. Las células del cerebro humano utilizan el 20% del oxígeno consumido por el organismo completo, aunque éste represente solo el 2% del peso corporal; esto indica que el cerebro genera muchos más radicales libres y ROS que otros órganos. A su vez, no posee una capacidad antioxidante protectora alta con

respecto a otros órganos donde se expresa una cantidad considerable de enzimas antioxidantes.

2. Varias regiones cerebrales contienen altas concentraciones de hierro, con lo que se cataliza la generación de radicales libres.

3. El cerebro es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, los cuales constituyen dianas para la peroxidación lipídica.

Tras la isquemia cerebral, y especialmente tras la RP, la producción de radicales libres sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes endógenos y se activan las vías de señalización que conducen a la muerte celular (Kalogeris, 2014).

2.1.4.3.2) Óxido nítrico

El óxido nítrico es un mensajero multifuncional que tiene un importante papel en la modulación de diferentes funciones del sistema nervioso central. Se sintetiza en muchos tipos celulares a partir de L-arginina (figura 2) por una familia de tres isoenzimas denominadas óxido nítrico sintetasas (NOS): la neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Las isoformas nNOS y eNOS se expresan constitutivamente en las neuronas y en el endotelio, respectivamente, y su actividad está regulada por el Ca^{2+} , aumentando su actividad con el influjo de Ca^{2+} debido a la isquemia. Por su parte, la isoforma iNOS se expresa en la isquemia como respuesta a la influencia de determinados mediadores de la inflamación y se regula principalmente a nivel transcripcional siendo independiente de Ca^{2+} . Esta isoforma se ha identificado en varias poblaciones de células cerebrales, entre las que se encuentran las células gliales, vasculares (músculo liso y endotelio), neutrófilos infiltrados en el tejido cerebral, neuronas corticales y cerebelares, entre otras (Terpolilli, 2012; Liu, 2015).

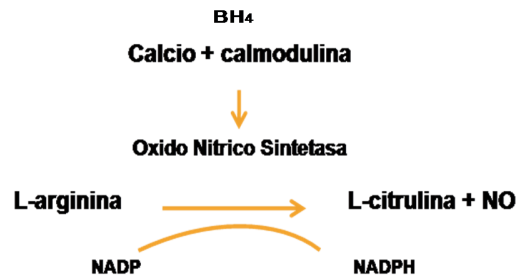


Figura 1. Síntesis de óxido nítrico. La óxido nítrico sintetasa, neuronal y epitelial son las isoformas dependientes de calcio, mientras que la óxido nítrico sintetasa inducible es independiente de Ca^{2+} . Modificada de Diez Tejedor, 2001.

De esta manera la isquemia causa la sobreproducción de óxido nítrico en el cerebro como consecuencia de la sobre activación de las tres isoformas de la NOS. La participación del óxido nítrico en la fisiopatología de la isquemia cerebral aún no es clara, ya que parece tener efectos opuestos: mientras que el óxido nítrico resultante de la actividad de la eNOS es beneficioso, el óxido nítrico producido por las actividades de la nNOS y la iNOS es nocivo. En cuanto a los efectos beneficiosos del NO, se ha visto que participa, de manera directa, en la regulación hemodinámica local a través de su efecto antiagregante y vasodilatador, los cuales protegen al tejido cerebral y mantienen su adecuada perfusión. Por el contrario, los efectos tóxicos del NO están relacionados con los siguientes mecanismos:

1) Formación del peroxinitrito (ONOO^-). Este radical se genera mediante la reacción del NO con el anión superóxido (O_2^-). Cuando el NO se produce en grandes cantidades reacciona más rápidamente con el O_2^- que con la enzima detoxificadora, superóxido dismutasa, dando lugar a la formación de ONOO^- , éste es responsable de la peroxidación lipídica, el daño a proteínas por nitración de tirosinas y el daño al DNA (Jung, 2009). Si este último es lo suficientemente severo, la activación de la enzima de reparación nuclear, la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), provoca una disminución masiva de las reservas energéticas de la célula y, además, estimula la síntesis de factores proinflamatorios a través del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB). El ONOO^- , al igual que el NO,

también es capaz de inducir la liberación de neurotransmisores agravando el daño (Terpolilli, 2012).

2) Inhibición enzimática. Parte del efecto deletéreo del NO se desarrolla porque inhibe enzimas tan fundamentales como la glutatión peroxidasa o a la citocromo C oxidasa mitocondrial. Pero la acción deletérea del NO puede darse también a través de otros mecanismos como la nitrosilación de enzimas como la fosfocinasa C y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o mediante la interacción con el hierro asociado con enzimas presentes en grupos hemo o no hemo, como el citocromo P450. También son nitrosiladas enzimas localizadas en la vía apoptótica, como p21-RAS en las células T humanas, y algunos miembros de la familia de las caspasas, nitrosiladas en el sitio activo de la enzima (Terpolilli, 2012).

3. Intensificación de la excitotoxicidad. El NO modula la fusión de vesículas a la membrana y libera neurotransmisores como el glutamato. Contribuye, así, al daño por excitotoxicidad (Liu, 2015).

2.1.4.4) Señalización celular en la isquemia cerebral

A consecuencia del estrés oxidativo, determinadas vías de señalización intracelular se activan (Busija, 2014). En éstas intervienen diferentes mensajeros secundarios que se ocupan de transmitir las señales extracelulares al núcleo. Entre estos mensajeros se encuentran las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa B (PKB, también denominada Akt). A su vez, estas cinasas inducen la expresión de proto-oncogenes, los denominados genes de expresión inmediata (IEGs) y la subsiguiente formación de determinados factores de transcripción que regulan una gran variedad de respuestas génicas y que son responsables de la degeneración o bien de la supervivencia neuronal secundaria a la isquemia (Jie, 2015) Algunos IEGs, cuya expresión se ve incrementada durante la isquemia, son: c-fos, c-jun, jun-B y jun-D, jun D, krox-20, la sub unidad alfa de la PK-II y zif268. Los productos de muchos de estos proto-oncogenes, a su vez, constituyen factores

de transcripción para otros genes estructurales. Tal es el caso de las proteínas Fos y Jun que se dimerizan para constituir el factor de transcripción AP-1. Ello conduce a una segunda oleada, más tardía, de síntesis de proteínas que participan en procesos de plasticidad [entre 500 y 1000 genes] (Montaner, 2007).

La familia de las MAPKs incluye a las cinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y a las cinasas de proteínas activadas por estrés (SAPK), p38 y la cinasa c-jun N-terminal (JNK/SAPK). Ante diferentes estímulos (factores de crecimiento, estrés oxidativo, incremento de la concentración de Ca^{2+} o estimulación de los receptores de glutamato) ERK se activa y media la señalización desde la sinapsis hasta el núcleo. En cuanto a las MAPKs activadas por estrés, p38 y JNK/SAPK, funcionan principalmente como mediadoras de estrés celular fosforilando a enzimas intracelulares, factores de transcripción y proteínas citosólicas involucradas en la supervivencia celular, y activando la producción de citocinas inflamatorias y la apoptosis (Jie, 2015).

Este proceso es el resultado final de la activación de diferentes factores de transcripción nuclear, muchos de los cuales contribuyen a la supervivencia y proliferación celular. Los factores de crecimiento pueden iniciar la señalización siguiendo la ruta PI3K/Akt, la ruta Ras/MAPK, o ambas. La activación de los receptores de glutamato puede dar lugar a la producción y liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual puede señalizar a través de las rutas PI3K/Akt o Ras/MAPK. Los efectos pro-supervivencia de las neurotrofinas (BDNF y factor de crecimiento nervioso [NGF]) así como de otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento semejante a la insulina-1 (IGF-1), se ejecutan, al menos en parte, a través de la ruta PI3K/Akt. Las neurotrofinas y otros factores de crecimiento pueden promover también la supervivencia a través de la ruta Ras/MAPK (Montaner, 2007; Burgula, 2010; Liaw, 2014).

2.1.5) Muerte celular

2.1.5.1) Apoptosis

La apoptosis es responsable en un 50% de la muerte celular por isquemia (Arango, 2004). La apoptosis está mediada por varias vías desencadenando cascadas proteolíticas intracelulares donde la célula muere sin dañar las células adyacentes, la célula se encoge y se condensa, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y el DNA se fragmenta. La superficie celular se altera, por ejemplo, la fosfatidilserina se expone al exterior de la célula, presentando propiedades que provocan que la célula que inició la apoptosis sea fagocitada rápidamente por una célula adyacente o por un macrófago antes de que su contenido se libere (Zille, 2012).

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis en la isquemia depende de una familia de proteasas; las caspasa iniciadoras 2, 8, 9 y 10 y las caspasa efectoras 3, 6 y 7 que contienen una cisteína en su sitio activo y que escinden sus proteínas diana sobre residuos específicos de ácido aspártico. Las caspasa, que se sintetizan como procaspasa, se activan por la escisión de residuos de ácido aspártico por otras caspasa. Una vez activadas, las caspasa cortan y activan otras procaspasa, generando una cascada proteolítica amplificadora. Como resultado de esta vía, se cortan proteínas clave de la célula, como las láminas nucleares, provocando su rotura irreversible. También separan a la proteína que mantiene inhibida a la DNAsa haciendo que se libere, active y fragmente el DNA del núcleo celular. La cascada de proteasas es destructiva, amplificante e irreversible, de modo que una vez que la célula ha alcanzado un punto crítico de la vía de destrucción, ya no puede volver atrás (Zille, 2012).

La disfunción mitocondrial genera señales intracelulares que activan la apoptosis. Las mitocondrias, son inducidas a liberar el citocromo c al citosol, por el exceso de calcio debido a la isquemia. Ahí se une y activa a la proteína adaptadora Apaf-1 lo que sirve de señal para la activación de otras caspasa como la 9, que concluye en la formación de la caspasa 3. La caspasa 3 activa a las enzimas responsables de

la degradación del DNA (endonucleasas) y a la enzima poli-ADP-Ribosa Polimerasa (PARP) entre otras, provocando el rompimiento del DNA y eventualmente, la muerte celular. Las señales extracelulares (por ejemplo; el aumento de calcio por la isquemia) involucran la activación de una superfamilia de receptores que activan dominios de muerte y reclutan a las caspasas, como el ligando Fas que cuando se une a su receptor de superficie inicia la secuencia de señales que conducen a la muerte de la célula diana. Los receptores de Fas unidos a su ligando se agregan y reclutan a proteínas adaptadoras intracelulares que se unen y agregan moléculas de procaspasa-8, las cuales se escinden y se activan la una a la otra, estas a su vez activan a la caspasa 7 provocando la activación de las DNAsas (Zille, 2012).

Las proteínas de la familia Bcl-2 y las proteínas IAP son los principales reguladores intracelulares de la apoptosis. Por una parte Bcl-2 o Bcl-X_L inhiben la apoptosis bloqueando parcialmente la liberación del citocromo c de las mitocondrias. Sin embargo, otros miembros de la familia Bcl-2, como Bad, actúan uniéndose e inactivando los inhibidores de la muerte celular, y otros como Bax y Bak, estimulan la liberación del citocromo c de la mitocondria cuando son activados por Bid (Engel, 2011). Por otra parte, las moléculas de la familia IAP, se encargan de inhibir la apoptosis de dos formas, una es uniéndose a las procaspasas evitando su activación, y la otra es uniéndose directamente a las caspasas ya activadas. Cuando la mitocondria libera el citocromo c, también libera una proteína que bloquea las IAP, asegurando la muerte celular (Zille, 2012).

2.1.5.2) Necrosis

La necrosis en la isquemia cerebral resulta del fracaso energético agudo, con pérdida de la morfología celular y, finalmente, la lisis celular liberando todo su contenido sobre las células. Esta falla energética a su vez puede estar influenciada por la inhibición en la respiración mitocondrial, la activación de PARP o la inhibición glicolítica, eventos que se encuentran íntimamente asociados con la concentración del óxido nítrico (Pacher, 2007; Arango, 2004; Zille, 2012).

2.1.6) Expresión genética en la isquemia cerebral

Se han realizado una gran cantidad de estudios en diferentes modelos experimentales para analizar los cambios en la expresión genética durante los procesos de hipoxia e isquemia en los diferentes tipos celulares del sistema nervioso tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha observado que durante el proceso isquémico se transcriben distintos grupos de genes que incluyen: Genes de expresión temprana (c-fos, c-jun, jun-B, Jun-D y zif268), estos codifican para componentes del factor de transcripción AP-1 y en consecuencia disparan la expresión de otros genes (Yokota, 2001; Montaner, 2007). Otros genes inducidos por la isquemia incluyen los que codifican para proteínas de choque térmico, citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1, y moléculas de adhesión celular (selectinas como la P y E, ICAM-1 y β 2-integrinas, LFA-1 y Mac-1), la inducción de genes de las enzimas iNOS y COX-2, de productos relacionados con la apoptosis y de genes relacionados con factores de crecimiento (Arango, 2004). En estudios de perfiles de expresión genética con diferentes técnicas como microarreglos, se han encontrado genes que cambian en condiciones de isquemia y RP, involucrados en la fisiología celular adecuada como genes del metabolismo intermediario y la energía celular, con la muerte celular apoptótica, con el daño al DNA y al estrés oxidativo, de la respuesta inmune e inflamación, de reparación como genes involucrados en la angiogénesis y remodelación vascular, así como genes involucrados en el desarrollo embrionario, neurogénesis y neuroplasticidad (Buga, 2012).

Por otro lado, en un trabajo previo en el laboratorio utilizando la metodología del muestreo diferencial de genes, se observó en el hipocampo, con 15 minutos de ICF sin RP, un aumento en la expresión de los mRNAs de la catalasa, la glicoproteína epitelial EGP-314, la subunidad 1 de la citocromo oxidasa, la proteína ribosomal L31 y la ceruloplasmina. En este trabajo, la expresión de EGP-314 en el hipocampo se corroboró por medio de RT-PCR, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, donde el mRNA y la proteína se observó en las células piramidales de dicha región. En este mismo reporte, por medio de experimentos de TUNEL y fragmentación de

DNA (DNA en escalera por LM-PCR), también se observó el inicio de la apoptosis en el hipocampo como consecuencia de la isquemia (Ortiz, 2005).

2.1.7) Proteómica e isquemia cerebral

El análisis proteómico permite conocer, el cambio de expresión de las proteínas dependiendo de las circunstancias del medio ambiente y, por lo tanto, del estado fisiológico o patológico en que se encuentre el organismo por medio de la comparación entre ambos estados. El análisis de los proteomas sirve para proponer modelos de interacción molecular que expliquen la biogénesis de padecimientos, también se utilizan como marcadores para el diagnóstico y predicción de enfermedades, así como blancos para drogas o blancos terapéuticos (Buga, 2012). Recientemente se han realizado estudios proteómicos enfocados a analizar las alteraciones en la expresión de proteínas en diversas enfermedades humanas. La técnica del análisis proteómico se ha aplicado en estudios de isquemia en diferentes órganos como corazón, riñón, hígado y cerebro. Se han reportado estudios de tolerancia isquémica, neuroprotección, hipoxia neonatal, de cultivos neuronales, líquido cefalorraquídeo y de expresión de proteínas específicas (Ning, 2012). Sin embargo, el análisis proteómico en la ICF temprana está en sus inicios.

2.1.8) Fisiopatología de las células gliales en la isquemia cerebral

2.1.8.1) Activación de la macroglía

La ICF ocasiona una respuesta de activación de las células glía [macroglía (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias) y microglía], no solo en el sector focal y el área de penumbra, sino también en sectores alejados del foco isquémico [diasquidisis] (Nedergaard, 2005). El término gliosis, o reacción glial, se usa para indicar cambios estructurales y fisiológicos de los astrocitos y la microglía como respuesta a lesiones traumáticas, isquémicas o infecciosas en el sistema nervioso. Dichos cambios pueden ser temporales o desencadenar reorganizaciones estructurales definitivas, en cuyo caso se usa el término cicatriz

glial. Sin embargo, la cicatriz glial no se forma exclusivamente a expensas de los astrocitos, sino que en su conformación participan otros tipos de células, como fibroblastos y células epiteliales. La cicatriz glial es una nueva barrera que aísla al sistema nervioso del entorno y permite el restablecimiento del ambiente neuronal (Arango, 2004).

Los astrocitos reactivos se caracterizan morfológicamente por una hipertrofia y un incremento en el número y extensión de sus prolongaciones. Se pueden observar a partir de las primeras seis horas de la lesión isquémica. El incremento de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), que corresponde a un tipo de filamento intermedio específico de los astrocitos, se ha establecido como uno de los marcadores más sensibles para observar la reacción astrocitaria. La activación de los astrocitos en la isquemia puede ser consecuencia directa del fracaso energético. El incremento de glutamato, ATP y potasio extracelular son factores que, en conjunto o independientemente, desencadenan la reactividad de los astrocitos en los sectores adyacentes a la lesión. Más tardíamente intervienen la liberación de citocinas y los factores de crecimiento neuronal. La depresión propagada o “spreading depression” se refiere al aumento de potasio extracelular y a la activación astrocítica que sirve como amortiguadora, y se asocia a la reactividad de astrocitos en sectores alejados del foco isquémico (Ritzel, 2013).

Los astrocitos secretan a la matriz extracelular sustancias con capacidad de fomentar o inhibir el crecimiento axonal. De esta manera, hacen posible el redireccionamiento del crecimiento del cono axonal y la reparación de las lesiones. La tenacina y la janusina son proteínas de la matriz extracelular que inhiben el avance del axón en crecimiento; los proteoglicanos, especialmente el sulfato de heparina, promueven el avance axonal, mientras que el condroitinsulfato y el queratán sulfato interfieren con el desplazamiento axonal. Los proteoglicanos son secretados por los astrocitos a la matriz extracelular, donde interactúan con la laminina para producir su efecto (Arango, 2004).

Durante la lesión isquémica, los astrocitos incrementan la síntesis y la liberación de sustancias neurotróficas, como el factor de crecimiento neuronal, el factor de crecimiento fibroblástico y la neurotrofina 3 e incrementan la esteroidogénesis. La producción de estos factores por los astrocitos es mayor en cuanto más cerca se encuentren de la lesión focal. Como se sabe, estos factores fomentan la supervivencia de las neuronas, de los propios astrocitos y de la microglía (Ritzel, 2013).

Específicamente los astrocitos, se encargan de amortiguar las tres alteraciones principales del medio extracelular inducidas por isquemia: la elevación del potasio, del glutamato y la acidosis.

a) La elevación de potasio que impide una transmisión adecuada de los potenciales de acción.

Los astrocitos son muy permeables a este ión, debido a la presencia de multitud de canales de potasio en su membrana, sobre todo en los pies perivasculares. Se ha observado que la elevación de la concentración extracelular de potasio, durante la generación del potencial de acción de una neurona, se asocia a una despolarización de las células gliales adyacentes, debida a la entrada masiva de potasio en estas células: es lo que se denomina acoplamiento eléctrico-iónico neurona-glía (Nedergaard, 2005).

Por este mecanismo la célula glial capta el exceso de potasio extracelular, que es fácilmente eliminado a nivel de los pies perivasculares, en el polo opuesto de la célula. Además existe un acoplamiento eléctrico-metabólico neurona-glía, ya que la captación de potasio y la despolarización del astrocito se manifiestan metabólicamente por una mayor captación de glucosa y por la síntesis de glucógeno y aminoácidos en estas células. Se cree que este acoplamiento es el modo por el que la neurona comunica a las células gliales la pérdida de neurotransmisores sufrida con la transmisión del potencial de acción, demandando así la síntesis y cesión glial de sus precursores metabólicos (Pascual, 2000).

b) La elevación hasta niveles neurotóxicos del glutamato que desencadena la muerte neuronal (Traynelis, 2010).

Los astrocitos poseen sistemas de recaptación de alta afinidad para algunos de estos neurotransmisores, como el glutamato, la alanina o el GABA, con la presencia de transportadores específicos en su membrana. Por otro lado, los astrocitos son los únicos que disponen de la enzima glutamina sintetasa, que transforma el glutamato en glutamina, un aminoácido sin actividad neurotransmisora (Traynelis, 2010).

Los astrocitos captan el glutamato liberado en la hendidura sináptica con el potencial de acción y lo transforman en glutamina que es cedida a las neuronas para su nueva transformación en glutamato. Los propósitos fundamentales del ciclo del glutamato son mantener una baja concentración de glutamato en el espacio extracelular sináptico, para evitar una activación excesiva de los receptores de glutamato postsinápticos, que tendría efectos neurotóxicos y además permitir una reposición neuronal del glutamato liberado en la sinapsis, mediante la transferencia de un metabolito glial inactivo sinápticamente, como es la glutamina (Traynelis, 2010).

c) La acidosis. Se ha comprobado *in vitro*, sobre cultivos primarios de células gliales aisladas, que los astrocitos son células muy resistentes a la acidosis metabólica, pudiendo permanecer viables en medios con valores de pH tan bajos como cinco o seis. Esta propiedad, que no presentan las neuronas, se debe principalmente a la presencia en los astrocitos de la enzima anhidrasa carbónica (un marcador de las células gliales, encargado de metabolizar el exceso de ácido carbónico), y a su dotación de anti-transportadores H^+/Na^+ de membrana, lo que les permite intercambiar con facilidad el exceso intracelular de protones con iones sodio extracelulares. Cabe señalar que en este proceso, el gradiente osmótico del sodio determina la entrada de agua en el astrocito, incrementándose su volumen celular. El exceso de agua puede eliminarse secundariamente mediante la apertura de canales iónicos de membrana. Se ha observado que

fisiológicamente los astrocitos sufren periodos recurrentes de “hinchamiento” y “deshinchamiento” celular, que pueden estar correlacionados con los procesos de homeostasis iónica y de pH del espacio extracelular (Pascual, 2000).

La hiperactividad de estos mecanismos de compensación durante la isquemia origina un edema citotóxico glial. A pesar de ello, los astrocitos resisten mejor el daño isquémico que las neuronas permaneciendo viables y metabólicamente activos durante un periodo más prolongado. Las interacciones metabólicas entre neuronas y células gliales en el foco isquémico resultan esenciales en la supervivencia neuronal (Taxin, 2014).

Se ha comprobado que las neuronas aisladas en cultivo son muy sensibles a la hipoxia, produciéndose con rapidez su muerte ante una privación brusca de oxígeno. Sin embargo, los astrocitos en cultivo son muy resistentes tanto a la hipoxia como a la privación aislada de glucosa, por lo que deben someterse a la privación conjunta de ambos sustratos energéticos para poder observar su muerte. Por otro lado, la mortalidad de una población de células gliales sometidas a simulación de isquemia *in vitro*, se produce mucho más tardíamente que la neuronal. Este comportamiento parece ser debido a la mayor resistencia metabólica de las células gliales, por su capacidad de mantener en el tiempo un metabolismo anaerobio y de amortiguar, con sus anti-transportadores H^+/Na^+ de membrana, la acidosis metabólicamente resultante (Pascual, 2000).

En conclusión, se puede observar que hay múltiples estrategias mediante las cuales la macroglía, especialmente los astrocitos, enfrentan la lesión isquémica y se preparan para facilitar la reparación del tejido. En condiciones normales, se evidencia un sistema neuroprotector ágil, que interviene en los ámbitos molecular, celular e histológico (Arango, 2004; Ritzel, 2013).

2.1.8.2) Activación de la microglía

La microglía es un grupo de células de origen mesodérmico, derivadas de los monocitos sanguíneos que emigraron en fases precoces del desarrollo embriológico hacia el sistema nervioso (Nedergaard, 2005).

Durante la isquemia cerebral, las células microgliales se activan más rápidamente que los astrocitos y participan en procesos de inflamación y reparación del sistema nervioso adulto. Tienen capacidad fagocítica y durante su actividad liberan diferentes tipos de sustancias, como la enzima elastasa, algunos radicales libres oxidativos y citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias, como las interleucinas 1, 3, 5 y 6, el factor de crecimiento neuronal, el factor de transformación y crecimiento y TNF- α (Arango, 2004; Famakin, 2014).

El papel de la microglía en las lesiones isquémicas del sistema nervioso depende del estado y grado de resolución de la lesión isquémica. Durante los primeros días, la microglía puede facilitar la muerte y la destrucción de las células nerviosas por la liberación de agentes como el TNF α , el NO, el H₂O₂ y los aniones superóxido; sin embargo, más tardíamente, la microglía puede fomentar la supervivencia de las células y la reparación de los tejidos por la síntesis de factores de crecimiento como las IL1 e IL3 y los factores de crecimiento celular, que estimulan la astrogliosis y la supervivencia neuronal (Kim, 2014).

La primera alteración morfológica que puede detectarse en un foco de isquemia cerebral es el edema citotóxico glial, que aparece en pocos minutos y va aumentando progresivamente hasta las 24 horas de evolución del daño isquémico. Esta respuesta glial es diferente a la observada en neuronas, que sufren una necrosis progresiva desde las tres horas del comienzo de la isquemia (Zille, 2012). Como el mantenimiento del edema depende de la actividad de los diversos mecanismos de homeostasis extracelular glial, se puede deducir que las células gliales permanecen viables y funcionalmente activas durante todo el tiempo de la progresión del daño isquémico. No sufren necrosis de forma paralela a la población neuronal y por lo tanto deben disponer de una mayor capacidad

para obtener ATP en condiciones anaerobias a partir de sustratos energéticos alternativos a la glucosa (Laureys, 2014).

2.1.9) Proteínas con cambios en el nivel de expresión bajo condiciones de isquemia cerebral focal y reperfusión sanguínea tempranas en la corteza parietal de rata

En un estudio previo en el laboratorio se analizó por medio de la técnica de electroforesis en dos dimensiones el perfil de proteínas del cuerpo estriado, el hipocampo y la CP de la rata bajo condiciones isquémicas tempranas y de RP después de la isquemia. Se encontró una proteína que cambió en el cuerpo estriado y en el hipocampo con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP. Sin embargo, en la CP cambiaron 5 proteínas bajo estas condiciones, de las cuales se seleccionaron tres para un estudio con mayor profundidad: 14-3-3 γ , PEBP1 y NDKA (Sánchez, 2010).

2.1.9.1) Proteína 14-3-3 γ

La familia de las proteínas 14-3-3 está altamente conservada y se expresan en todas las células eucariontes. En los mamíferos se conocen 7 isoformas [α/β , γ , δ/ζ , ϵ , η , τ y σ , donde α y δ son las formas fosforiladas de β y ζ , respectivamente] y cada una de estas está codificada por un gen independiente (Qiao, 2014). Todas ellas se expresan en tejidos cerebrales, pero la isoforma γ , es la más abundante en el cerebro (Chen, 2005).

A través de la interacción proteína-proteína dependiente de fosforilación, las proteínas 14-3-3 regulan otras proteínas secuestrándolas en el citoplasma y regulando así varios procesos celulares, incluyendo vías metabólicas, regulación redox, transcripción, síntesis de proteínas, plegamiento de proteínas y degradación, ciclo celular, organización del citoesqueleto y tráfico celular. La unión dependiente de la fosforilación con 14-3-3 puede alterar la localización subcelular, estabilidad, estado de fosforilación, actividad y las interacciones moleculares de varias proteínas blanco, de este modo se implica a las proteínas

14-3-3 como reguladoras clave en diversas vías intracelulares de transducción de señales (Toyo-oka, 2014).

En el caso de la isquemia cerebral tardía, se ha observado que sólo la 14-3-3 γ aumenta su expresión, mientras que los otros miembros de la familia de estas proteínas no. Esto no solo ocurre en neuronas, sino que también en los astrocitos (Chen, 2005). Una de sus funciones fundamentales en la isquemia cerebral es antagonizar las señales apoptóticas, a través del secuestro en el citoplasma de las proteínas proapoptóticas principalmente a Bad (Liaw, 2014).

La evidencia presente apoya la idea de que la 14-3-3 γ sirve como punto integrador clave de estrés y de señales de supervivencia, aumentando su expresión en la ICF con y sin RP sanguínea, contribuyendo, por lo tanto, a las decisiones de vida y muerte celular en tiempos tempranos de isquemia/RP.

2.1.9.2) Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1 (PEBP1)

La PEBP1, también conocida como proteína inhibidora de la Raf cinasa (RKIP), es una proteína altamente conservada y expresada en distintos tejidos, sus homólogos se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes y se han identificado alrededor de 400 miembros de ésta familia. Ésta está involucrada en procesos de crecimiento, transformación y diferenciación celular, es precursora del péptido neuroestimulador colinérgico (HCNP) en el cerebro, el cual juega un papel importante en la estimulación indirecta de la producción y secreción de acetilcolina, estimulando la secreción de la colina acetiltransferasa (produce acetilcolina). La disminución de HCNP se ha asociado a distintos tipos de demencias (Burgula 2010). En una célula normal, la PEBP1 regula la proliferación celular por su unión con la Raf cinasa 1 (evitando su fosforilación para mantenerla inactiva) la cual, cuando se activa, fosforila a MEK y ésta, a su vez, a ERK-1 (vía Raf1-MEK-ERK1). Se ha observado que PEBP1 disminuye su expresión bajo condiciones de estrés en el cerebro, en la enfermedad de Alzheimer y en traumatismos cerebrales (Tavel, 2012). Bajo condiciones de hipoxia tardía en ratas, PEBP1 se disocia de Raf1 y activa la vía Raf1/MEK/ERK activando cascadas

de señalización intracelular que inducen la expresión de proteínas de estrés, reparadoras y amortiguadoras del daño isquémico (Al-Mulla, 2013).

2.1.9.3) Nucleósido difosfato cinasa A (NDKA)

Las proteínas nucleósido difosfato cinasas son enzimas hexaméricas que pertenecen a una familia multifuncional de proteínas, altamente conservadas entre 16 y 20 kDa, localizadas en distintos compartimentos celulares (Karsani, 2014) y catalizan la conversión de nucleósidos difosfatos a nucleósidos trifosfatos para formar pozas intracelulares de GTP a partir de GDP y ATP. Las proteínas de esta familia se clasifican en dos grupos de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y a su actividad nucleósido difosfato cinasa (NDPK). El grupo I (proteínas Nme1-Nme4) tiene un dominio en particular bien conservado y también su sitio activo, mientras que el grupo II (proteínas nme5-nme10) muestra dominios altamente divergentes y todas ellas, excepto la Nme6, carecen de actividad NDPK. Las NDPKs tienen distintas funciones y regulan una diversa cantidad de eventos celulares como el crecimiento y la diferenciación celular. En condiciones de estrés, donde el ATP es disminuido, como en el caso de la isquemia, forman ATP a partir de ADP y GTP. También pueden catalizar la fosforilación directa del GDP unido a una gran variedad de proteínas G reguladoras, resultando en la activación directa de proteínas de unión a GTP (Muimo, 2006; Morin, 2008).

Algunos investigadores han considerado que un organismo recientemente muerto puede ser considerado como un modelo de isquemia (Allard, 2005). En este contexto, se ha visto que la nucleósido difosfato cinasa A aumenta en el fluido cerebroespinal (líquido cefalorraquídeo) después de 3h de la muerte de un individuo. Esto es comparable a lo que ocurre tras un accidente cerebrovascular (*ictus*), donde la NDKA también aumenta en el fluido cerebroespinal y se considera un marcador específico de la enfermedad en el plasma sanguíneo, con una especificidad de 90% (Finehout, 2006; Whiteley, 2008). Se han propuesto varias hipótesis con respecto a los mecanismos por los cuales la NDKA puede obtener acceso a la sangre y aumentar su concentración en el plasma de pacientes

con *ictus*; ya sea por la filtración directa al torrente circulatorio por la ruptura de la barrera hematoencefálica o pasando al líquido cefalorraquídeo filtrándose por las vellosidades aracnoideas y después al torrente circulatorio (Allard, 2005; Marginean, 2011).

3) Planteamiento del problema

3.1) Justificación

En la ICF se desencadena una cascada de eventos moleculares que aún no se han descrito, los cuales están relacionados con la producción del daño y con la adaptación y/o recuperación del tejido isquémico. Al analizar la participación de las proteínas dentro de la cascada isquémica en la unidad neurovascular (neuronas, glía y vasos sanguíneos), se podrían sugerir alternativas o posibles dianas terapéuticas en tiempos tempranos de isquemia donde aún es pertinente un tratamiento para evitar la expansión del daño y con ello la muerte celular (infarto).

El tratamiento de la isquemia presenta una ventana de tiempo corta y opciones terapéuticas limitadas. El diagnóstico oportuno y acertado de cualquier tipo de *ictus*, es fundamental para evitar secuelas de daño permanentes en el paciente.

Se han probado una cantidad considerable de fármacos para el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular, dirigidos a controlar el efecto de la cascada isquémica desencadenada después de ésta, pero ninguno ha sido lo suficientemente eficaz, repercutiendo en costos elevados para la industria farmacéutica; la cual realiza una inversión monetaria muy elevada en la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento de la isquemia cerebral en humanos (Vivien, 2011).

Actualmente el único tratamiento aprobado para el control de infarto isquémico, es el que consta de activadores de plasminógeno tisular (rt-PA), un agente trombolítico que limita por sí sólo el daño isquémico ya que se une al plasminógeno, formando un complejo que se une a la fibrina y la degrada totalmente produciendo plasmina, lisando de esta forma el coágulo, lo que permite la recanalización de la arteria, restaurando el flujo sanguíneo. Sin embargo, el empleo de dicho tratamiento está limitado a las primeras tres horas después de la oclusión “ventana terapéutica” (Del Zoppo, 2013).

Se han realizado numerosos estudios tanto de investigación básica como clínicos, con el fin de establecer estrategias precisas que permitan una acción pronta y efectiva para controlar y frenar la reacción en cadena que conlleva a la muerte del tejido isquémico cerebral. Cada estudio en el proceso de la cascada isquémica, constituye una posibilidad potencial de intervención terapéutica, la cual está dirigida a limitar el daño neuronal en diferentes puntos; bloqueando la entrada de calcio a la célula (agentes estabilizadores de calcio), inhibiendo la liberación de glutamato o antagonizando su acción post-sináptica, neutralizando efectos nocivos de los radicales libres (administrando antioxidantes), modulando la respuesta inflamatoria, modificando la síntesis de óxido nítrico, estimulando la actividad de la adenosina, bloqueando la apoptosis (inhibidores de caspasas), activando NF κ β o estimulando la reparación neuronal (Stutzmann, 2011; Zille, 2012).

En nuestro trabajo previo, donde se analizó el perfil de proteínas de la CP por medio de la técnica de electroforesis bidimensional, se encontraron cinco proteínas con cambios en su concentración con condiciones de isquemia y RP tempranas, de las cuales se seleccionaron tres para este proyecto; la 14-3-3 γ , la PEBP1 y la NDKA para un análisis más específico.

3.2) Hipótesis

Durante la ICF y la ICF/RP tempranas, las proteínas 14-3-3 γ , PEBP1 y NDKA modifican su comportamiento en la CP de la rata en respuesta a la isquemia.

3.3) Objetivo general

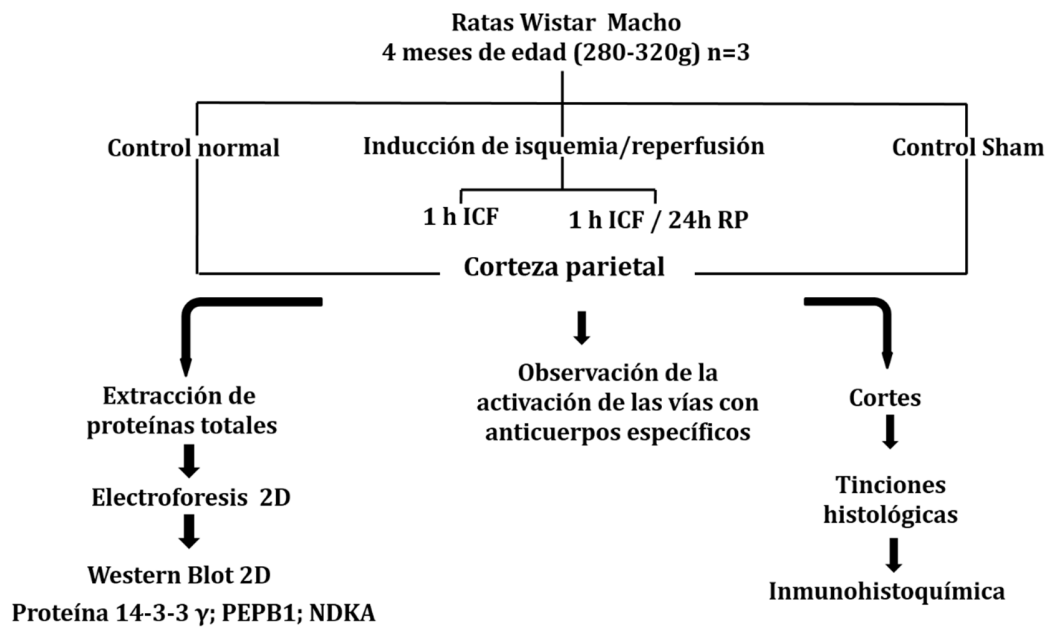
Analizar la dinámica de las proteínas 14-3-3 γ , PEBP1 y NDKA con ICF y con ICF/RP tempranas en la unidad neurovascular de la CP de la rata.

3.3.1) Objetivos particulares

- Analizar la expresión de las tres proteínas en la CP de la rata con 1h de ICF y con ICF/RP.
- Observar la localización de las proteínas en la unidad neurovascular de la CP de la rata con 1h de ICF y con ICF/RP.
- Analizar la activación de las vías de señalización celular que podrían estar involucradas con las tres proteínas y sus posibles interacciones con otras proteínas con ICF y con ICF/RP en la CP de la rata.

3.4) Metodología

3.4.1) Estrategia experimental



3.4.2) Materiales y métodos

3.4.3) Inducción de isquemia cerebral focal

Se seleccionaron ratas macho de la cepa Wistar entre 280 y 320 g de peso con 4 meses de edad, a las cuales se les indujo isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo ocluyendo la arteria cerebral media (ACM) del lado derecho, mediante la introducción intraluminal de un hilo nylon monofilamento de 3-0, a través de la arteria carótida interna hasta ocluir la arteria cerebral media (Longa, 1989). Para el procedimiento, las ratas fueron preanestesiadas con una mezcla de isoflurano al 2% (Laboratorios PISA, S.A. de C.V., Guadalajara Jalisco, México) y oxígeno (v/v) con un equipo de anestesia Ohmeda Fluotec-3 (West Yorkshire, Inglaterra), colocándolas 5 minutos en una cámara cilíndrica conectada al equipo de anestesia. Una vez preanestesiadas se les fijó una mascarilla facial con cinta adhesiva (Micropore, Kendall, México). Las ratas se colocaron en posición de cúbito dorsal en la superficie de una tabla, bajo un microscopio quirúrgico (Olympus Optical Co. LTD, Tokio, Japón), se fijaron sus patas delanteras con cinta adhesiva y se les retiró el pelo de la región cervical anterior con una navaja de rasurar (Gillete). A las ratas se les practicó una incisión en la línea media en el manubrio del esternón, hacia la región del músculo *transverso mandibularis*. Se identificó el músculo esternohioideo y se siguió su borde lateral hasta encontrar el borde medial del esternocleidomastoideo y la aponeurosis cervical superficial en su hoja profunda, que se separó para exponer la arteria carótida común (ACC), la cual fue disecada hasta el asa del hipogloso. Se encontró la bifurcación de la ACC en la arteria carótida interna (ACI) y la arteria carótida externa (ACE). La ACE fue disecada identificando sus ramas tiroidea y occipital, las cuales fueron electrocoaguladas con una unidad electroquirúrgica (Martín Medizin-Technik, Tuttlingen Alemania) y seccionadas con unas tijeras para microcirugía y por último la ACE fue ligada distalmente con un hilo seda de 6-0, electrocoagulada y seccionada. Sobre la ACI fue identificada y ligada la rama pterigopalatina y en la región de la bifurcación de la ACC se colocó un clip transitorio sobre el muñón de la ACE para detener el flujo sanguíneo. En este lugar se realizó una pequeña

incisión longitudinal a modo de ojal donde se introdujo un hilo nylon monofilamento de 3-0 (Mactur, México) sostenido por una ligadura suave, para no dejar escapar flujo sanguíneo al retirar el clip transitorio. Posteriormente, el hilo nylon fue introducido en dirección de la ACI, aproximadamente 17mm a partir de la bifurcación, para llegar a la ACM y ocluirlo. Se formaron los grupos controles y experimentales todos con una n=3. Un grupo fue con 1h de ICF sin RP y otro con 1h ICF/RP (desbloqueando la arteria cerebral media y permitiendo que el flujo sanguíneo se restableciera). Se evaluó la aparición del daño neurológico por la isquemia experimentalmente inducida en la rata observando: movimiento espontáneo, flexión de la pata delantera derecha al levantar el animal por la cola, giros hacia la derecha, y capacidad de asirse a una cuerda (Capdeville, 1986).

Las ratas nombradas como control sham sólo fueron sometidas al procedimiento quirúrgico hasta la introducción del nylon monofilamento en la ACI, la cual no fue completa para no inducir la isquemia cerebral. Las ratas llamadas control normal, no tuvieron ningún tipo de manipulación.

El manejo de los animales fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" bajo la norma NOM-062-Z00-2001.

Al término de la inducción de ICF, se les retiró a las ratas la mascarilla facial de administración de anestesia y se colocaron en una campana para su recuperación. Transcurrido el tiempo, las ratas fueron sacrificadas una por una, con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital sódico (solución inyectable) para uso veterinario (laboratorios Aranda, Querétaro, México), las manipulaciones se hicieron en una zona estéril con un mechero. Se humedeció la cabeza de la rata con alcohol al 96%, para evitar contaminación con su mismo pelo y se realizó un corte longitudinal con una hoja de bisturí del No. 20, desde la altura de la nariz hasta el cuello para retirar la piel. Se inclinó la cabeza del animal y se realizó un corte transversal en el músculo del cuello en la base del cráneo, para descubrir la columna vertebral. Cuidadosamente se fue rompiendo el cráneo con unas pinzas

porta agujas, hasta dejar descubierto el encéfalo. Para extraer el encéfalo de la cavidad craneal, se introdujo la punta de las pinzas por la región frontal, y se levantó el cerebro sacándolo de la cavidad y se colocó en una caja de Petri estéril. Posteriormente, se realizó un corte entre el cerebro y el cerebelo para separarlos y otro corte longitudinal entre los hemisferios cerebrales para separarlos. Del hemisferio izquierdo de cada rata se tomó la CP. El fragmento del tejido (0.035 gr) fue seccionado y colocado dentro de un tubo para microcentrifuga tipo Eppendorf de 1.5 ml. Las muestras se congelaron y almacenaron a -70°C hasta su procesamiento para la extracción de las proteínas. Para el análisis histológico, otros grupos de ratas fueron perfundidos transcárdicamente con paraformaldehído al 4% en buffer PBS. Los cerebros fueron removidos de la cavidad craneal y se dividieron en tres partes (anterior, media y posterior) para evaluar el volumen de infarto del hemisferio izquierdo tiñendo con cloruro de tetrazolio (TTC); el cual es reducido por las deshidrogenasas del tejido cerebral, precipitándose como una sal de formazán dando la coloración roja al tejido. Debido a la disminución del ATP en la zona isquémica, las deshidrogenasas detienen su actividad y el tejido permanece blanco haciendo evidente la zona dañada por la isquemia (Sun, 2012). Por otro lado, se realizaron cortes coronales para deshidratar los tejidos con alcohol y embeberlos con parafina en un procesador de tejidos automáticos (Histokinette, 200; Reichert-Jung, American Optical, Buffalo, New York) y se tiñeron las secciones de 4 µm con hematoxilina y eosina (Bratthauer, 1994).

3.4.4) Extracción de las proteínas

Para la extracción de proteínas para la electroforesis en una dimensión se realizó el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Por otro lado, para obtener las proteínas para analizarlas con electroforesis bidimensional; a las cortezas parietales obtenidas se les agregaron 150 µl de amortiguador de muestra para isoelectroenfoque [urea 7 M (Bio-Rad, EUA), tiourea 2 M (GE Healthcare, Suecia), CHAPS 4%(Roche, EUA), amortiguador IPG 2% (GE Healthcare, Suecia), DTT 40 mM (Invitrogen, EUA) en agua Milli-Q], se agregaron 30 µl de un cóctel de

inhibidores de proteasas (complete Mini, Roche EUA) y 30 μ l de un cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosStop, Roche Alemania), ambos cocteles se prepararon por separado disolviendo las pastillas comerciales en 300 μ l de agua Milli-Q. Posteriormente, los tejidos se maceraron y los homogenizados se congelaron con Nitrógeno líquido y se descongelaron (dos veces), se les dio un “pulso” (10 segundos) en la centrifuga a 14000 rpm (Microfuga Brinkmann 5415C, EUA), se obtuvo el sobrenadante y se colocó en otro tubo para microfuga de 1.5 ml limpio. Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético y acetona (30%/70%) y se realizaron lavados por medio de centrifugación precipitando cada vez (Centrifuga Hermle Z383K, Alemania) con acetona al 100% (6 volúmenes) para limpiar las proteínas de contaminantes que interfieran con las corridas de electroforesis.

Las pastillas de proteínas lavadas, se disolvieron en 100 μ l de amortiguador de muestra para isoelectroenfoque junto con 100 μ l de solución de hidratación para isoelectroenfoque [urea 7 M (Bio-Rad, EUA), tiourea 2 M (GE Healthcare, Suecia), CHAPS 4% (Roche, EUA), amortiguador IPG 0.5% (GE Healthcare, Suecia), DTT 40 mM (Invitrogen, EUA) en agua Milli-Q] y se realizaron lavados adicionales (Person, 2006) con metanol 100% y cloroformo para terminar de purificar las proteínas.

Las proteínas purificadas se disolvieron en 200 μ l de solución de hidratación para isoelectroenfoque, nuevamente se agregó la misma concentración de los mismos inhibidores de proteasas y fosfatasa. El material se homogenizó con la solución de hidratación.

Las proteínas se cuantificaron usando un método comercial (2-D Quant Kit, Amersham Biosciences, EUA). A las muestras se les ajustó el volumen con solución de hidratación para obtener 150 μ g de proteínas en 140 μ l de la solución homogenizada, agregándose además 2 μ l de azul de Bromofenol 0.002% (Bio-Rad, EUA) como indicador de pH en la migración de las proteínas en el isoelectroenfoque.

3.4.5) Electroforesis de las proteínas

3.4.5.1) Electroforesis en una dimensión

Las proteínas se resolvieron en una dimensión por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) (Matsudaira, 1987), cuantificándose con el kit (BSA Protein assay, Pierce) cargando 40 µg/carril, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G250 (Bio-Safe, Bio-Rad, EUA) y las imágenes se capturaron con el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Suecia).

3.4.5.2) Electroforesis en dos dimensiones

Para obtener el perfil de proteínas en geles bidimensionales, se llevó a cabo la separación de las proteínas con respecto a su punto isoeléctrico y peso molecular; para lo cual se utilizaron las tiras pre-elaboradas para isoelectroenfoque (gradiente de pH 4-7 de 7 cm, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia).

Las muestras homogenizadas de proteínas (150 µg de proteínas en 140 µl de amortiguador) se colocaron en los carriles de un platillo de hidratación (GE Healthcare, Suecia), para que las tiras pre-elaboradas de isoelectroenfoque se colocaran una encima de cada muestra de proteínas cubriéndose con 3 ml de aceite mineral (Amersham Biosciences, EUA) en cada carril, y se dejaron hidratar durante 16 h (hidratación pasiva) con la muestra de proteínas. Ya hidratadas, las tiras se colocaron sobre los carriles de un platillo de cerámica para la corrida de isoelectroenfoque (primera dimensión) en el sistema Ettan IPGphor 3 para isoelectroenfoque (GE Healthcare, Suecia). El programa para la corrida de isoelectroenfoque para un intervalo de pH de 4-7 constó de cuatro pasos: en el primer paso se usó un voltaje de 500 V y 0.5 kVh, en el segundo 1000 V y 0.8 kVh, para el tercero fueron 8000V y 11.3kVh y el cuarto y último paso fue de 8000 V y 6.4 kVh. En cada corrida se colocaron tres tiras y las corridas duraron ~6 h.

Concluida la corrida de la primera dimensión se prepararon geles PAGE-SDS (Perez, 2010) para separar las proteínas ahora por su peso molecular (segunda dimensión). Para este fin se elaboró el gel separador al 15% [Tris-HCl 1.5 M

(Invitrogen, EUA) pH 8.8, SDS 20% (Bio-Rad, EUA), acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8% p/v (Bio-Rad, EUA), persulfato de amonio al 10% (Bio-Rad, EUA), temed (Bio-Rad, EUA) diluidos en agua Milli-Q]. Posteriormente se preparó el gel concentrador al 4% [Tris-HCl 0.5 M (Invitrogen, EUA) pH 6.8, SDS 20% (Bio-Rad, EUA), acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8% p/v (Bio-Rad, EUA), persulfato de amonio 10% (Bio-Rad, EUA), temed (Bio-Rad, EUA) diluidos en agua Milli-Q]. Cuando los geles ya estaban polimerizados se colocaron en una cámara de electroforesis vertical (Invitrogen V16-2, EUA).

Por otro lado, las tiras con las proteínas ya enfocadas se sometieron a un tratamiento para equilibrar los reactivos con los que se realiza la separación por masa molecular en PAGE-SDS. Para este fin, cada tira se incubó en agitación (Agitador Bio-Rad, UltraRocker, Rocking Platform, EUA) durante 15 minutos con 25 mg de DTT disuelto en 2.5 mL en una solución de equilibrio [Urea 6 M (Bio-Rad, EUA), Tris-HCl 75 mM (Invitrogen, EUA) pH 8.8, Glicerol 29.3% (USB, EUA), SDS 2% (Bio-Rad, EUA), Azul de Bromofenol 0.002% (Bio-Rad, EUA) diluidos en agua Milli-Q]. Posteriormente, las tiras se incubaron nuevamente durante 15 minutos, pero ahora en 62.5 mg de Iodoacetamida (GE Healthcare, Suecia) también disuelta en 2.5 ml de la solución de equilibrio. Terminado el tratamiento, cada tira se colocó horizontalmente sobre el gel concentrador con el lado del signo positivo de la tira a la izquierda y el lado de la tira que contiene el gel en dirección a la cara externa de la cámara, mientras que los marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein Estándar, Bio-Rad, EUA) se colocaron en un pozo del lado izquierdo del gel. Para fijar la tira a la parte superior del gel se agregó agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Invitrogen, EUA) disuelta en amortiguador TGS al 1X [Trizma base 24.9 mM (Sigma, EUA), glicina 191.8 mM (Invitrogen, EUA) y SDS 1.73 mM (Bio-Rad, EUA)] con de azul de Bromofenol 0.002% (Bio-Rad, EUA). A la cámara de electroforesis se le agregó amortiguador TGS al 1X para cerrar el circuito dentro de la cámara y se utilizó una fuente de poder (PowerPac™ HC, Bio-Rad, EUA), ~3h a 90 V.

Concluida la corrida, los geles se cubrieron con una solución fijadora de proteínas (ácido acético 10% y etanol 30%) agitándose por 30 minutos (Agitador Bio-Rad, UltraRocker, Rocking Platform, EUA). Posteriormente se tiñeron con colorante azul de Coomassie coloidal (G250, Bio-Rad, EUA) durante 2 h en agitación y se lavó el exceso de colorante para obtener las imágenes con el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Suecia) y ser analizadas con el software Image Master 2D Platinum (Amersham, Biosciencias, EUA).

3.4.6) Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS).

La identificación de proteínas por MS a partir de las moléculas aisladas de los geles 2-DE, se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Secretaria de Salud, usando el sistema Maldi Tof-Tof 4800 y el sistema híbrido de espectrometría de masas LTQ Orbitrap. Los datos m/z obtenidos se procesaron con el programa Protein Pilot (Applied Biosystem; <http://www.absciex.com/products/software/protein-pilot-software>), comparando con las bases de datos UniProt Knowledgebase (UniProtKB)/Swiss-Prot para *Rattus norvegicus*, con un intervalo de confianza $\geq 99\%$ y se usó un valor Unused ProtScore > 2.0 .

3.4.7) Western blot

Para la detección por WB, las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciencias, EUA) (Towbin, 1979) y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% (Equitech Bio Inc, EUA) disuelta en 0.1% TBS/Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA) durante 2h. Para la detección de moléculas las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos policlonales elaborados en conejo correspondientes a las proteínas en estudio durante toda la noche a 4°C: anti-14-3-3 γ (#ab69592, Abcam Reino Unido; dilución 1:1000), anti-Bad fosforilado en S112 (único monoclonal usado) (#ab129192, Abcam Reino Unido; dilución 1:1000), anti-Bad fosforilado en S136 (#4366, Cell Signaling EUA; dilución 1:500), anti-Bad fosforilado en S155 (#9297, Cell Signaling EUA; dilución 1:500), anti-Bad total (#9292, Cell Signaling

EUA; dilución 1:500), anti-PI3K p55 total (#11889, Cell Signaling EUA; dilución 1:1000) y anti-phospho-PI3K fosforilada en Y458 y Y199 (#4228, Cell Signaling EUA; dilución 1:1000) seguido de la incubación con anticuerpo secundario HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), dilución 1:40000 para los WB 1D y dilución 1:140000 para WB 2D (#65-6120, Invitrogen EUA) por 2h. Como controles de carga se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales contra beta actina (#ab8224, Abcam Reino Unido; dilución 1:60000) y contra tubulina (#ab44928, Abcam Reino Unido; dilución 1:8000), utilizando como secundario de estos el anticuerpo policlonal anti-mouse IgG (H+L) (#GTX77319, Gentex EUA; dilución 1:10000).

Para detectar la PEBP1 se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PEBP1 total (#ab76582, Abcam Reino Unido; dilución 1:1000) y para PEBP1 fosforilado en S153 uno monoclonal (#ab75971, Abcam Reino Unido; dilución 1:100) como anticuerpo secundario para éste se utilizó también HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), dilución 1: 40000 tanto para el WB 1D como el 2D (#65-6120, Invitrogen EUA). Como control de carga se usó un anticuerpo anti-beta actina (#ab8224, Abcam Reino Unido; dilución 1:60 000), usando como anticuerpo secundario el anti-mouse IgG (H+L) (#GTX77319, Gentex EUA; dilución 1:10000).

Finalmente para NDKA se utilizó un anticuerpo policlonal total (#3345, Cell Signaling, EUA; dilución 1:1000) utilizando como control de carga un anticuerpo anti-beta actina (#ab8224, Abcam Reino Unido; dilución 1:60000) usando como anticuerpo secundario para éste el anti-mouse IgG (H+L) (#GTX77319, Gentex EUA; dilución 1:10000).

Las membranas de nitrocelulosa incubadas con los anticuerpos se revelaron con quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones del proveedor (SuperSignal West pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, EUA) y las señales se registraron en el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Suecia). Para el análisis densitométrico de las imágenes se usó el software ImageJ accesible en: <http://imagej.nih.gov/ij/> (National Institutes of Health, EUA). Los valores

obtenidos bajo las diferentes condiciones experimentales se compararon y el análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) con una $p < 0.05$.

3.4.8) Inmunohistoquímica

A partir de muestras de CP de las cuatro condiciones experimentales se obtuvieron cortes de 4 μm de la CP por el método de inclusión en parafina. A continuación se realizó la exposición antigénica en una olla de presión por un minuto con una solución de recuperación antigénica (Reveal TM, Biocare Medical, Concorde CA) (Warford, 2014). Los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C, en una cámara húmeda con los mismos anticuerpos que se utilizaron para el WB para 14-3-3 γ y NDKA. En el caso de PEBP1, se usó el anticuerpo policlonal anti-PEBP1 total (GTX12076, GeneTex, EUA; dilución 1:100). La detección de la reacción fue realizada con el kit streptavidin-biotin LSAB+System (BioGenex, San Ramón Ca., EUA) la cual fue revelada con diaminobencidina (DAB) usando un sistema de detección comercial (DAB+Substrate-Chromogen System, BioGenex, San Ramón Ca., EUA). Un control negativo sin anticuerpo primario fue usado para todas las condiciones experimentales. Finalmente, las secciones cerebrales fueron teñidas con hematoxilina para su observación al microscopio y realizar la cuantificación de las células positivas por campos para obtener el porcentaje (Bratthauer, 1994).

4) Resultados

4.1) Daño en la corteza parietal durante la isquemia temprana

Para analizar el daño ocasionado por la isquemia cerebral temprana, se hicieron cortes macroscópicos que se tiñeron con TTC (figura 2) y se observó en los controles (figura 2A-B) todo el tejido cerebral está teñido color rojo. Con 1h de ICF el daño por isquemia es evidente por la presencia de una zona blanca (flechas) (figura 2C), mientras que con ICF/RP el área isquémica (color blanco) es marcada y extendida (figura 2D).

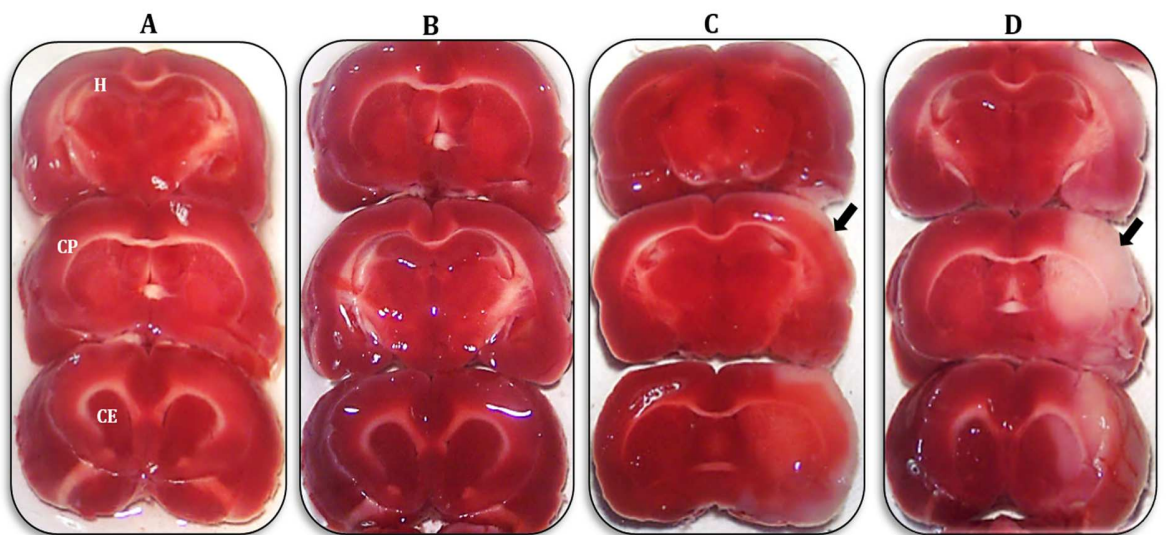


Figura 2. Detección macroscópica del volumen de isquemia temprana del hemisferio izquierdo de la CP de la rata (flechas) *in vivo*, en cortes (anterior (abajo), medio y posterior (arriba)) del cerebro de rata teñidos con la técnica del TTC. A) Cerebro de rata intacta (control normal), B) Cortes del cerebro de rata Sham, C) Cerebro con 1h de ICF, D) Cerebro con ICF/RP. Se muestra el daño debido a la isquemia en la región color blanco (no teñida por el TTC). H=hipocampo, CP=corteza parietal, CE=cuerpo estriado.

Para el análisis microscópico, cortes de la CP de la rata se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los controles normal y Sham mostraron uniformidad e integridad en las neuronas, en las células de la glía, en el neuropilo y en los vasos sanguíneos (figura 3A-B). En contraste, en el tejido con 1h de ICF (figura 3C); las neuronas y glías muestran encogimiento, condensación y picnosis (cabeza de flecha). El edema citotóxico y vasogénico es evidente en el tejido isquémico (flechas). El neurópilo muestra una coloración irregular debido a su degradación. El daño es más marcado y extendido con ICF/RP (figura 3D).

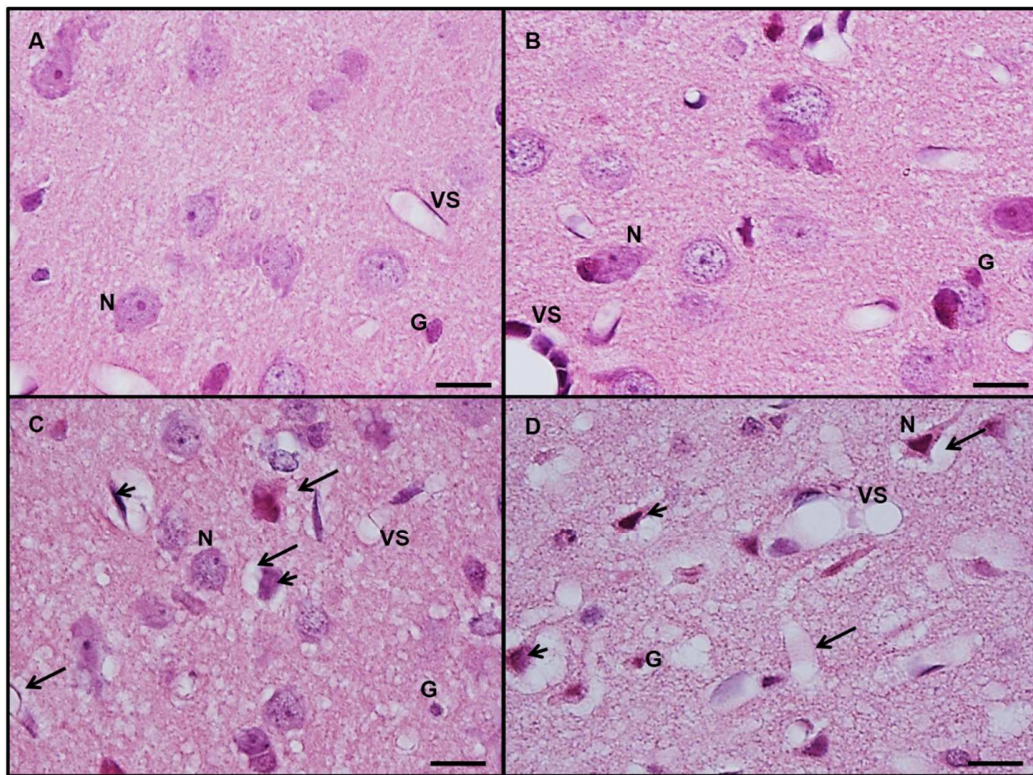


Figura 3. Secciones de la CP de la rata teñidas con hematoxilina y eosina; se muestran los efectos de la ICF y la ICF/RP. A) Control, B) Sham, C) 1h de ICF, D) 1h de ICF con 24h de RP. Se muestran las células de la unidad neurovascular. Neuronas (N), Células de la glía (G), Vasos sanguíneos (VS). Barra=20 μm

4.2) Perfil de proteínas de la corteza parietal de la rata con condiciones de isquemia cerebral focal y reperusión sanguínea tempranas

Se obtuvo el perfil de proteínas de las cuatro condiciones experimentales de la CP de la rata por electroforesis bidimensional. Ya teñidos los geles con azul de Coomassie coloidal G250 se observaron puntos resueltos entre 150 kDa y 10 kDa, donde las proteínas más abundantes se observaron entre 75 y 37 kDa, con un rango de pI entre 5.0 y 6.0 (Figura 4). Se observó que seis puntos de proteínas mayoritarias cambiaron su concentración (encerrados en círculos) con condiciones tempranas de isquemia y RP, (figura 5) y se identificaron por espectrometría de masas MALDI/TOF/TOF/MS (Tabla 1) (tabla 1). La concentración de estos puntos se obtuvo y los resultados obtenidos mostraron cambios estadísticamente significativos (figura 5 y tabla 1). Los puntos identificados fueron la proteína de unión a fosfatidietanolamina 1, la nucleósido difosfato cinasa A, la super óxido dismutasa y la actina citoplasmática 2. De forma interesante, el punto identificado como 14-3-3 α - β , η , γ de 30 kDa, con un punto isoelectrico de 4.8 no mostró cambios significativos en condiciones de isquemia y RP tempranas, pero el punto identificado específicamente como 14-3-3 γ con el mismo peso molecular pero con un punto isoelectrico de 5.5 mostró un aumento con 1h de ICF, disminuyendo con 1h de ICF y 24h de RP sanguínea con respecto a los controles.

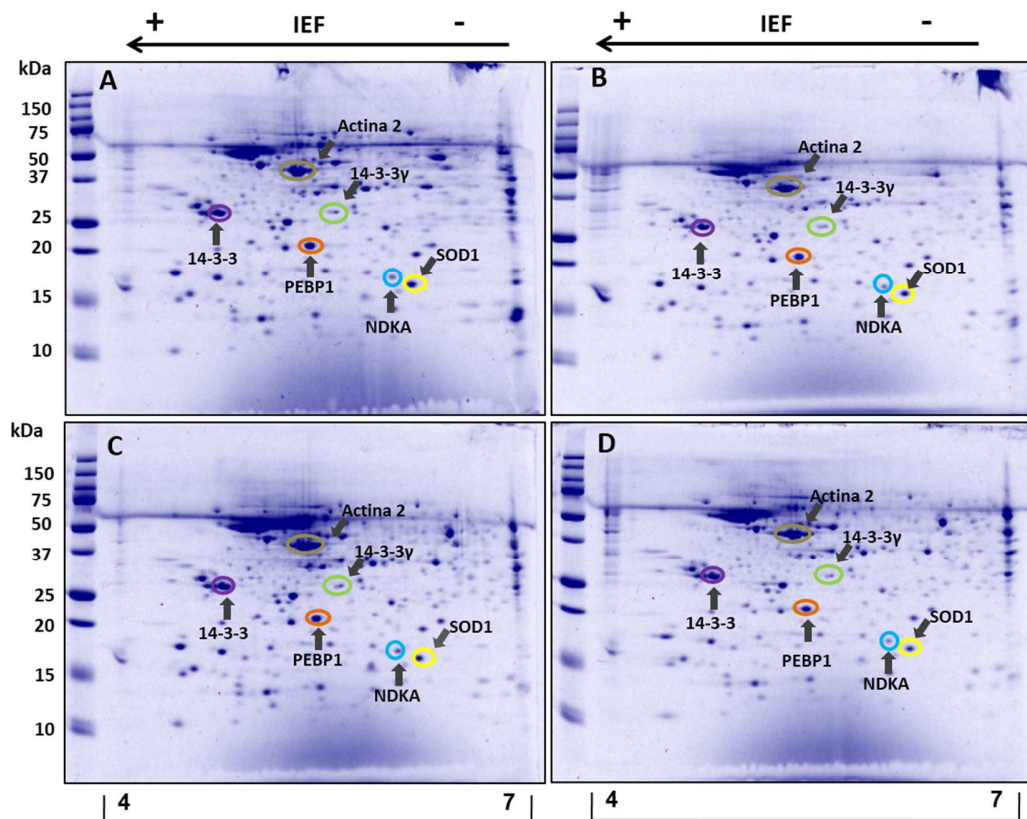


Figura 4. Figura representativa del perfil de proteínas de la CP del hemisferio izquierdo de la rata con condiciones de ICF e ICF/RP sanguínea tempranas. Se resolvieron 150 μ g de proteínas con electroforesis bidimensional (rango de IEF= 4-7; PAGE-SDS al 15%). Teñidos con azul de Coomassie coloidal. A) Perfil de proteínas de la CP de ratas intactas usadas como control, B) Control Sham, C) 1h de ICF y D) 1h de ICF/RP (Las flechas indican los puntos de las proteínas identificados por espectrometría de masas).

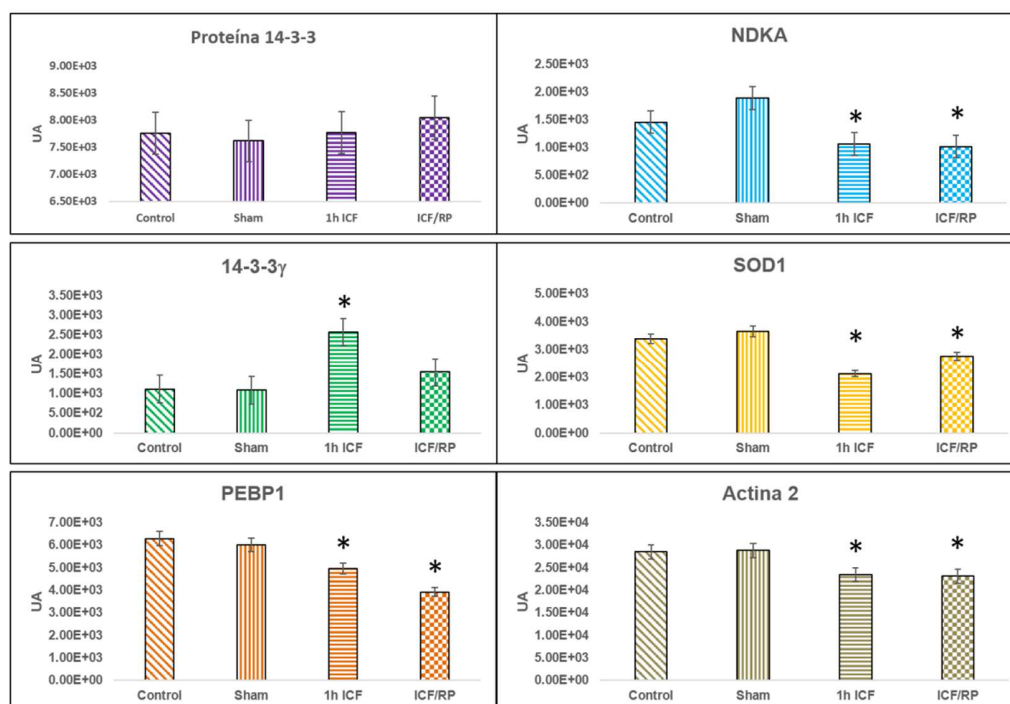


Figura 5. Proteínas identificadas en la CP con cambios con 1h de ICF con y sin 24h de RP en el cerebro de rata con espectrometría de masas. Se realizó la densitometría para obtener la densidad de las manchas con el software Image Master 2D Platinum. El punto correspondiente a la proteína 14-3-3 no mostró cambios, sin embargo, el punto correspondiente a la isoforma gamma de 14-3-3 incrementa de forma significativa con 1h de ICF. Mientras que PEBP1, NDKA, SOD1 y la actina citoplasmática 2 disminuyen en ambas condiciones de ICF/RP tempranas. Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles. Con un valor de $p < 0.05$ considerándose significativo.

Proteínas de la CP de rata con cambios en concentración con 1h de ICF con y sin 24h de RP con respecto a los controles

Nombre	Número de acceso (UniprotKB)	Teórico MW/pI	Unused ProtScore	Péptidos identificados (confianza ≥ 95)	Expresión de proteínas (Coeficiente de variación)		Función de la proteína
					1h de ICF	ICF/RP	
14-3-3 $\gamma, \eta, \alpha\text{-}\beta$	sp P61983 1433G_RAT	28.3/4.8	13.05	4	1.0	1.0	Se une a un gran número de patrones de motivos fosfoserina y fosfotreonina
	sp P68511 1433F_RAT	28.2/4.8	5.13				
	sp P35213 1433B_RAT	28.0/4.8					
14-3-3 γ \uparrow	sp P61983 1433G_RAT	28.4/5.5	13.05	4	1.24	-7.41	Regulación de vías señalización
PEBP1 \downarrow	sp P31044 PEBP1_RAT	21.0/5.4	10.19	6	-9.90	-7.83	Precursora del HCNP y es inhibidora de la proteína Raf cinasa
NDKA \downarrow	sp Q05982 NDKA_RAT	17.2/6.3	5.38	4	-9.84	-5.39	Síntesis de GTP y ATP
SOD1 \downarrow	sp P07632 SODC_RAT	15.9/6.3	2.24	2	-5.79	-7.55	Destrucción de radicales libres

ACTG ↓	sp P63259	42.1/5.	30.08	7	-9.86	-8.98	Movilidad celular
	ACTG_RAT	3					

Tabla 1. Valores obtenidos con el sistema de espectrometría de masas LTQ Orbitrap Hybrid a partir del análisis densitométrico de los puntos con cambios de concentración en los geles bidimensionales. Los valores fueron comparados con el proteoma de la rata en el software Protein Pilot. Las proteínas se reportaron con una confianza mayor al 99% (unused ProtScore >2.0).

4.3) Expresión de 14-3-3 γ

Se encontraron dos puntos de aproximadamente 30 kDa identificados como 14-3-3; el punto que no mostró cambios, correspondía a varias isoformas de la proteína 14-3-3 con pI de 4 (Tabla 1). Mientras que el punto correspondiente específicamente a la isoforma 14-3-3 γ mostró un pI de 5.5, incrementó su concentración con 1h de ICF pero disminuyó con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea (figura 6).

Se validaron los cambios de la expresión de 14-3-3 γ por medio de WB en dos dimensiones e inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos contra ésta isoforma (figura 6 y 7 respectivamente). Por otro lado, la inmunohistoquímica mostró la expresión de 14-3-3 γ en el citoplasma de las neuronas de la CP, en comparación con las células de la glía donde el resultado fue negativo (figura 7).

Tanto el resultado del WB en dos dimensiones como la inmunohistoquímica mostraron el mismo patrón de cambios en las condiciones isquémicas con respecto a los controles, concordando a su vez, con los resultados encontrados en el gel bidimensional (figura 5 y tabla 1).

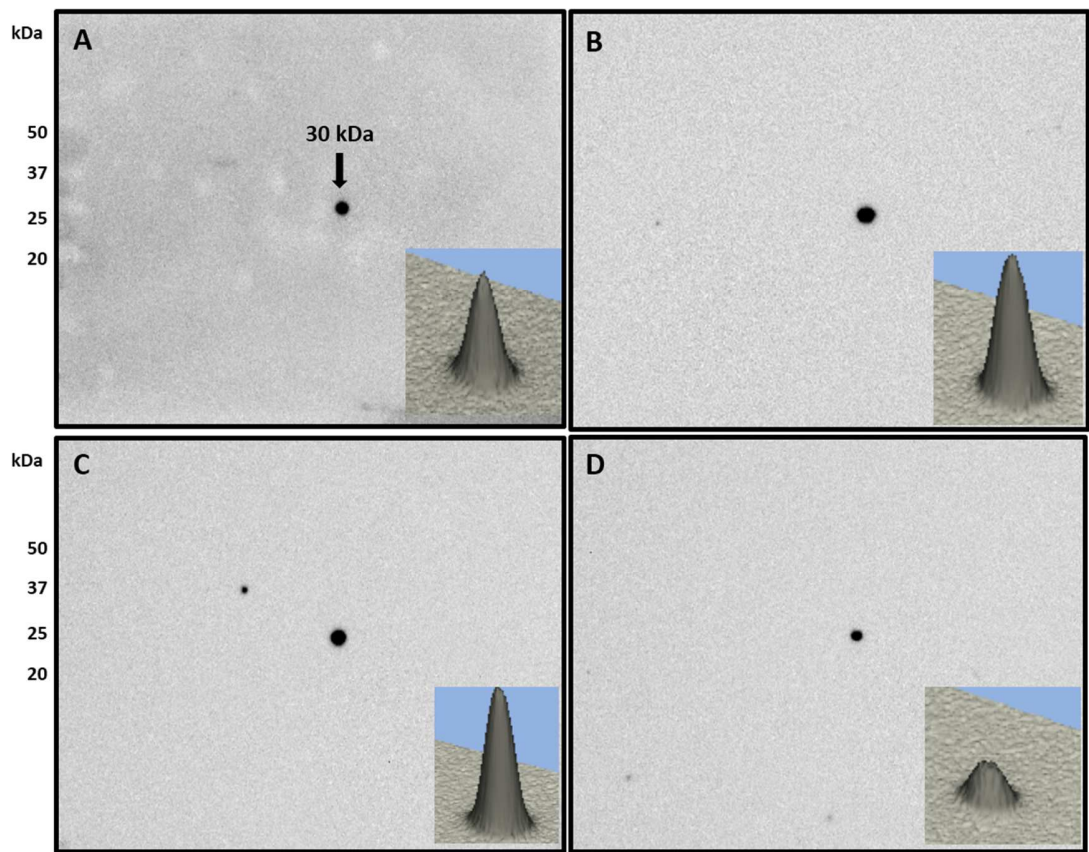


Figura 6. La proteína 14-3-3 γ varía bajo condiciones de isquemia y RP tempranas. Se muestra la concentración en 3D de cada punto reconocido por el anticuerpo en los recuadros derechos inferiores de cada condición experimental. Las proteínas totales de la CP de la rata fueron resueltas con 2DE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, incubadas posteriormente con un anticuerpo policlonal específico contra la proteína 14-3-3 γ . A) Control normal, B) Control Sham, C) 1h de ICF con aumento de la expresión de la proteína 14-3-3 γ , D) 1h de ICF con 24h de RP con la expresión disminuida de la proteína 14-3-3 γ .

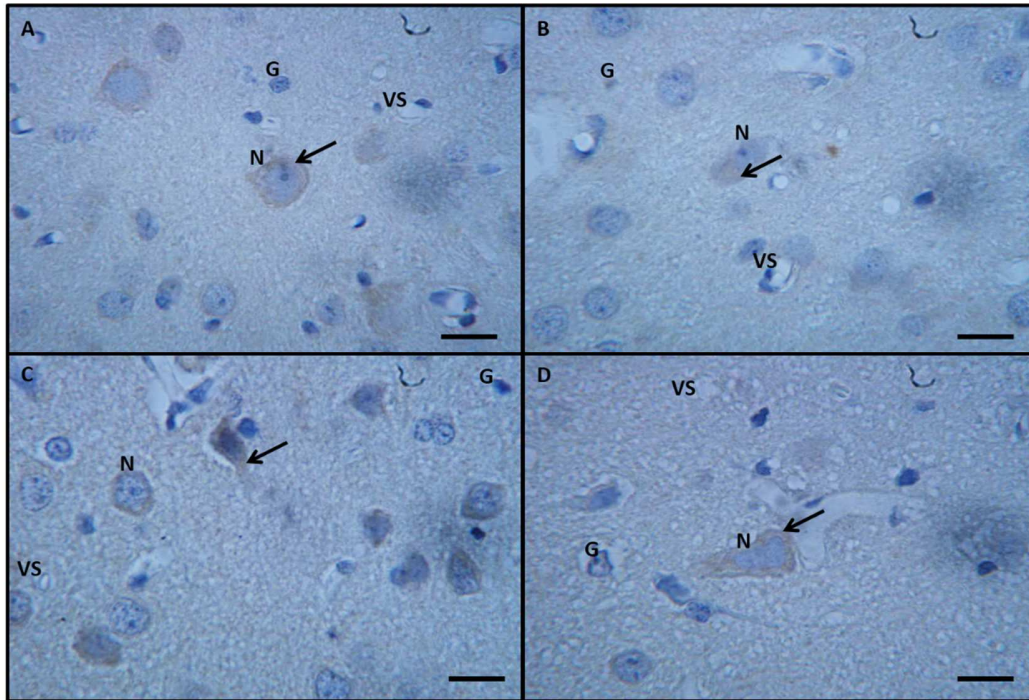


Figura 7. Localización de la proteína 14-3-3 γ en el citoplasma de las neuronas (N) de la CP del hemisferio cerebral izquierdo de la rata. Fue realizada dirigiendo un anticuerpo policlonal contra la proteína, seguido de un anticuerpo secundario biotilado y se reveló con la reacción de DAB. A) Control normal. B) Control sham. C) 1h de ICF; 14-3-3 γ que aumentó en el citoplasma de las neuronas. D) ICF/RP provocaron la disminución del número de neuronas positivas. El citoplasma de las neuronas con la señal positiva para 14-3-3 γ está señalado con las flechas. Barra= 20 μ m.

4.4) Vías PI3K/Akt y RAS/MEK/ERK y expresión de la proteína Bad

El papel que desempeña la proteína 14-3-3 en el control de la muerte celular apoptótica y su función neuroprotectora en condiciones de isquemia *in vivo* aún no es del todo conocida. Depende en parte de su interacción con otras moléculas involucradas en la apoptosis como la proteína Bad (figura 14), la cual es una proteína pro-apoptótica que, cuando se fosforila en los residuos S136 y S112 por las vías de señalización celular PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK respectivamente, así como su residuo S155 fosforilado principalmente por la PKA, es capaz de interactuar con la proteína 14-3-3 con mayor afinidad retrasando la muerte celular ante el evento isquémico.

Para analizar la activación de las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK en la CP de la rata, se observó la fosforilación de PI3K total y de su forma fosforilada. Se encontró que la proteína total no cambió en las condiciones isquémicas con respecto a los controles, pero si se encontró un aumento de la forma fosforilada de PI3K con 1h de ICF, mientras que con ICF/RP regresó a los mismos niveles que los controles. En el caso de la proteína Ras, no mostró cambios significativos con respecto a ambos controles (figura 8).

También se examinaron la concentración total y las fosforilaciones de los residuos específicos S112, S136 y S155 de la proteína Bad en la CP. Se encontró que la expresión total de ésta aumentó con 1h de ICF, disminuyendo con ICF/RP. Aunado a esto, se encontró que los tres residuos mencionados de la proteína Bad, tienen el mismo comportamiento; aumentando la fosforilación en la isquemia temprana pero disminuyendo con ICF/RP (figura 8).

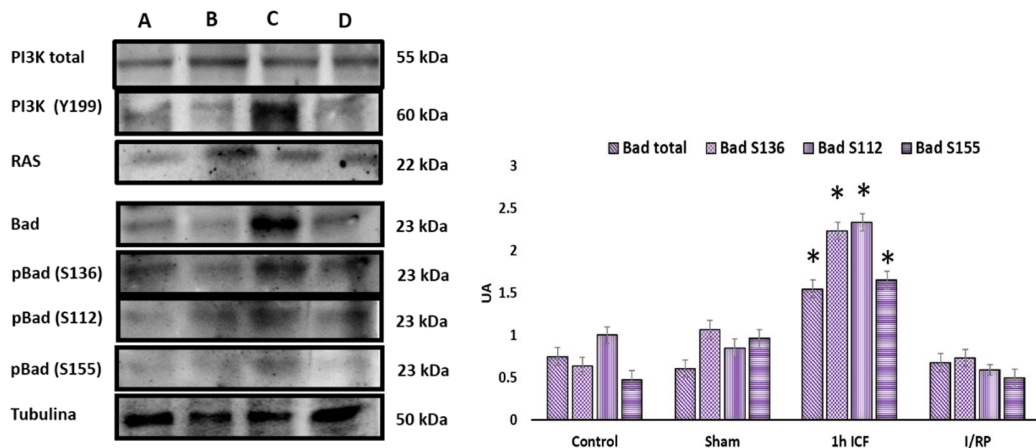


Figura 8. Análisis de los cambios de expresión Y fosforilación de Bad, PI3K y RAS. Las proteínas de la CP de la rata con ICF e ICF/RP se analizaron mediante western blot (figura representativa) para la detección de la activación de las vías PI3K/Akt y RAS/MEK/ERK; involucradas en la fosforilación de la proteína Bad. Para la proteína Bad se detectó su cantidad y fosforilación en los tres residuos (S136, S112 y S155) involucrados en la interacción con las proteínas 14-3-3. Carriles A) Control normal. B) Control Sham. C) 1h de ICF. D) ICF/RP. Los asteriscos indican diferencia significativa al comparar con los controles con una $p < 0.001$ (ANOVA). Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles.

4.5) Expresión de PEBP1

Con respecto a PEBP, por medio de electroforesis bidimensional se encontró que en la CP de la rata la concentración del punto inicialmente identificado por MS, éste disminuyó un 20% con 1h de ICF y con ICF/RP (figura 10A, B, E). Los cambios de la expresión de PEBP1 Se validaron por medio de WB en una y dos dimensiones (figura 9 y 10C respectivamente).

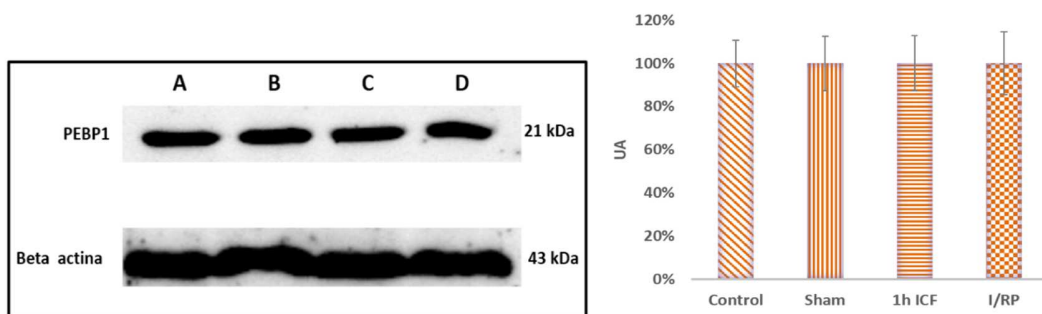


Figura 9. La PEBP1 no varió en su concentración en ICF y ICF/RPF. Las proteínas totales de la CP de la rata fueron resueltas por electroforesis en PAGE-SDS y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, incubadas posteriormente con un anticuerpo específico contra PEBP1. A) Control normal, B) Control Sham, C) 1h de ICF, D) ICF/RP. Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles.

En el análisis por WB en una dimensión de PEPB1 en la CP de la rata, no se observaron cambios en la concentración entre las cuatro condiciones experimentales (figura 9). Notablemente, en el WB-2DE de PEBP1 (figura 10C) se observaron tres manchas con diferentes puntos isoeléctricos reconocidas por el anticuerpo anti-PEBP1 y la proporción entre ellas varió entre las 4 condiciones experimentales (figura 10F); el punto central del grupo observado en el WB-2DE es el mayoritario y corresponde al peso molecular y pI del punto identificado inicialmente por MS a partir del gel 2DE. Este tuvo tendencia a disminuir en condiciones de 1h de ICF Y disminuyó de forma significativa con ICF/RP. El punto izquierdo con pI aproximado de 5.3 aumentó en ambas condiciones isquémicas, mientras que el derecho con un pI de 5.5 incrementó sólo con ICF/24 RP (figura 10C, F). Al utilizar el anticuerpo específico contra la forma fosforilada de PEBP1 en el residuo S153 (pPEBP1), el cual reconoce la forma mayoritaria de la PEBP, se encontró una disminución muy marcada con 1h de ICF y con ICF/RP (figura 10D, G).

También se analizó la presencia de la PEBP1 dentro de la unidad neurovascular de la CP del cerebro de la rata mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos (figura 11). PEBP1 se encontró en el citoplasma y núcleo, tanto de neuronas como de células glía de la CP (figura 11). El conteo de células totales positivas en la CP, no mostró cambios en condiciones de isquemia y RP con respecto a los controles. Concordando con el WB.

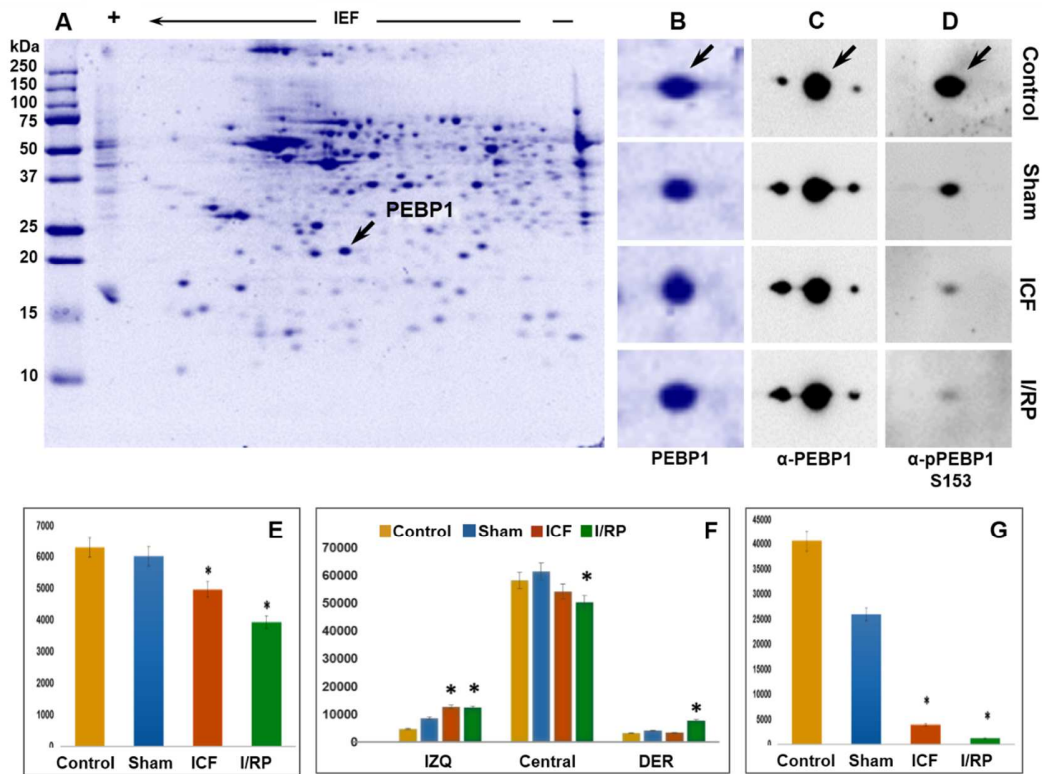


Figura 10. A) Gel bidimensional del perfil de proteínas de la CP de la rata donde se muestra la localización del punto (B) identificado con MS como PEBP1. C) WB 2D donde se observan los cambios de concentración entre los tres puntos reconocidos con el anticuerpo específico anti-PEBP1 con el mismo peso molecular pero con diferente punto isoeléctrico. D) WB 2D contra la forma fosforilada de PEBP1 en el residuo S153. Se puede observar la disminución de la expresión con 1h de ICF, siendo más evidente ésta disminución con ICF/RP. E) Gráfico donde se muestran los cambios de concentración del punto correspondiente a PEBP1 en el gel 2DE teñido con azul de Coomassie coloidal. F) Cambios de concentración de los tres puntos que el anticuerpo anti-PEBP1 reconoció. G) Gráfico que muestra la disminución de la forma fosforilada de PEBP1 en el residuo de S153. Los asteriscos indican diferencia significativa al comparar con los controles con una $p < 0.005$ (ANOVA).

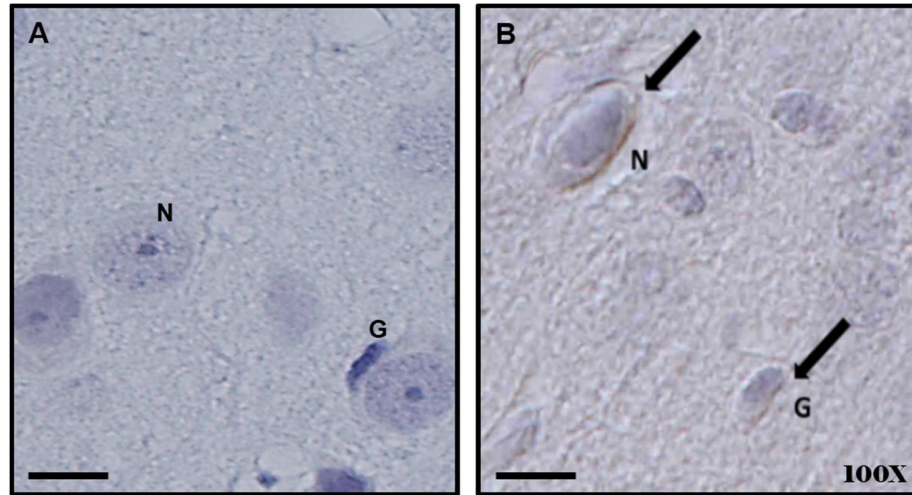


Figura 11. Figura representativa de la localización de la proteína PEBP1 en el citoplasma de las neuronas (N) de la CP del hemisferio izquierdo de la rata. A) Control normal, B) Control sham, C) 1h de ICF. D) ICF/RP. La señal positiva para PEBP1 está señalada con las flechas. Barra= 20 μ m.

4.6) Expresión de NDKA

En los experimentos previos, se observó en los patrones de proteínas por electroforesis bidimensional que en la CP de la rata la proteína NDKA disminuyó en condiciones de ICF e ICF/RP (Sánchez, 2010) (figura 4). En este trabajo esta disminución se corroboró mediante western blot (figura 13). Además, por medio de inmunohistoquímica utilizando los mismos anticuerpos específicos, se encontró a la NDKA distribuida en el citoplasma (incluso en los axones) y en el núcleo de las neuronas de la CP (figura 14).

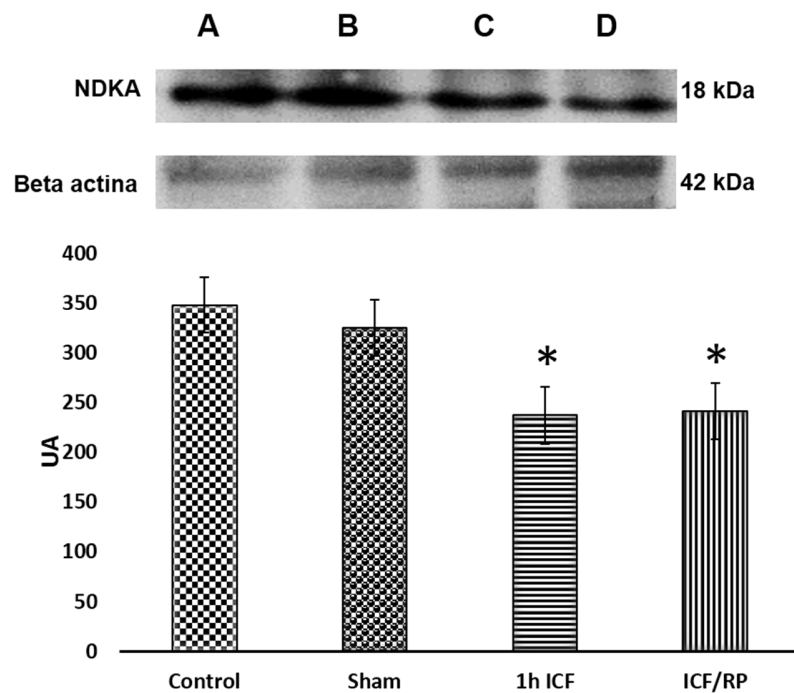


Figura 12. Cambios en la concentración de la proteína NDKA. Las proteínas de la CP de la rata se analizaron mediante western blot bajo condiciones de ICF y RP para detectar la NDKA. A) Control normal, B) Control Sham, C) 1h de ICF, D)

ICF/RP. Los asteriscos indican diferencia significativa al comparar con los controles con una $p < 0.005$ (ANOVA). Las barras de dispersión indican porcentaje de error de los valores representados como unidades arbitrarias (UA) con respecto a los controles.

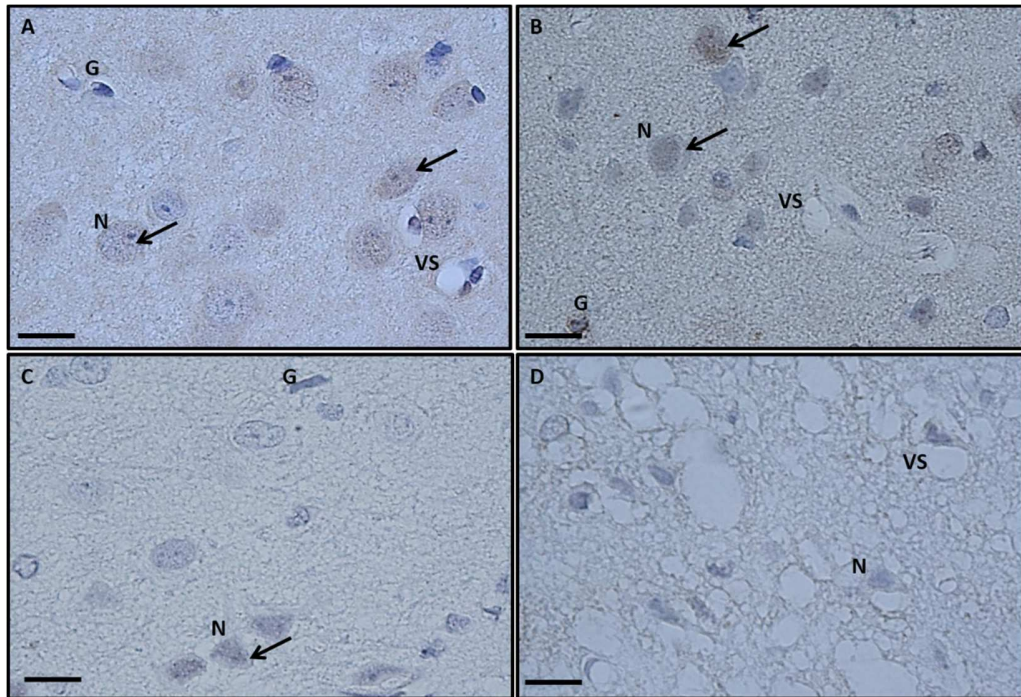


Figura 13. Localización de la proteína NDKA en el núcleo y citoplasma de las neuronas (N) de la CP del hemisferio izquierdo. Fue realizada dirigiendo un anticuerpo policlonal contra la proteína, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado y se reveló con la reacción de DAB. A) Control normal. B) Control Sham. C) 1h de ICF; NDKA disminuyó en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas, D) ICF/RP; provocaron la disminución del número de neuronas positivas. El núcleo y citoplasma de las neuronas con la señal positiva para NDKA están señalados con las flechas. Barra= 20 μm .

5) Discusión

5.1) Enfermedad vascular cerebral

Enfermedad vascular cerebral es la principal causa de muerte y discapacidad alrededor del mundo (Wang, 2014) y el conocimiento de los mecanismos disparados por la isquemia y la RP tempranas, específicamente en tiempos tempranos de isquemia cerebral, aun es incompleto, lo que es limitante para el diseño de acciones terapéuticas. A la fecha es claro que el tratamiento debe aplicarse en un periodo de tiempo corto antes de que ocurra daño irreversible (“ventana terapéutica”), y actualmente el único tratamiento efectivo para la EVC es el activador de plasminógeno tisular (Wang, 2015). En este trabajo, el principal interés es el análisis de las proteínas que están cambiando inmediatamente después de un evento isquémico en tiempos tempranos (Nizzuma, 2010). Para buscar nuevos mecanismos fisiopatológicos, identificación de nuevos biomarcadores y/o blancos terapéuticos potenciales.

5.2) Modelo de isquemia cerebral focal en rata y reperusión sanguínea

En el presente trabajo fue utilizado el modelo de ICF en rata, ya que ha mostrado ser un sistema en donde se pueden reproducir los procesos patofisiológicos que tienen lugar en el humano (Chen, 2015) y ha permitido conocer acerca de la organización normal de varios sistemas de neurotransmisores, neuroquímica y neurofarmacología, así como los efectos histológicos, celulares y bioquímicos ocasionados por la ICF (Zea Longa, 1989). Las semejanzas entre la anatomía de la circulación intracraneal de la rata y el hombre, comparada con otros animales, como el jerbo, el gato o el perro, constituyen una ventaja al estudiar la enfermedad vascular en esta especie, pues la irrigación arterial de los hemisferios cerebrales de la rata es similar a la del hombre (Peña, 2004).

Con esta técnica que consiste en la introducción intracarotídea de un filamento para inducir la isquemia focal en el territorio de la arteria cerebral media, se evita la cirugía intracraneal donde se liga la arteria cerebral media, y no se puede

estudiar el fenómeno de la RP. Una de las desventajas es la gran variabilidad del infarto producido, lo que dificulta mucho la valoración de los resultados obtenidos (Roda, 1997; Peña, 2004). Una ventaja del modelo utilizado en este estudio es que se puede manejar el tiempo de estudio del tejido después del ictus, ya que en el caso del humano es imposible saber en qué momento va a ocurrir, por lo que no hay manera de saber lo que ocurre en tiempos cortos. De igual manera, comparando otros modelos, como el de cadáver, no es posible controlar el tiempo que el tejido está sujeto a la condición de isquemia. Finalmente, este modelo también tiene la ventaja de ser *in vivo* y permitir analizar las posibles soluciones que da el organismo a la condición patológica.

Dado que el hipocampo, la CP y el cuerpo estriado presentan un mayor daño al inducir la isquemia en el humano por el bloqueo de la arteria cerebral media, éstas son las regiones más estudiadas en el modelo de ICF/RP (Zea Longa, 1989). Para este estudio se escogió la CP porque fue la que, en nuestro estudio previo (Sánchez, 2010), presentó más cambios en la expresión de proteínas.

5.3) Proteína 14-3-3 γ

La familia de las proteínas 14-3-3 son moléculas tipo *scaffold* que interactúan con otras proteínas para regular su función y localización celular mediante un número variable de motivos de unión a fosfoserinas y fosfotreoninas. Estas proteínas participan en funciones celulares tales como control del ciclo celular, vías de señalización y la regulación de la apoptosis entre otras (Sluchanco, 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo por 2DE y WB mostraron que durante la ICF/RP sanguínea tempranas *in vivo*, la proteína 14-3-3 γ (pI=5) fue la isoforma que cambió su expresión, mientras que las otras isoformas de 14-3-3 (pI=4) localizadas en el otro punto del gel, permanecieron sin cambios de concentración (tabla 1).

El hecho de que se localizan dos isoformas en diferente región del gel, puede ser debido a que un punto puede cambiar su localización en un gel. Una explicación que es debido a las modificaciones postraduccionales en respuesta a la isquemia

y RP; en este caso 14-3-3 γ con un pI=5.5 está cambiando, pero no 14-3-3 γ (junto con las demás isoformas presentes en el mismo spot) con un pI de 4.8.

Estos resultados sugieren que 14-3-3 γ podría estar cambiando sus modificaciones postraduccionales, como ocurre cuando se desfosforila, permitiendo una mayor capacidad de unión con sus proteínas blanco. Por otro lado, podría haber cambios relativos en la abundancia entre la concentración entre dos o más isoformas de proteínas traducidas de distintas moléculas de mRNA (Jayaraman, 2012; Svoboda 2012).

Nuestro modelo *in vivo* también nos permitió evaluar la localización de 14-3-3 por inmunohistoquímica. La localización es importante para conocer si se expresa en las neuronas o en las células de la glía, para conocer la distribución y cantidad en las células en que se estén llevando a cabo dichos cambios. Los resultados mostraron una expresión abundante de 14-3-3 γ solamente en el citoplasma de las neuronas durante 1h de ICF, pero una disminución de neuronas positivas con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea; en contraste con las células de la glía donde no se observó la marca. Estos cambios sugieren que 14-3-3 γ podría jugar un papel de protección en la sobrevivencia de las neuronas durante la isquemia temprana, a diferencia de varios estudios, donde han reportado el aumento de 14-3-3 γ específicamente en astrocitos con condiciones de isquemia tardía (Chen, 2002 y Chen, 2005).

5.4) Activación de las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK y fosforilación de la proteína Bad

Una de las funciones propuestas para las proteínas 14-3-3 en la isquemia cerebral es antagonizar las señales apoptóticas, principalmente secuestrando a la proteína Bad (una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2) en el citoplasma, inhibiendo el proceso de la apoptosis y extendiendo la estabilidad neuronal (Engel, 2011). Además, se ha demostrado que la interacción de Bad y 14-3-3 depende de la fosforilación de Bad en los residuos S112 y S136 y el residuo S155 que se localiza en el dominio de muerte BH3, que regula la interacción con BCL-XL, la cual induce

apoptosis (Danial, 2009). Estos sitios fosforilados en Bad son responsables de las señales de supervivencia (Porter, 2006). Por estas razones se analizó la expresión y la fosforilación de Bad.

La apoptosis en la ICF y RP sanguínea está asociada con la inactivación de las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK, resultando en la desfosforilación de Bad en los residuos S136 y S112 respectivamente causando la disociación de 14-3-3/Bad (Papadakis, 2013; Shimada; 2013, Liaw, 2014). De esta manera, Bad dispara la apoptosis de la vía mitocondrial a través de la familia Bcl-xL, resultando en la liberación del citocromo C y la muerte celular apoptótica (Engel, 2011). En otros estudios, se ha observado que en tiempos prolongados de isquemia en neuronas y células de la glía, 14-3-3 γ aumenta junto con la proteína Bad total fosforilada (residuos S136, S112 y S155), (Chen, 2005; Liaw, 2014). Nuestros resultados muestran que hay indicios de apoptosis y que aparece tempranamente en el hipocampo a los 12 minutos de ICF (Ortiz et al 2005).

En este trabajo encontramos un incremento en la expresión de la proteína Bad total y de la fosforilación de sus residuos S112, S136 y S155 con 1h de ICF *in vivo*. Al aumentar la fosforilación de Bad en estos tres residuos, con los cuales 14-3-3 γ podría estar asociada, se analizó también la activación (fosforilación) de la vía PI3K y la concentración de la proteína Ras activada; iniciadoras de la activación de las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK respectivamente (Radhakrishnan, 2010; Houg, 2014). Se encontró que la forma total de PI3K no cambió en las condiciones isquémicas, pero sí aumentó la forma fosforilada en 1h de ICF; sugiriendo la activación de la vía Ras/MEK/ERK, y como consecuencia la fosforilación del residuo S136 de Bad. Sin embargo, Ras que es la iniciadora de la activación de la vía Ras/MEK/ERK y necesaria para la fosforilación principalmente de la S112 de Bad, no mostró cambios con 1h de ICF ni con ICF/RP, manteniéndose en sus niveles basales. Esto indica que si bien no se desactiva con 1h de ICF, tampoco aumenta su actividad lo que podría llevar a la activación de la vía Ras/MEK/ERK; sugiriendo que la fosforilación de S112 de Bad puede deberse a la activación de la vía PI3K/Akt, y no a la de la vía Ras/MEK/ERK (Datta, 2000).

Mientras que S155 de Bad podría estar siendo fosforilada por la PKA. Estos resultados de la fosforilación de la proteína Bad, junto con el incremento de 14-3-3 γ con 1h de ICF, podrían sugerir que ambas proteínas podrían asociarse como respuesta al evento isquémico.

Por otro lado, nuestros resultados con ICF/RP, mostraron una disminución de la concentración de la proteína 14-3-3 γ junto con la concentración total de Bad, así como la desfosforilación de sus residuos S136, S112 y S155; surgiendo posiblemente el aumento y expansión del daño en la zona isquémica del tejido. Se ha observado que debido a la RP después de la isquemia temprana, existe un aumento en la producción de radicales libres, causando degradación de las proteínas del tejido y desencadenando la muerte celular (Xin, 2014; Liu, 2014; Yasuda, 2014).

En el presente trabajo, se encontró un incremento de 14-3-3 γ con 1h de ICF y la fosforilación de Bad en los tres residuos (S136, S112 y S155) necesarios para la interacción con 14-3-3 γ , específicamente en la CP, los cuales han sido considerados determinantes para la asociación entre las proteínas 14-3-3 γ y Bad (Ohi, 2006; Radhakrishnan, 2010). En este estudio, se sugiere que la activación de las vías PI3K/Akt se lleva a cabo, debido a que la proteína Bad se está fosforilando en los residuos S136 y S112 (Datta, 2000). Con un posible papel de neuroprotección (Papadakis, 2013; Shimada, 2013).

Estudios posteriores son necesarios para determinar la posible asociación entre la proteínas 14-3-3 γ y Bad, para analizar también en caso de que sucediera el retardamiento de la muerte celular por la activación de las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK/p90RSK (Shimada, 2013) involucradas en la posible neuroprotección en la ICF temprana en la CP.

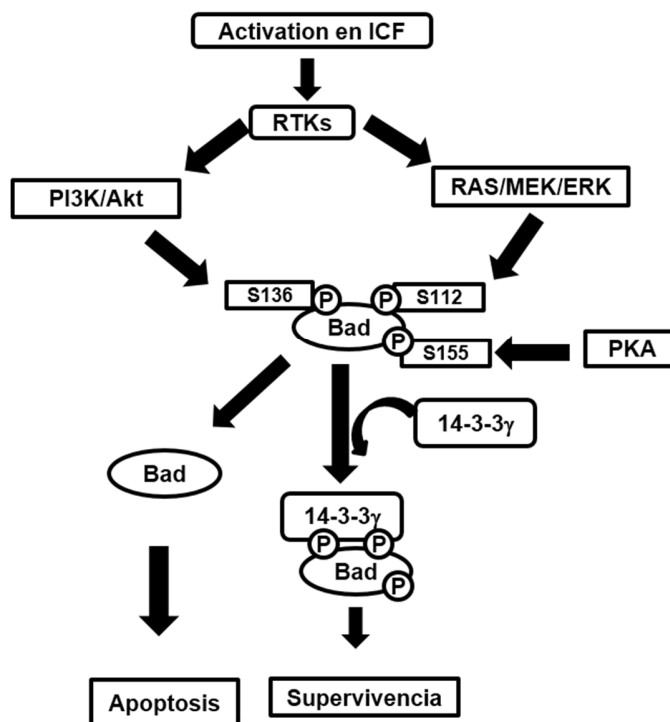


Figura 14. Modelo para la interacción de la proteína Bad fosforilada con la proteína 14-3-3 γ y su efecto en la ICF temprana en la CP de la rata. En condición basal, Bad esta fosforilada en los residuos S136 y S112 debido a las vías PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK, mientras que el residuo S155 por PKA. Al ocurrir la ICF, los receptores tirosina cinasa (RTKs) podrían ser fosforilados por diversos factores de crecimiento activados por la isquemia, y en este caso, la vía Ras/MEK/ERK no muestra sobreactivación pero PI3K/Akt sí se sobreactiva, aumentando la fosforilación de Bad en los residuos S136 y S112 a pesar de la disminución del ATP por la isquemia. Mientras que de forma simultánea, Bad S155 podría estar siendo fosforilada por la PKA sobreactivada. El aumento de la fosforilación de Bad en sus tres residuos, podría aumentar su asociación con la proteína 14-3-3 γ evitando la muerte celular.

5.5) Proteína de Unión a Fosfatidil Etanolamina 1

PEBPI es una proteína altamente conservada, y sus homólogos se encuentran tanto en eucariontes como en procariontes. También está presente en el citosol y en la membrana plasmática en una variedad de tejidos. En la rata, PEBP1 es altamente expresada en el tejido cerebral, regula la activación de las MAPK, el factor nuclear kappa-B. Esta proteína está involucrada en varios desórdenes humanos (Burgula, 2010).

PEBP1 también regula otras señales en células de mamíferos como las que son mediadas por receptores acoplados a proteínas G, factor nuclear NFkB y GSK3, incluyendo la respuesta al estrés oxidativo. PEBP1 fosforilada en el residuo de S153 se ha asociado con el receptor cinasa 2 acoplado a proteínas G (GRK2), bloqueando la fosforilación del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) activado y subsecuentemente la internalización del receptor, activando la señalización del receptor (Lorenz, 2003). Interesantemente encontramos a PEBP1 fosforilada en su residuo S153 en condiciones basales, lo que sugiere que en la CP en condiciones normales PEBP1 está unida a GRK2. En condiciones de ICF y de ICF/RP, PEBP1 es defosforilada, lo cual sugiere que PEBP1 se separa de GRK2 y GRK2 es liberado para contribuir a la desensibilización de GPCR.

El presente estudio mostró cambios en la fosforilación de PEBP1 en la S153 como consecuencia de isquemia temprana y la RP. Estudios posteriores son requeridos para conocer el papel de PEBP1 en la isquemia y dilucidar los mecanismos moleculares que se desencadenan en la unidad neurovascular y la activación de distintas vías, así como las modificaciones postraduccionales de PEBP1, que podrían intervenir en la neuroprotección o en el daño celular; permitiendo así realizar un mejor diagnóstico y proponer alternativas terapéuticas para evitar la propagación del daño cerebral.

Los antecedentes señalan que con estas condiciones PEBP1 defosforilada podría unirse a Raf1, inhibiendo la vía de señalización Ras/MEK/ERK. Por otro lado, se ha reportado en otros estudios que la pérdida o disminución de PEBP1 induce el estrés oxidativo; no obstante que la producción de radicales libres no se analizó

en este trabajo, observamos el daño en la morfología del tejido después de isquemia temprana, el cual es más marcado con la RP después de la isquemia, mostrando edema citotóxico y vasogénico, células picnóticas y daño en el neurópilo sugiriendo una respuesta inflamatoria, la cual reportes previos; podría estar relacionada con las vías de NFkB o de GSK3B, también reguladas por PEBP1, las cuales ocurren en respuesta a estrés oxidativo.

En la CP con ICF e ICF/RPF se observó una ligera disminución de la concentración de PEBP1, la cual podría estar relacionada con una modificación postraduccional como ubiquitinización (Al-Mulla, 2013) o por la degradación por calpainas (Chen, 2006), la cual está activada por el aumento del influjo de calcio durante la isquemia temprana. Nuestros resultados concuerdan con la disminución de los niveles de PEBP1 en la corteza cerebral de rata con hipoxia (Burgula, 2010), con hiperoxia (Hinkelbein, 2010) y con daño neuronal en células PC12 (Zuo, 2015).

Se ha encontrado en estudios previos que la fosforilación de PEBP1 en la S153 disminuye en el hipocampo de monos deprimidos (Sun, 2013). Considerando que PEBP1 es el precursor del péptido neuroestimulador colinérgico hipocampal (HCNP), el cual está involucrado en la síntesis de acetilcolina y que es capaz de estimular las neuronas centrales colinérgicas, se ha sugerido que PEBP1 puede participar en la apoptosis neuronal, en enfermedades neurodegenerativas influenciadas por ROS, así como en el cerebro en condiciones de estrés. La disminución de PEBP1 está asociada con déficit de memoria, rendimiento psicométrico e integración cognitiva (Hinkelbein, 2010; Sun, 2013; Zuo, 2015) signos que aparecen como resultado directo de un proceso isquémico en el tejido cerebral.

5.6) Proteína Nucleósido Difosfato Cinasa A

El diagnóstico temprano y la intervención terapéutica inmediata son factores importantes para reducir la extensión del daño en el tejido cerebral y el riesgo de muerte por EVC. Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular depende de la asistencia neurológica de los pacientes y de técnicas de neuroimagen incluyendo la tomografía computarizada y/o la resonancia magnética. Un marcador de diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular, capaz de diferenciar de un accidente isquémico y un hemorrágico, sería ideal para mejorar el manejo del paciente. Hay algunos marcadores biológicos que han sido estudiados como GFAP, NMDA, S100B, y Apo C-III (Marginean et al, 2011; Castellanos y Serena 2007). Aunque realmente el valor pronóstico de estas moléculas como biomarcadores está aún en discusión (Hasan et al, 2012). Previamente, estudiando el fluido cerebroespinal y el plasma sanguíneo, varias proteínas han sido observadas y consideradas como marcadoras del daño, la mayoría de ellas se localiza en las neuronas y en la célula de la glía (Allard, 2005) o también tienen un origen específico desconocido (Hill, 2005). En el caso de la proteína NDKA, esta aparece en el fluido cerebroespinal después de 3h después de la muerte (Allard, 2005), una condición considerada como un modelo de isquemia global (Finehout, 2006).

Además, NDKA aparece en el suero sanguíneo y es considerada como un marcador molecular, con una especificidad del 90%, en pacientes con tres horas de isquemia cerebral (Finehout et al., 2006; Whiteley et al., 2008; Jickling and Sharp, 2011) aunque no se ha identificado la fuente exacta de la molécula.

En células no isquémicas, NDKA produce GTP a partir de GDP y ATP, pero se ha observado que en neuronas con condiciones isquémicas, NDKA sintetiza ATP a partir de ADP y GTP permitiendo un soporte energético durante la isquemia (Lacombe et al., 2009).

Varias hipótesis se han propuesto para explicar como la NDKA alcanza el suero sanguíneo; estando localizada en las neuronas y las células de la glía podría

fugarse a través de los microvasos dañados cerca de la herida isquémica o hemorrágica. Alternativamente, la NDKA podría alcanzar el fluido cerebroespinal a través de las vellosidades aracnoideas y posteriormente alcanzar el flujo sanguíneo (Allard, 2005). Probablemente este sea un mecanismo por el cual la NDKA cambia de localización tisular, lo cual podría explicar la disminución de la proteína en el tejido cerebral. Posteriormente, para ver si la proteína se encontraba en alguno de los dos fluidos, analizamos con western blot el líquido cefalorraquídeo y el suero sanguíneo de la rata bajo condiciones de 1h de ICF y de 1h de ICF con 24h de RP sanguínea (datos no mostrados) y encontramos que con esta técnica y estos tiempos tempranos de isquemia cerebral y RP sanguínea en el hemisferio izquierdo de la rata, la proteína NDKA no aparece en estos fluidos, indicando que la NDKA necesita un tiempo más largo de isquemia cerebral para alcanzar una concentración detectable en el suero.

En este trabajo el análisis de las proteínas de la CP con isquemia temprana en un modelo *in vivo*, mostró que la proteína NDKA, involucrada en el metabolismo energético disminuyó con 1h de ICF y con ICF/RP.

Su distribución se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas, sin embargo, un análisis del líquido cefalorraquídeo y del suero sanguíneo de ratas isquémicas con 1h de ICF y con ICF/24RP no mostró a la proteína presente en estos fluidos (Datos no mostrados), lo que sugiere que la disminución no es debido a la fuga de esta proteína del tejido cerebral, sino que es debido a otro mecanismo, posiblemente al daño por radicales libres generados por la isquemia.

También se ha reportado que la NDKA podría proteger contra el estrés oxidativo, probablemente regulando la glutatión peroxidasa y p53, disminuyendo la expansión del daño (Teoh, 2014). Se ha propuesto, que la actividad exonucleasa 3'-5' de NDKA está involucrada en la reparación del DNA dañado cuando surge la isquemia (Jarret, 2012). Aunado a esto, se ha observado que la NDKA activa las MAPKs (JNK, ERK y p38) en células de leucemia mieloide estas están involucradas

directamente en la neuroprotección (Teoh, 2014). Estudios preliminares en nuestro grupo, indicaron que los niveles de JNK total no cambian, mientras que p-JNK 1/2 (T183/Y185, T221/Y223) disminuye con 1h de ICF coincidiendo con la dinámica de la NDKA, pero con ICF/RP se recuperan los niveles normales de fosforilación. En el caso de p-ERK (Y204) aumenta su fosforilación con 1h de ICF pero con ICF/RP disminuye recuperando sus niveles normales. No se encontraron cambios en los niveles de p38 en estas condiciones de isquemia temprana. Estudios posteriores son necesarios para analizar la relación entre NDKA y las MAPKs con ICF temprana e ICF/RP.

Este estudio mostró que en la CP de la rata sometida a la isquemia temprana *in vivo* (1h), cambios en la NDKA son detectables; estos cambios son visibles con ICF/RP. Sería interesante investigar los mecanismos moleculares durante la isquemia temprana para diseñar mejores diagnósticos y alternativas terapéuticas evitando la expansión del daño cerebral.

6) Conclusiones

6.1) Proteína 14-3-3 γ

- La proteína 14-3-3 γ al igual que la proteína Bad total y fosforilada en sus tres residuos (S112, S136 y S155) aumentan su concentración con 1h de ICF y disminuyen con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en la CP de la rata.
- La proteína 14-3-3 γ con peso molecular de 30 kDa y pI 5.5 presentó cambios de concentración en la CP de la rata con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea.
- 14-3-3 γ se localiza en el citoplasma de las neuronas de la CP de la rata aumentando con 1h de ICF y disminuyendo con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en dicho compartimento.
- La proteína PI3K total permanece constante, mientras que la forma fosforilada aumenta con 1h de ICF en la CP de la rata

6.2) Proteína de Unión a Fosfatidil Etanolamina

- PEBP1 presenta tres especies que cambian su localización modificando su pI pero no en la concentración total con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en la CP de la rata.
- PEBP1 se localiza en el citoplasma de las neuronas y de los astrocitos en la CP de la rata bajo condiciones normales.
- La fosforilación de PEBP1 en el residuo S153 disminuye con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en la CP de la rata.

6.3) Proteína Nucleósido Difosfato Cinasa A

- La proteína NDKA disminuyó su concentración con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en la CP de la rata.
- La proteína NDKA se localiza en el núcleo y el citoplasma de las neuronas de la CP de la rata disminuyendo con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea.
- La proteína NDKA no se encontró en el suero sanguíneo ni en el líquido cefalorraquídeo de la rata con 1h de ICF ni con 1h de ICF y RP

7) Perspectivas del proyecto de investigación

7.1) 14-3-3 γ

- Analizar la asociación con inmunoprecipitación entre la proteína 14-3-3 γ y la proteína Bad fosforilada en sus residuos S112, S136 y S155 con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en la CP de la rata.

7.2) PEBP1

- Inmunolocalizar a PEBP1 S153 y comparar su distribución en el citoplasma de las neuronas y los astrocitos bajo las 4 condiciones experimentales de ICF y RP sanguínea tempranas.
- Analizar la asociación con inmunoprecipitación de PEBP1 con otras proteínas para conocer los cambios de asociación con 1h de ICF y con 1h de ICF más 24h de RP sanguínea en la CP de la rata.

7.3) NDKA

- Analizar la interacción de NDKA con otras proteínas para definir su posible papel con 1h de ICF y 1h de ICF con 24h de RP sanguínea.

8) Referencias bibliográficas

- Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P, Burgess JA, Walter N, Hochstrasser DF, Sanchez JC. PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma markers for the early diagnosis of stroke. *Clin Chem.* 2005 Nov; 51(11):2043-51.
- Al-Mulla F, Bitar MS, Taqi Z, Yeung KC. RKIP: much more than Raf kinase inhibitory protein. *J Cell Physiol.* 2013; 228(8):1688-1702.
- Arango-Dávila C., Escobar Betancourt M., Buritica E., Pimienta H. Exofocal changes in experimental focal cerebral ischemia: an experimental approach and its clinical correlation. *Colombia Médica* 2008; 39 :(3):85-94.
- Arango-Dávila C., Escobar-Betencourt M., Cardona-Gómez G.P., Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol.* 2004. 39:156-165.
- Bratthauer G.L., Adams L.R., Immunohistochemistry: antigen detection in tissue, in: U.V. Mikel (Ed), *Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology*, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC, 1994, pp 1-30.
- Buga AM, Scholz CJ, Kumar S, Herndon JG, Alexandru D, Cojocaru GR, Dandekar T, Popa-Wagner A. Identification of new therapeutic targets by genome-wide analysis of gene expression in the ipsilateral cortex of aged rats after stroke. *PLoS One.* 2012; 7 (12):e50985.
- Burgula S, Medisetty R, Jammulamadaka N, Musturi S, Ilavazhagan G, Singh SS. Downregulation of PEBP1 in Rat Brain Cortex in Hypoxia. *J Mol Neurosci.* 2010 Aug 25.
- Busija DW, Katakam PV. Mitochondrial Mechanisms in Cerebral Vascular Control: Shared Signaling Pathways with Preconditioning. *Journal of vascular research.* 2014; 51 (3):175-189.

- Capdeville C, Pruneau D, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Naloxone effect on the neurological deficit induced by forebrain ischemia in rats. *Life Sci.* 1986 Feb 3; 38(5):437-42.
- Castellanos M, Serena J. Applicability of biomarkers in ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2007. 24 Suppl 1:7-15.
- Chalouhi N, Ali MS, Starke RM, et al. Cigarette Smoke and Inflammation: Role in Cerebral Aneurysm Formation and Rupture. *Mediators of Inflammation.* 2012; 2012:271582.
- Chen JH, Kuo HC, Lee KF, Tsai TH. Global proteomic analysis of brain tissues in transient ischemia brain damage in rats. *Int J Mol Sci.* 2015 May 26; 16(6):11873-91.
- Chen P, Li X, Sun Y, Liu Z, Cao R, He Q, Wang M, Xiong J, Xie J, Wang X, Liang S. Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. *J Neurochem.* 2006 Aug; 98(4):1126-40.
- Chen XQ, Fung YW, Yu AC. Association of 14-3-3gamma and phosphorylated bad attenuates injury in ischemic astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Mar; 25(3):338-47.
- Chen XQ, Yu AC. The association of 14-3-3gamma and actin plays a role in cell division and apoptosis in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 23; 296(3):657-63.
- Danial NN. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* 27 Suppl. 2009. 1:S53-70.
- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell.* 2000 Jul; 6(1):41-51.
- Del Zoppo GJ. Plasminogen Activators and Ischemic Stroke: Conditions for Acute Delivery. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2013; 39(4):406-425.

- Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Alvarez Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society. *Rev Neurol* 2001 33 (5): 455-464.
- Engel T, Plesnila N, Prehn JH, Henshall DC. In vivo contributions of BH3-only proteins to neuronal death following seizures, ischemia, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 May; 31(5):1196-210.
- Famakin BM. The Immune Response to Acute Focal Cerebral Ischemia and Associated Post-stroke Immunodepression: A Focused Review. *Aging and Disease.* 2014; 5(5):307-326.
- Finehout EJ, Franck Z, Relkin N, Lee KH. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval. *Clin Chem.* 2006 Oct; 52(10):1906-13.
- Hasan N, McColgan P, Bentley P, Edwards RJ, Sharma P. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2012. 74: 230-240.
- Hill MD. Diagnostic biomarkers for stroke: a stroke neurologist's perspective. *Clin Chem.* 2005 Nov; 51(11):2001-2.
- Hinkelbein J, Feldmann RE Jr, Kalenka A. Time-dependent alterations of cerebral proteins following short-term normobaric hyperoxia. *Mol Cell Biochem* 2010; **339**: 9-21
- Houg AK, Wang D, Reed GL. Reversing the deleterious effects of α 2-antiplasmin on tissue plasminogen activator therapy improves outcomes in experimental ischemic stroke. *Exp Neurol.* 2014 May; 255:56-62.
- Jarrett SG, Novak M, Dabernat S, Daniel JY, Mellon I, Zhang Q, Harris N, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, Kovacic D, Slominski A, Kaetzel DM. Metastasis Suppressor NM23-H1 Promotes Repair of UV-Induced DNA Damage and Suppresses UV-Induced Melanomagenesis. 2012. *Cancer Res* 72:133-143

- Jayaraman T, Tejero J, Chen BB, Blood AB, Frizzell S, Shapiro C, Tiso M, Hood BL, Wang X, Zhao X, Conrads TP, Mallampalli RK, Gladwin MT. 14-3-3 binding and phosphorylation of neuroglobin during hypoxia modulate six-to-five heme pocket coordination and rate of nitrite reduction to nitric oxide. *J Biol Chem*. 2011 Dec 9; 286(49):42679-89.
- Jickling GC, Sharp FR. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics* 2011. 8:349-360.
- Jie P, Hong Z, Tian Y, Li Y, Lin L, Zhou L, Du Y, Chen L, Chen L. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 induces apoptosis in hippocampus through downregulating PI3K/Akt and upregulating p38 MAPK signaling pathways. *Cell Death Dis*. 2015 Jun 4; 6: e1775.
- Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, Chan PH. Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2009 May 27; 29(21):7003-14.
- Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*. 2014; 2: 702-714.
- Karsani SA, Saihen NA, Zain RB, Cheong S-C, Abdul Rahman M. Comparative proteomics analysis of oral cancer cell lines: identification of cancer associated proteins. *Proteome Science*. 2014; 12:3
- Kim JY, Kawabori M, Yenari MA. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. *Current medicinal chemistry*. 2014; 21(18):2076-2097.
- Lacombe ML, Tokarska-Schlattner M, Epand RF, Boissan M, Epand RM, Schlattner U. Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie*. 2009 Jun; 91(6):779-83.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15; 227(5259):680-5.

- Laureys G, Valentino M, Demol F, Zammit C, Muscat R, Cambron M, Kooijman R, De Keyser J. β_2 -adrenergic receptors protect axons during energetic stress but do not influence basal glio-axonal lactate shuttling in mouse white matter. *Neuroscience*. 2014 Sep 26; 277:367-74.
- Li P, Su L, Li X, Di W, Zhang X, Zhang C, He T, Zhu X, Zhang Y, Li Y. Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury via upregulating expression of Nrf2, HO-1, NQO-1 in mice. *Int J Neurosci*. 2015 May 22:1-28.
- Liaw WJ, Tsao CM, Huang GS, Wu CC, Ho ST, Wang JJ, Tao YX, Shui HA. Phosphoproteomics and bioinformatics analyses of spinal cord proteins in rats with morphine tolerance. *PLoS One*. 2014 Jan 2;9(1):e83817.
- Liu H, Li J, Zhao F, Wang H, Qu Y, Mu D. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev Neurosci*. 2015 26(1):105-17.
- Liu K, Yan M, Zheng X, Yang Y. The dynamic detection of NO during the ischemic postconditioning against global cerebral ischemia/reperfusion injury. *Nitric Oxide*. 2014 Apr 30; 38:17-25.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan; 20(1):84-91.
- Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 2003; **426**: 574-579.
- Marginean I, Stanca D, Vacaras V, Soritau O, Margiean M, Muresanu D. Plasmatic markers in hemorrhagic stroke . *Journal of Medicine and Life*. 2011; 4(2):148-150.
- Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins lectroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem*. 1987 Jul 25; 262(21):10035-8.
- Mergenthaler P, Meisel A. Do stroke models model stroke? *Disease Models & Mechanisms*. 2012;5 (6):718-725.

- Montaner J. Et. Al. Fisiopatología de la isquemia cerebral, 1ª Ed. España: editorial Marge Medica Books; 2007. P. 13-30.
- Morin-Leisk J, Lee TH. Nucleotide-dependent self-assembly of Nucleoside Diphosphate Kinase (NDPK) in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2008. Dec; 1784(12):2045-51.
- Muimo R, Crawford RM, Mehta A. Nucleoside diphosphate kinase A as a controller of AMP-kinase in airway epithelia. *J Bioenerg Biomembr*. 2006. 38:181-187.
- Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*. 2005 Jun;50(4):281-6. Review.
- Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, Okami N, Chan PH. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1802(1):92-9.
- Ning M, Lopez M, Cao J, Buonanno FS, Lo EH. Application of proteomics to cerebrovascular disease. *Electrophoresis*. 2012; 33(24):10.1002/elps.201200481.
- Ohi N, Nishikawa Y, Tokairin T, Yamamoto Y, Doi Y, Omori Y, Enomoto K. Maintenance of Bad phosphorylation prevents apoptosis of rat hepatic sinusoidal endothelial cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 2006 Apr; 168(4):1097-106.
- Ortiz-Plata Alma, Nader-Kawachi Juan, Guevara Jorge, Sandoval Carlos, Rembao Daniel, Jorge Guevara, Hernández Hernández Fidel de la Cruz. EGP-314 is expressed differentially in three brain zones at an early time in an experimentally induced ischemia rat model. *Mol Brain*. 2005. Res 137:55-62.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet I. Nitric oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological reviews*. 2007; 87 (1):315-424.
- Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, Hoyte LC, Nagel S, McMenemy MM, Tsaknakis G, Watt SM, Drakesmith CW, Chen R, Wood MJ, Zhao Z, Kessler

- B, Vekrellis K, Buchan AM. Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. *Nat Med.* 2013 Mar; 19(3):351-7.
- Pascual JM, González LF, Cerdán S, Carceller F. y Roda JM. Fisiopatología de las células gliales en la isquemia cerebral. *Neurocirugía* 2000; 11:247-259.
 - Peña TP. Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna. *REV. Neurol.* 2004. 1011-1016.
 - Pérez E, Gallegos JL, Cortés L, Calderón KG, Luna JC, Cázares FE, Velasquillo MC, Kouri JB, Hernández FC. Identification of latexin by a proteomic analysis in rat normal articular cartilage. *Proteome Sci.* 2010 Jun 5; 8:27.
 - Pivovarova NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *The FEBS journal.* 2010; 277(18):3622-3636.
 - Porter GW, Khuri FR, Fu H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol.* 2006. 16:193-202.
 - Qiao H, Foote M, Graham K, Wu Y, Zhou Y. 14-3-3 Proteins Are Required for Hippocampal Long-Term Potentiation and Associative Learning and Memory. *The Journal of Neuroscience.* 2014; (14):4801-4808.
 - Radhakrishnan VM, Martinez JD. 14-3-3gamma induces oncogenic transformation by stimulating MAP kinase and PI3K signaling. *PLoS One.* 2010 Jul 2; 5 (7):e11433.
 - Ritzel RM, Capozzi LA, McCullough LD. Sex, Stroke, and Inflammation: The potential for Estrogen-mediated immunoprotection in stroke. *Hormones and behavior.* 2013; 63(2):238-253.
 - Roda JM, Et. Al. Modelos experimentales en isquemia cerebral. *Neurología.* 1998. Vol. 13, No. 9. Nov.
 - Sakata H, Fujimura M, Mugikura S, Sato K, Tominaga T. Local Vasogenic Edema without Cerebral Hyperperfusion after Direct Revascularization Surgery for Moyamoya Disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015 May 6.

- Sánchez Hernández Hugo. 2010. Análisis proteómico de las modificaciones producidas por la isquemia cerebral focal en un modelo de rata. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV-IPN. México, Distrito Federal.
- Shimada T, Fournier AE, Yamagata K. Neuroprotective Function of 14-3-3 Proteins in Neurodegeneration. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:564534. Epub 2013 Dec 2. Review.
- Sluchanko NN, Chebotareva NA, Gusev NB. Modulation of 14-3-3/phosphotarget interaction by physiological concentrations of phosphate and glycerophosphates. *PLoS One.* 2013 Aug 19; 8(8):e72597.
- Starke RM, Chalouhi N, Ali MS, et al. The Role of Oxidative Stress in Cerebral Aneurysm Formation and Rupture. *Current neurovascular research.* 2013; 10 (3):247-255.
- Stetler RA, Leak RK, Gan Y, et al. Preconditioning Provides Neuroprotection in Models of CNS Disease: Paradigms and Clinical Significance. *Progress in neurobiology.* 2014; 0:58-83.
- Stutzmann GE, Mattson MP. Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Handling in Excitable Cells in Health and Disease. Sibley DR, ed. *Pharmacological Reviews.* 2011; 63(3):700-727.
- Sun Y, Luo ZM, Zheng MJ, Liu X. Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1) as a potential target for the treatment for depression. *CNS Neurosci Ther* 2013; 19: 982-983.
- Sun Y-Y, Yang D, Kuan C-Y. Mannitol-facilitated perfusion staining with 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) for detection of experimental cerebral infarction and biochemical analysis. *Journal of Neuroscience Methods.* 2012; 203(1):122-129.
- Svoboda DS, Kawaja MD. Changes in hepatic protein expression in spontaneously hypertensive rats suggest early stages of non-alcoholic fatty liver disease. *J Proteomics.* 2012 Mar 16; 75(6):1752-63.
- Tavel L, Jaquillard L, Karsisiotis AI, Saab F, Jouvencal L, Brans A, Delmas AF, Schoentgen F, Cadene M, Damblon C. Ligand binding study of human

PEBP1/RKIP:interaction with nucleotides and Raf-1 peptides evidenced by NMR and mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(4):e36187.

- Taxin ZH, Neymotin SA, Mohan A, Lipton P, Lytton WW. Modeling Molecular Pathways of Neuronal Ischemia. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014; 123:249-275.
- Teoh J, Boulos S, Chieng J, Knuckey NW, Meloni BP. Erythropoietin increases neuronal NDPKA expression, and NDPKA up-regulation as well as exogenous application protects cortical neurons from in vitro ischemia-related insults. *Cell Mol Neurobiol*. 2014 Apr; 34(3):379-92.
- Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012; 32(7):1332-1346.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Toyo-oka K, Wachi T, Hunt RF, et al. 14-3-3 ϵ and ζ Regulate Neurogenesis and Differentiation of Neuronal Progenitor Cells in the Developing Brain. *The Journal of Neuroscience*. 2014; 34(36):12168-12181.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Sibley D, ed. *Pharmacological Reviews*. 2010; 62(3):405-496.
- Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touzé E. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011; 31 (11):2119-2134.
- Wang Y, Dong X, Li Z, Wang W, Tian J, Chen J. Downregulated RASD1 and upregulated miR-375 are involved in protective effects of calycosin on cerebral ischemia/reperfusion rats. *J Neurol Sci*. 2014 Apr 15; 339 (1-2):144-8.

- Wang Y, Dong X, Li Z, Wang W, Tian J, Chen J. Downregulated RASD1 and upregulated miR-375 are involved in protective effects of calycosin on cerebral ischemia/reperfusion rats. *J Neurol Sci.* 2014 Apr 15; 339 (1-2):144-8.
- Wang Y, Li Q, Wang J, Zhuang QK, Zhang YY. Combination of thrombolytic therapy and neuroprotective therapy in acute ischemic stroke: is it important? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(3):416-22.
- Warford A, Akbar H, Riberio D. Antigen retrieval, blocking, detection and visualisation systems in immunohistochemistry: A review and practical evaluation of tyramide and rolling circle amplification systems. *Methods.* 2014. pii: S1046-2023(14)00094-2.
- Whiteley W, Tseng MC Sandercock P. Blood Biomarkers in the Diagnosis of Ischemic Stroke A Systematic Review. *Stroke*, 2008; 39:2902-2909.
- Wu HW, Li HF, Wu XY, Zhao J, Guo J. Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2008 Feb 20; 432(2):83-7.
- Xin Q, Ji B, Cheng B, Wang C, Liu H, Chen X, Chen J, Bai B. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2014 Mar; 68: 18-27.
- Yang W, Sheng H, Thompson JW, Zhao S, Wang L, Miao P, Liu X, Moseley MA, Paschen W. Small ubiquitin-like modifier 3-modified proteome regulated by brain ischemia in novel small ubiquitin-like modifier transgenic mice: putative protective proteins/pathways. *Stroke.* 2014 Apr; 45(4):1115-22.
- Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, Shimizu K, Asai T, Asakawa T, Kan T, Yamada S, Ohizumi Y, Oku N. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Res.* 2014 Apr 22; 1559: 46-54.
- Yokota N, Uchijima M, Nishizawa S, Namba H, Koide Y. Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global

cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction. *Stroke*. 2001 Jan; 32(1):168-74.

- Zhan H, Li S, Sun J, Liu R, Yan F, Niu B, Zhang H, Wang X. Lettuce glycoside B ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury by increasing nerve growth factor and neurotrophin-3 expression of cerebral cortex in rats. *Indian J Pharmacol*. 2014 Jan-Feb; 46(1):63-8.
- Zille M, Farr TD, Przesdzing I, et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012; 32 (2):213-231.
- Zuo H, Lin T, Wang D, Peng R, Wang S, Gao Y, Xu X, Zhao L, Wang S, Su Z. RKIP Regulates Neural Cell Apoptosis Induced by Exposure to Microwave Radiation Partly Through the MEK/ERK/CREB Pathway. *Mol Neurobiol* 2015; 51: 1520-1529.