

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE  
CHOQUE TÉRMICO HSP70 DURANTE EL DAÑO  
OXIDATIVO INDUCIDO CON ETANOL Y  
MODIFICADO POR ANTIINFLAMATORIOS NO  
ESTEROIDEOS (AINEs) EN LINFOCITOS DE  
RATA.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL  
GRADO ACADÉMICO DE  
**M A E S T R O E N**  
**CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)  
**P R E S E N T A:**  
**ALVARO ADRIAN SANDOVAL MONTIEL**

DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARTHA ZENTELA MAYER



COORDINACIÓN

Enero, 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

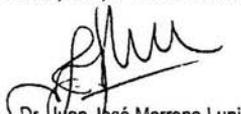
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de octubre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Sandoval Montiel Alvaro Adrián, con número de cuenta 92577860, con la tesis titulada: "Participación de las proteínas de choque térmico HSP70 durante el daño oxidativo inducido con etanol y modificado por antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en linfocitos de rata", bajo la dirección del(a) M. en C. Martha Zentella Mayer.

Presidente: Dra. Carmen Gómez Eichelmann  
Vocal: Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Secretario: Dra. Martha Zentella Mayer  
Suplente: Dra. Aida Uribe Medina  
Suplente: Dr. Rolando Hernández Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de diciembre de 2003.

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alvaro Adrián Sandoval Montiel  
FECHA: 15/ Enero / 2004  
FIRMA: Silva

c.c.p. Expediente del interesado

## APOYOS RECIBIDOS

BECA COMPLEMENTARIA DGEP DE SEPTIEMBRE 2001 A  
AGOSTO 2003

BECA CONACYT (NÚMERO DE BECARIO 167149) DE SEPTIEMBRE  
2001 A AGOSTO 2003

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL PROYECTO PAPIIT  
IN-214101 DGAPA-UNAM

Gracias al Comité Tutorial :

Dra. Martha Zentella Mayer

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dra. Carmen Gómez Eichelmann

Dra. Aída Uribe Medina

## AGRADECIMIENTOS

Al M.V.Z. Enrique Moreno Hernández por el asesoramiento y apoyo técnico en el manejo de los animales.

Al Biólogo José Luis Ventura Gallegos por el asesoramiento y apoyo técnico.

Al M. en C. Héctor Vázquez Meza por el asesoramiento y apoyo técnico.

A la infraestructura del Laboratorio 204 S de la Instituto de Fisiología Celular a cargo del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

## Dedicatoria

A mis Padres.

A mi tutora Dra. Martha Zentella por todo su apoyo y confianza que me brindo desde mi trabajo de Licenciatura y Maestría.

Al Dr. Enrique Piña Garza por su apoyo y criticas a mi trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio, Nora, Deyamira, Héctor, Enrique, Dra. Yolanda, por su ayuda y amistad.

A Nora por tu amistad y apoyo.

A Deyamira por tu amistad y apoyo.

Al Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, por todas las facilidades que me brindaron en mi trabajo.

Al laboratorio 34 de posgrado de Medicina ya que sus criticas nutrieron mi trabajo.

A mis compañeros del posgrado de Ciencias Biológicas ya que compartimos muchos momentos que nos ayudaron a formarnos como investigadores, a Giovanna, Marisol, Elisa, Alberto y tantos otros que les agradezco su amistad.

Al posgrado de Ciencias Biológicas.

A las personas del Laboratorio 204S de IFC por su apoyo y amistad.

## Índice

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>Abstract.....</b>             | <b>1</b>  |
| <b>Resumen.....</b>              | <b>2</b>  |
| <b>Abreviaturas.....</b>         | <b>3</b>  |
| <b>Introducción.....</b>         | <b>4</b>  |
| <b>Familias de las HSPs.....</b> | <b>8</b>  |
| HSPs pequeñas.....               | 8         |
| HSP40.....                       | 9         |
| HSP60.....                       | 9         |
| HSP70.....                       | 10        |
| HSP90.....                       | 12        |
| HSP100.....                      | 12        |
| Regulación de la HSP70.....      | 13        |
| <b>Antecedentes.....</b>         | <b>17</b> |
| <b>Hipótesis.....</b>            | <b>20</b> |
| <b>Objetivos.....</b>            | <b>21</b> |
| Objetivo general.....            | 21        |
| Objetivos particulares.....      | 21        |
| <b>Materiales y métodos.....</b> | <b>23</b> |
| Tratamiento de los animales..... | 23        |
| Obtención de los linfocitos..... | 23        |
| Ensayo de carbonilos.....        | 24        |
| Choque térmico.....              | 25        |
| Western blot.....                | 25        |
| Ensayo de mortalidad.....        | 26        |
| <b>Resultados.....</b>           | <b>27</b> |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>Discusión.....</b>    | <b>41</b> |
| <b>Conclusiones.....</b> | <b>49</b> |
| <b>Perspectivas.....</b> | <b>50</b> |
| <b>Bibliografía.....</b> | <b>52</b> |

## Abstract

In response to many disturbances most somatic cells mount a stress response with induction of a variety of proteins, most notably the 70-kDa heat shock protein (HSP70), which is capable of protecting cells from a subsequent, normally lethal temperature increase (42 °C), as well as from numerous disease states or oxidative stress. Therefore, it would be of great therapeutic benefit to discover safe compounds able to induce HSP70. Previous works have showed that the use of aspirin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, prevents the hepatic increase of Triacylglycerides (TGA) and Thiobarbitutic acid reactive substances (TBARS) observed after acute ethanol intoxication. The aim of this study was determinate if aspirin modifies the expression of HSP70 in rat lymphocytes and if this coincides with protection against oxidative stressors. Male Wistar rats were fasted overnight before treatment. Aspirin was given orogastrically, after 0.5, 1, 2, 5, 24 h the animals were sacrificed and the blood globular package was obtained by centrifugation, lymphocytes were obtained by a histopaque gradient. A group of fasted rats was used as control. Aspirin show protection against ethanol in lymphocytes measured as carbonyl protein content. The content of HSP70 in lymphocytes was estimated by Western Blot, in aspirin treatment protein expression appears earlier end reach higher levels compared with control. Lymphocytes derived from aspirin treated animals presented increased resistance against the toxic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 μM) or ethanol (100 mM) compared with controls.

## Resumen

En respuesta a muchas perturbaciones, la mayoría de las células somáticas desencadenan una respuesta al estrés mediante la inducción de una variedad de proteínas, particularmente la proteína de choque térmico de 70-kDa (HSP70), que es capaz de proteger a las células contra un aumento comúnmente letal de la temperatura (42°C), así como de numerosos estados de enfermedad o de tensión oxidativa. Por lo tanto, sería de gran beneficio terapéutico el empleo de compuestos seguros, capaces de inducir HSP70. Trabajos previos han demostrado que el uso de la aspirina, una droga antiinflamatoria no-esteroides, previene el aumento hepático de triacilgliceridos (TGA) y de lipoperoxidación, medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), observados después de la intoxicación alcohólica aguda. La finalidad de este estudio es determinar si la aspirina modifica la expresión de HSP70 en linfocitos de la rata y si ésta coincide con la protección contra agentes oxidativos. Ratas Wistar macho fueron ayunadas durante la noche antes del tratamiento. La aspirina se administró por vía oral y después de 0.5, 1, 2, 5, 24 h del tratamiento los animales fueron sacrificados, el paquete globular se obtuvo por centrifugación y los linfocitos fueron separados por un gradiente con histopaque. Un grupo de ratas en ayunas fue utilizado como control. La aspirina evitó el aumento del contenido de proteínas con grupos carbonilos en linfocitos después de 5 horas de tratamiento. Cuando el contenido de HSP70 en linfocitos de ratas, fue medido por Western blot, en el grupo tratado con aspirina la expresión de la proteína aparece más pronto y alcanza niveles más altos en comparación con el grupo control. Los linfocitos derivados de animales tratados con aspirina se observa resistencia contra el efecto tóxico de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25µM) o de etanol (100 mM) comparado contra controles.

## Abreviaturas

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>2,4DNPH</b>  | <b>2,4 Dinitrofenil hidrazina</b>                   |
| <b>CT</b>       | <b>Choque térmico</b>                               |
| <b>HRP</b>      | <b>Horse Radish Peroxidase</b>                      |
| <b>HSE</b>      | <b>Elemento de choque térmico</b>                   |
| <b>HSF</b>      | <b>Factor de Choque térmico</b>                     |
| <b>HSP</b>      | <b>Proteína de choque térmico</b>                   |
| <b>PBS</b>      | <b>Solución de buffer de fosfatos</b>               |
| <b>ROS</b>      | <b>Especies reactivas del oxígeno</b>               |
| <b>RPMI</b>     | <b>Medio de cultivo RPMI 1640</b>                   |
| <b>SDS-PAGE</b> | <b>Gel de poliacrilamida desnaturalizante</b>       |
| <b>T0</b>       | <b>Tiempo cero</b>                                  |
| <b>TAGs</b>     | <b>Triacilgliceroles</b>                            |
| <b>TBARs</b>    | <b>Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico</b> |
| <b>TCP</b>      | <b>Polipéptidos del complejo-T</b>                  |

## Introducción

La expresión elevada de proteínas de estrés o choque térmico (HSP), se da en respuesta a diversas condiciones de estrés. Muchas proteínas de estrés son expresadas constitutivamente y están localizadas en diferentes compartimentos celulares. Existen evidencias genéticas y bioquímicas que involucran a las proteínas de estrés en diversos eventos: la biosíntesis de proteínas, arreglo proteico, ensamblaje y transporte de proteínas a través de membranas (Rakonczay, et al 2003).

En la mayoría de las células, el nivel primario de la regulación del gen de choque térmico ocurre vía la activación transcripcional del elemento de choque térmico (HSE), una secuencia promotora compuesta de arreglos contiguos del pentanucleótido (nGAAn) orientada en forma alternada (Morimoto, 1993). El factor de choque térmico (HSF) el cual se une al HSE de manera secuencia-específica (Figura 1 y 2). En las células de eucariontes, el HSF se activa través de la exposición de las células a estrés fisiológico. La activación del HSF incluye la conversión de este factor a un complejo oligomérico el cual se trasloca al núcleo y se une al DNA.

Los genes que codifican al HSF han sido aislados en diversos organismos: levaduras, *Drosophila melanogaster*, tomates, ratones, aves, humanos. Las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis* y *Drosophila melanogaster* tienen un solo gen de HSF. Recientemente, se reportó que en un buen número de especies, incluyendo tomates, ratones y aves, humano, existen genes múltiples de HSF (Sarge, KD et al 1993).

La respuesta al choque térmico se observó por primera vez en las glándulas salivares de larvas de *Drosophila melanogaster* expuestas a un aumento de la temperatura (Ritossa, 1962). Se notó que calentando las células de 25 a 30° C se inducía la formación de ensanchamientos o "puffs" en regiones específicas de los cromosomas politénicos. Estos "puffs" reflejan la activación transcripcional de genes específicos, los cuales codifican para un grupo de proteínas llamadas "Heat Shock Proteins" HSP. A pesar de que las HSPs se identificaron originalmente sobre la base de su inducción por temperaturas elevadas, ellas pueden ser inducidas por una amplia variedad de estímulos no térmicos (p. ej. metales pesados, infecciones, etanol, alcoholes alifáticos, antibióticos, anestésicos locales, isquemia, especies reactivas de oxígeno, hipoxia, citocinas, PGF, TNF $\alpha$ , ésteres

de forbol, etc.) (Morimoto et al, 1992). Las HSPs son, por lo tanto también llamadas (más apropiadamente) proteínas de estrés.

Las HSPs son proteínas citoprotectoras y pueden inducir termotolerancia y están presentes en todas las especies. Tienen funciones esenciales en plegamiento, transporte, translocación, degradación y ensamblaje de proteínas, transducción de señales, regulación de la expresión génica, por lo que son también llamadas chaperonas (Hightower LE 1991, Welch WJ 1992, Minowada G, 1995). Como consecuencia de las condiciones de estrés, muchas proteínas sufren cambios parciales o son completamente desnaturalizadas (Minowada G, 1995). Las HSPs reconocen esto, se unen a las proteínas dañadas, las estabilizan y repliegan, así previenen o disuelven agregaciones irreversibles (Smith et al., 1998). De hecho, muchos investigadores han sugerido que las chaperonas pueden trabajar en grupo para facilitar el proceso de plegamiento (Morimoto 1993).

Puede decirse que las proteínas de choque térmico (HSP) son un grupo de proteínas altamente conservado inducibles en respuesta a diversas formas de estrés ambiental y fisiológico, como elevación de temperatura, análogos de aminoácidos, metales pesados, y etanol

entre otros (Calabrese, et al, 1996; Morimoto, et al, 1996; De Maio, 1999). Estas proteínas están organizadas en familias de acuerdo a su masa molecular relativa de aproximadamente 100, 90, 70, 60, y las pequeñas (8-34 kDa), respectivamente (Mager y De Kruijff, 1995 Leppä and Sistonen, 1997). (Tabla 1).

| Familia              | Miembros              | Localización celular | Funciones   |
|----------------------|-----------------------|----------------------|---|
| HSP pequeñas         | Ubiquitina            | Citosol/núcleo       | Involucrada en la degradación proteica no lisosomal   |
|                      | HSP10                 | Mitocondria          | Co-chaperona de la HSP60  |
|                      | $\alpha$ B-cristalino | Citosol              | Se asocia y estabiliza elementos del citoesqueleto  |
|                      | HSP27                 | Citosol/núcleo       | Estabiliza los microfilamentos, regula el citoesqueleto de actina.  |
|                      | HSP32                 | Citosol              | También llamada heme oxigenasa-1, catabolismo heme, propiedades antioxidantes.  |
| HSP40                | HSP40                 | Citosol/núcleo       | Co-chaperona de HSP70   |
| HSP60 (chaperoninas) | HSP60                 | Mitocondria          | Se une a polipéptidos parcialmente plegados y asiste a su correcto plegamiento, también encontrada dentro de los gránulos pancreáticos zimógenos. |
|                      | TCP (CCT)             | Citosol              | Los substratos específicos incluyen actina y tubulina   |
| HSP70                | HSP72 (HSP70)         | Citosol/núcleo       | Altamente inducibles por estrés.  |
|                      | HSP73 (HSC70)         | Citosol/núcleo       | Se expresa constitutivamente  |
|                      | GRP75                 | Mitocondria          | Involucrada en la translocación de precursores de proteínas a través de las membranas mitocondriales.   |
|                      | GRP78                 | RE                   | Tiene un rol en el ensamblaje de proteínas secretoras.  |
| HSP90                | HSP90 $\alpha$        | Citosol              | 1-2% del total de las proteínas citoplasmáticas solubles, papel importante en la función del receptor hormonal esteroide                          |
|                      | HSP90 $\beta$         | Citosol              |   |
|                      | GRP94                 | RE                   | Chaperona en la unión del calcio  |
| HSP100               | Hsp100                | Citosol/núcleo       | Involucrada en disolver agregados y en facilitar la proteólisis, en la termotolerancia.   |

Tabla 1. Principales familias de HSP, su localización y funciones principales (tomado de Rakonczay et al 2003)

## Familias de las HSPs

### HSPs pequeñas

Las HSP pequeñas contienen dominios  $\alpha$ -cristalinos muy conservados y no son proteínas de unión a ATP (Jakob et al., 1993; Buchner, 1996.). Una característica importante es su oligomerización en grandes agregados intracelulares. La ubiquitina, probablemente la más pequeña de las HSP (8.5 kDa), aumenta su expresión ante una elevación de la temperatura. Esta proteína desempeña un papel importante en la estructura de la cromatina y en la degradación proteica. HSP10 sirve como una co-chaperona para la HSP60 en el plegamiento y ensamblaje de proteínas mitocondriales. La proteína  $\alpha$ B-cristalino se expresa constitutivamente y además puede ser inducida por estrés calórico, oxidativo, etc... (Klemenz et al., 1991); más aún, está frecuentemente asociado con elementos del citoesqueleto y su estabilización. La HSP27 está presente en el citosol en condiciones fisiológicas, y se transloca al núcleo durante condiciones de estrés. La proteína se expresa a niveles relativamente bajos en células normales, pero exhibe una gran inducción bajo estrés oxidativo, calórico, etc. La HSP27 es fosforilada por la cinasa MAP p38 y por la MAPK/AP 2/3-cinasa en respuesta a estrés. Esto

estabiliza los microfilamentos de las células. La HSP27 puede ayudar en el plegamiento de proteínas después de un daño oxidativo, calórico, etc... (Huot et al., 1996). La HSP32 (hemo-oxigenasa-1), es un potente antioxidante y se ha determinado que desempeña un papel crítico en el mecanismo anti-estrés de la inflamación.

### **HSP40**

La HSP40 es una co-chaperona de la HSP70. Desempeña una función llevando substratos marcados a las HSP70, para el ensamblaje y translocación de la membrana y degradación de proteínas

### **HSP60**

Las proteínas de la familia HSP60 (también llamadas chaperoninas) son predominantemente proteínas mitocondriales (Minowada and Welch, 1995; Buchner, 1996, Bukau and Horwich, 1998), pero también pueden encontrarse en granulos zimógenos

pancreáticos. Las HSP60 al parecer están asociadas con ciertas enzimas pancreáticas de la ruta secretora, como la amilasa, lipasa y el quimotripsinógeno, sugiriendo un papel importante en la secreción de esas proteínas (Velez-Granell et al., 1994). La familia de las HSP60 está involucrada en el plegamiento correcto y ensamblaje de proteínas pancreáticas secretoras. Más aún, pueden prevenir la agregación y autoactivación prematura de las enzimas. Su estructura está conformada por 2 anillos de siete subunidades, y cada anillo rodea una cavidad central en donde se lleva a cabo el plegamiento de proteínas y es un proceso dependiente de ATP (Minowada and Welch, 1995). El compartimiento citoplásmico está formado de proteínas, llamadas polipéptidos del complejo-T (TCPs), que tienen poca homología con las HSP60 (Kubota et al., 1994). Las TCPs están formadas de anillos dobles de 8 o 9 miembros. Los substratos específicos de las TCPs son actina y tubulina.

## **HSP70**

Las HSP70 son la familia mas extensamente estudiada (Morimoto, Minowada and Welch, 1995, Bukau and Horwich, 1998).

Todas constan de dos dominios distintivos: un dominio ATPasa altamente conservado en el N-terminal y un dominio mas divergente hacia el C-terminal, el cual une pequeños péptidos hidrofóbicos de substratos modificados (Flynn et al., 1991). Las HSP72 son proteínas altamente inducibles por estrés en citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico. La HSP73 (HSC70) es expresada constitutivamente y está localizada en el citoplasma. Las proteínas de 75 y 78 kDa no son inducidas específicamente por choque térmico, pero si por falta de glucosa. Por consiguiente, a ellas se les llama proteínas reguladas por glucosa (GRPs, por sus siglas en ingles). La GRP75 es una proteína mitocondrial y está involucrada en la translocación de precursores de las proteínas a través de las membranas mitocondriales y en su subsiguiente estabilización y plegamiento dentro de la mitocondria. La proteína GRP78 también llamada inmunoglobulina de unión de cadena pesada (BiP), la cual se expresa constitutivamente en el retículo endoplásmico y desempeña papeles importantes como el ensamblaje de proteínas secretoras, en la supervivencia proteica.

## **HSP90**

La familia HSP90 incluye tres proteínas: HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$  y GRP94. Las proteínas HSP90 son hidrofóbicas y se han identificado en el citoplasma, el núcleo y el retículo endoplásmico. De hecho HSP90 $\alpha$  y HSP90 $\beta$  están entre las proteínas más abundantes en células eucariontes constituyendo entre el 1-2% del total de proteínas citoplasmáticas y bajo condiciones fisiológicas, su expresión incrementa en respuesta al estrés. Las HSP90 tienen un papel importante en la función del receptor de estrógenos. Se cree que en ausencia de la hormona, las HSP90 se unen a los receptores de esteroides, proteínas cinasas y filamentos de actina en asociación con HSP56 y HSP70, manteniendo al receptor en una forma inactiva.

## **HSP100**

Las HSP100 se localizan en el citoplasma y en el núcleo y están involucradas en disociar agregados y facilitar la proteólisis. Actúa en asociación con HSC70 y Hdj1 como co-chaperona en el plegamiento de proteínas.

### **Regulación de la HSP70 por compuestos que producen estrés.**

La intoxicación alcohólica aguda (IAA) provoca un desbalance en el estado redox del organismo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gutiérrez-Salinas et al., 1999), esto desencadena la activación de una serie de genes de respuesta inmediata (IEGs) tales como los protooncogenes c-fos y c-jun (Saika, et al 2000) y los genes de HSP (principalmente HSP70) los cuales ofrecen citoprotección o regeneración celular.

Las proteínas que principalmente se inducen durante el estrés térmico pertenecen a la familia HSP70, las cuales proveen tolerancia de estrés tanto termal como oxidativo (Bornman, et al, 1998, Rokutan, K., 2000). De hecho, está firmemente establecido que el preacondicionamiento térmico o la sobreexpresión de las HSP70, confieren una mayor resistencia al estrés oxidativo (Chong, et al 1998; Gill, et al 1998). La familia HSP70 comprende la proteína citosólica constitutiva 70 (HSC70) y la proteína citosólica inducible (HSP70). Estas proteínas desarrollan funciones como chaperonas esencialmente durante la síntesis, transporte, ensamblaje, renaturalización y degradación de proteínas en la célula (Bukau, y Horwich, 1998). La activación de los

genes que codifican para la proteína HSP70 involucra una serie de eventos, que incluyen la activación transcripcional debido al factor HSF (Magger y De Kruijff, 1995), y en especial al HSF1. En células no sometidas al estrés, HSF esta presente tanto en el citoplasma como en el núcleo en forma monomérica la cual no tiene actividad de unión al DNA y además se encuentra de alguna manera inactivada por HSC70. En respuesta al aumento de temperatura o algún otro factor, los HSF se ensamblan y forman un trímero acumulándose dentro del núcleo en el sitio promotor, denominado elemento de choque térmico (HSE), que se localiza en el extremo 5 de los genes HSP (Schöffl, et al, 1998). La participación del HSF1 se describe en la Figura 1 y 2.

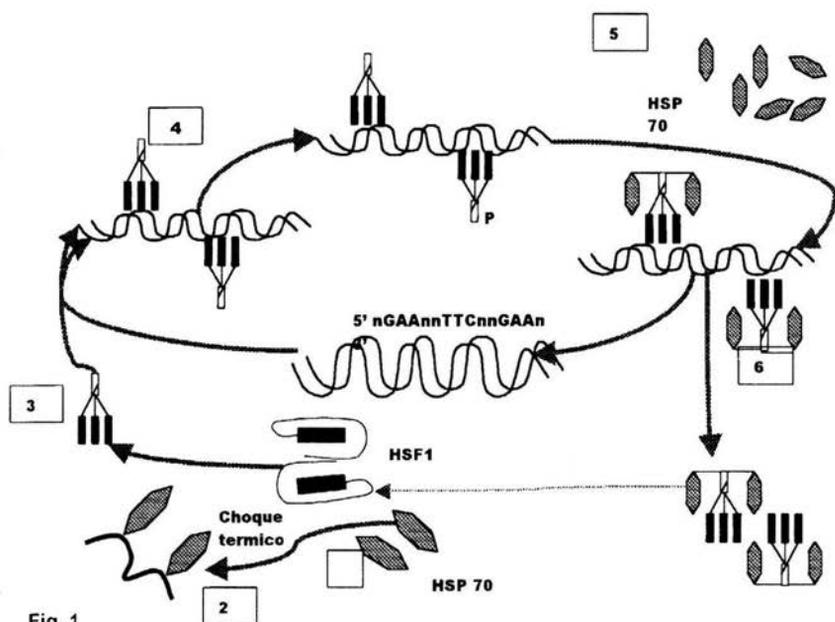


Fig. 1

Modelo de la función de HSF1 (Fig. 1): bajo condiciones fisiológicas, el factor HSF1 no se encuentra unido al DNA en forma y tiene forma monomérica, interactúa con el HSC70 con lo cual se estabiliza la conformación de los HSF1 (1). Durante el choque térmico o el estrés oxidativo, la aparición de proteínas desdobladas, agregadas o lesionadas por el estrés, eleva la concentración de sustrato de una entidad proteica que compite con el HSF1 por la asociación con el HSC70 (2). Así el choque térmico, u otros factores de estrés, inician los eventos que remueven la influencia regulatoria negativa sobre la actividad de anclaje al DNA por parte del factor HSF1. En estas condiciones las HSF1 se ensamblan en trímeros (3) que se unen al HSE en el DNA (4). La activación por fosforilación del trímero en el sitio promotor HSE da por resultado una elevada transcripción, síntesis y acumulación de HSPs (5), en particular HSP70, la cual posteriormente se asocia con los HSF1 para regularlas (6) y regresarlas a su forma monomérica (Modificado de Morimoto, 1993).

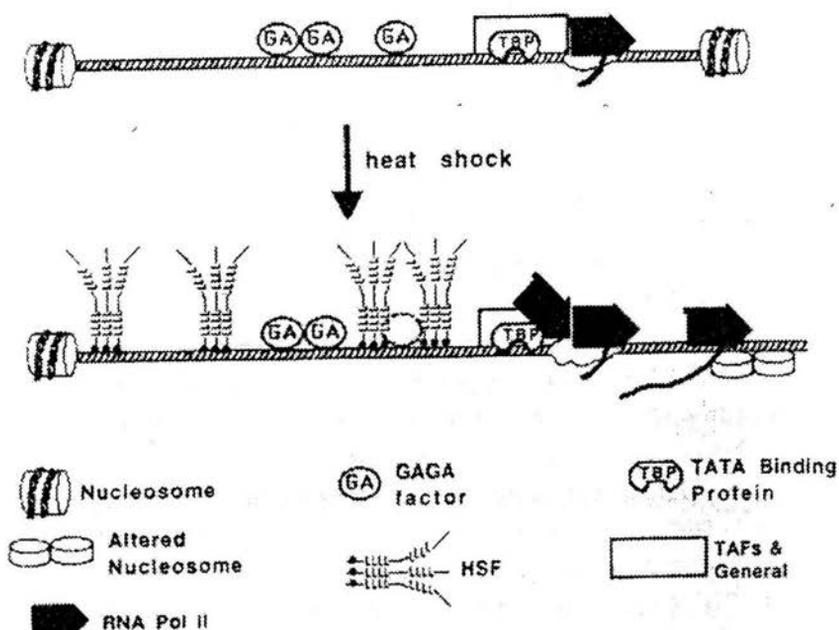


Figura 2. Arquitectura in vivo del promotor de la HSP70 antes y después del choque térmico.

El promotor sin inducción posee una RNA Polimerasa II en estado pausada, una TBP (proteína de unión a la caja TATA) y factores de transcripción que están unidos a las secuencias de elementos GAGA. Los factores asociados a TBP (TAFs) y algunos factores de transcripción general (TIFA, TFIIB, etc) se cree que también pueden estar presentes. Después de un choque térmico, el HSF se une a cuatro HSEs. Cada trimero se une a un elemento HSE, pero la estequiometría de unión no ha sido aún determinada.

Después del choque térmico, el DNA es aparentemente "fundido" en el sitio de inicio, lo cual puede indicar la entrada de una Polimerasa adicional en un complejo abierto. (tomado de John Lis and Carl Wu, 1993).

## Antecedentes

Hay muchas formas por las que las chaperonas (HSP70, por ejemplo) pueden ser inducidas con agentes terapéuticos como aspirina (Amici et al., 1995), entre otros. La más utilizada es un aumento en la temperatura en diferentes tejidos, pero su localización y control puede ser difícil. Los antiinflamatorios no esteroideos, potencian la activación de HSF1 y la respuesta al choque térmico (Amici et al., 1995, Fawcett et al., 1997).

Ching-Yuan Su, (1998), demostró que las formas constitutiva e inducible de la HSP70 están involucradas en la resistencia oxidativa provocada por choque térmico o etanol (6%) en cultivo de miocitos H9c2.

En experimentos *in vitro* se ha demostrado que se puede expresar HSP 70 en células U937 y PEER (células tumorales linfáticas humanas) en presencia de etanol (9%), (Gabai, et al 1997).

La intoxicación moderada y aguda de etanol en ratas induce la producción de HSP70 en varias regiones del cerebro (Calabrese, 1996).

Así mismo, otros compuestos como la cocaína y el acetaminofén inducen la expresión de HSP 70 en hígado. (Salminen, et al 1997a, 1997b).

Mosser, 1997, describió que la inducción de HSP70, protegía contra apoptosis inducida por estrés calórico, en un modelo de células PEER transfectados con un plásmido que expresaba la HSP70 inducible mediado por una gen de respuesta a tetraciclina.

Ikeyama, en 2001, utilizó un inductor de HSP70 no tóxico geranylgeranylacetona, evitando la apoptosis en hepatocitos de rata incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5mM) y etanol (100 mM).

Los linfocitos de rata expresan HSP 70 por choque térmico, (Pahlavani, 1995, Dressel, 1999) por lo que son un buen modelo para estudiar el efecto de agentes inductores de estrés, como lo sería la administración aguda de etanol (5g/kg de peso), así como su fácil aislamiento que nos permite determinar el efecto de agentes oxidantes *in vivo* e *in vitro*.

Entre otros trabajos se ha encontrado que la aspirina y otros AINEs inducen la expresión de HSP70 en monocitos humanos, (Housby, 1998), y se ha demostrado que los AINEs activa el factor transcripcional HSF1 en monocitos humanos. (Soncin, 1996). La

aspirina es una droga que presenta muchas ventajas, ya que es el agente analgésico-antipirético y antiinflamatorio más prescrito y es el estándar para la comparación y evaluación de otros.

## **Hipótesis**

La administración de aspirina por vía orogástrica, brindará protección a linfocitos al expresar la proteína HSP70, contra agentes oxidantes como etanol y peróxido de hidrógeno.

## **Objetivos**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la participación de la aspirina, en la inducción de las proteínas de choque térmico HSP70 en linfocitos, en la prevención del daño oxidativo provocado por agentes inductores de estrés oxidativo.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

Evaluar los niveles de proteínas de choque térmico HSP70 de linfocitos de sangre periférica de ratas, tratadas con aspirina (establecer el curso temporal del efecto). Registrar los cambios en la expresión de las HSP70 en linfocitos de rata durante la administración de aspirina.

Determinar la correlación entre citoprotección y niveles de HSP70 provocada por la aspirina vs el estrés oxidativo

Manipular con incremento de temperatura los niveles de proteína HSP70 en linfocitos, y determinar si correlaciona con una mayor citoprotección a los daños inducidos por etanol y peróxido de hidrógeno.

## **Materiales y Métodos**

Se utilizaron ratas wistar macho de 200 g +/- 20 g. Los animales fueron alimentados con *Nutricubos* (Purina de México, S.A.) y agua *ad libitum* y permanecieron en ayuno por 12 horas antes del tratamiento.

### **Tratamiento de los animales**

Los animales recibieron una dosis única de aspirina (40mg/Kg. de peso corporal) a través de una sonda orogástrica. Los animales fueron sacrificados por decapitación y la sangre se colectó en tubos con heparina como anticoagulante. Como grupo control se utilizaron animales en ayuno y sin tratamiento.

### **Obtención de linfocitos**

Los linfocitos se obtuvieron de la siguiente manera: en un tubo cónico (50 ml) se colocaron 15 ml de histopaq (medio que permite la recuperación de linfocitos) agregándose la sangre en dilución 1:2 con medio RPMI, evitando romper el gradiente, se centrifuga a 900 g durante 30 minutos, se aspira la fase mas clara hasta un centímetro de la fase turbia (blanca), donde se localizan los linfocitos, extrayéndose esta fase lentamente para evitar aspirar eritrocitos y evitando la lisis de los linfocitos, lavándose las células con PBS por 5 minutos a 1200 g.

## Ensayo de carbonilos

Para la determinación de proteínas carboniladas (Técnica de Levin) se utiliza el 2,4 DNPH, para lo cual se procede de la siguiente manera: a 500  $\mu$ l de 2,4 DNPH 10mM (disuelto en HCl 2 M) se le adiciona 500  $\mu$ l de la muestra de extractos de linfocitos. Los blancos se preparan usando 500  $\mu$ l de la muestra y adicionando 500  $\mu$ l de HCl 2 M sin 2, 4 DNPH. Las muestras se corren por duplicado. Después de adicionar la solución de 2,4 DNPH (o HCl 2 M en el caso de los blancos), los tubos se agitan (vortex) cada 10 minutos por un periodo de 1h. Se le adicionan 500  $\mu$ l de TCA al 30% a cada tubo. Los tubos se agitan en el vortex y se colocan en baño con hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifugan durante 15 minutos a 11,000 g. Se desecha el sobrenadante y se adiciona 1 ml de etanol-acetato de etilo (1:1) a cada tubo, rompiéndose el precipitado por agitación en vortex, permitiendo un período de 10 minutos de reposo. Posteriormente se centrifuga 15 minutos a 11,000 g, y el sobrenadante se elimina por decantación el precipitado se lava con etanol-acetato de etilo dos veces más. Después del lavado final, la proteína es solubilizada en 1 ml de clorhidrato de guanidina 6 M, fosfato monobásico de potasio 20 mM (pH 2.3). Para acelerar el proceso de solubilización, las muestras

son incubadas a 37° C en baño con agitación por 30 minutos. El contenido de carbonilos es calculado de la medición de absorbancia a 380 nm y un coeficiente de absorción  $\epsilon=22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

### **Choque térmico**

El protocolo para estimular la expresión de las proteínas HSP70 (inducibles) fue una modificación de la técnica de Dressel (1999) y se desarrolla de la siguiente manera: Una vez obtenidos los linfocitos se colocan en medio RPMI y se incuban a 42° C (temperatura no letal) por 45 minutos, posteriormente se cambia la temperatura a 37° C por 2 horas para permitir la expresión de la proteína.

### **Western Blot**

Para la determinación de las proteínas HSP70 se obtuvieron extractos proteicos de los linfocitos, a partir de las células, con un buffer que contiene Tris HCl (pH 8.0) 50mM, NaCl 120 mM, NaF 100 mM,  $\text{NaVO}_5$  200  $\mu\text{M}$ , NP40 0.5%. Los extractos (100  $\mu\text{g}$ ) se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% (Laemli), y fueron transferidas las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (0.45  $\mu\text{m}$ ). La membrana se incubó por 2 horas con leche (1%) baja en grasa para la inactivación de sitios

inespecíficos, posteriormente la proteína fue determinada utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la HSP70 W27 (Santa Cruz Biotechnology) para la detección, la membrana se incubó por 1 hora con un anti-IgG acoplado a HRP (Horse Radish Peroxidase) de Amersham Corp. Se utilizó un kit de quimioluminiscencia Super Signal West Pico (Pierce). Las membranas se revelaron por autoradiografía.

### **Ensayo de mortalidad**

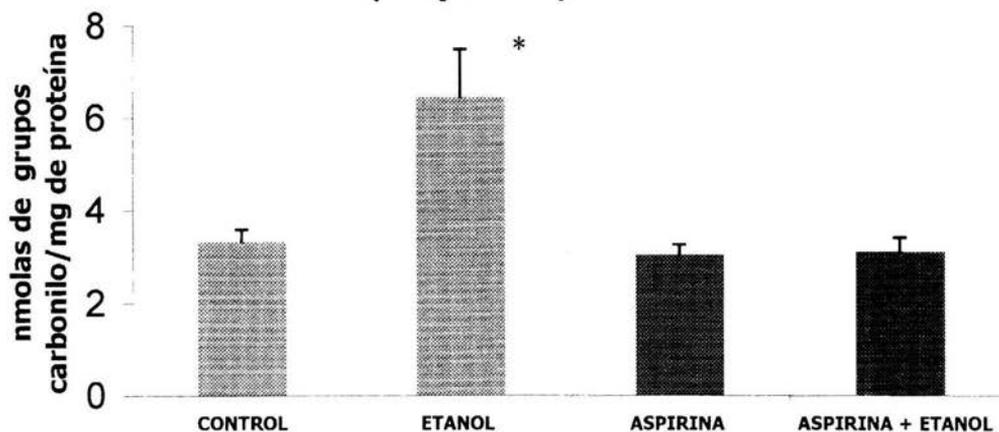
Este ensayo se realiza por exclusión con azul de tripan, en el cual las células se contabilizan a las células totales y células muertas (teñidas), permitiéndonos determinar el porcentaje de mortalidad.

## Resultados

Los datos obtenidos en nuestro laboratorio y trabajos previos han mostrado que la administración simultánea de etanol y aspirina (en forma aguda) disminuyen algunos indicadores de estrés oxidativo tales como: un aumento de los niveles de TBARs, disminución en los niveles de glutatión reducido, aumento del glutatión oxidado, aumento en los triacilgliceridos en sangre (TAGs) y acumulación en hígado (Zentella, et al 1992, 1993, 1994). Basados en lo anterior nuestro primer paso fue el observar posibles cambios en la concentración de grupos carbonilos en proteínas, un indicador de estrés oxidativo ocasionado por la administración aguda del etanol (5 g/kg de peso), así como con la administración de la aspirina (40 mg/Kg de peso) y la administración simultánea del etanol y aspirina, y compararlos contra un grupo control (ayuno). Se cuantificaron los grupos carbonilos tanto en plasma como en linfocitos.

Los resultados muestran en la gráfica 1 que en los linfocitos existe un incremento en el contenido de grupos carbonilos en el grupo tratado con etanol el cual es estadísticamente significativo con respecto a los otros grupos (control, aspirina y aspirina mas etanol).

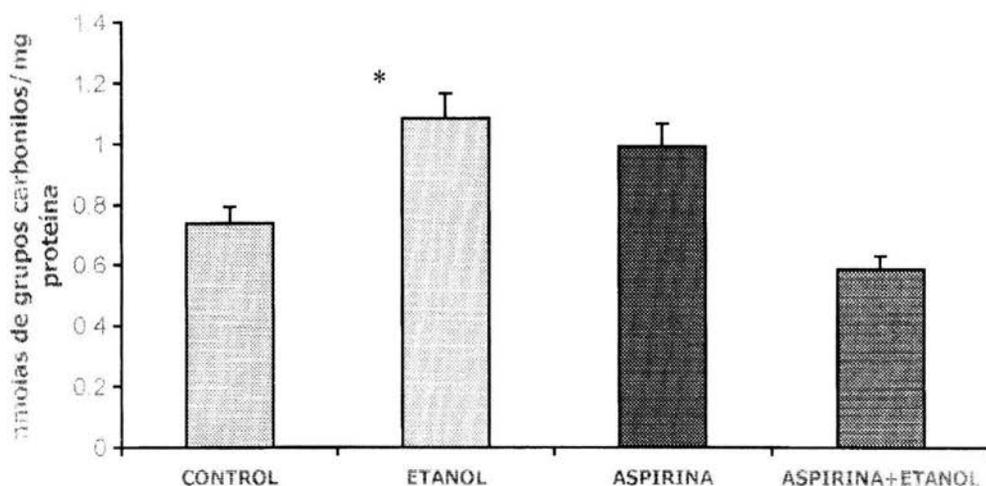
## Grupos carbonilo en linfocito de rata (Aspirina)



Gráfica 1. Linfocitos aislados de ratas tratadas con aspirina y/o etanol por vía orogástrica(5 h). La cuantificación de proteínas con grupos carbonilos se realizó mediante la técnica de Levin (ver materiales y métodos). Los grupos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n= 5)  $P < 0.05$

La gráfica 2 muestra en el plasma un aumento en el contenido grupos carbonilo en proteínas en los animales tratados con etanol el cuál es estadísticamente significativo con respecto a los grupos control y aspirina más etanol. Sin embargo, los animales que recibieron aspirina muestra un ligero incremento en este índice que no es estadísticamente significativo contra el grupo de etanol.

## Grupos carbonilo en plasma de rata (aspirina)



Gráfica 2. Plasma de ratas a las que se le había administrado previamente (5 horas) aspirina y/o etanol por vía orogástrica. La cuantificación de proteínas con grupos carbonilos se realizó mediante la técnica de Levin (ver materiales y métodos). Los grupos se representan como la media  $\pm$  ee (n= 5)  $P < 0.05$

Estos resultados nos mostraron que la administración de aspirina efectivamente evita el incremento en la concentración de los grupos carbonilos inducidos al administrar el etanol, por lo que se decidió determinar si en estas células existía una correlación entre la administración de la aspirina (40 mg/kg) por vía orogástrica y la modificación en la expresión de la proteína de choque térmico inducible (HSP70), a través de un seguimiento dosis-tiempo. Se utilizaron 2 grupos de animales: a uno se le administró la aspirina y a otro se le mantuvo en ayuno (grupo control). Se aislaron los linfocitos a las 5 horas del tratamiento con aspirina y los del grupo control, y posteriormente se les aplicó el siguiente protocolo: las células se incubaron a 42° C por 45 minutos (choque térmico "CT") y se les dio un tiempo de recuperación a 37° C tomándose alícuotas de las células a diferentes tiempos: antes del choque térmico (T0), pasados los 45 minutos a 42° C (CT) y cada hora al incubarse a 37° C (Dressel R., and Günther, E., 1999). Al T0 Fig. 3, no se observan cambios en la expresión de la proteína en ambos grupos, por lo que la aspirina no estimula la expresión de la HSP70; sin embargo, al aplicarse el choque térmico (CT) podemos observar un incremento en la expresión en el grupo de aspirina, que podría deberse a que esta favorece una

respuesta más rápida a cambios dentro de la célula que determinan la citoprotección. Sin embargo, era necesario saber si este efecto que observamos aparecía a diferentes tiempos después de la administración de la aspirina, por lo que se hizo un seguimiento a diferentes tiempos de administración: 0, 0.5, 1, 2, 5 y 24 horas; así como a un grupo control.

**Western Blot de linfocitos con tratamiento de aspirina (5 h) o control**

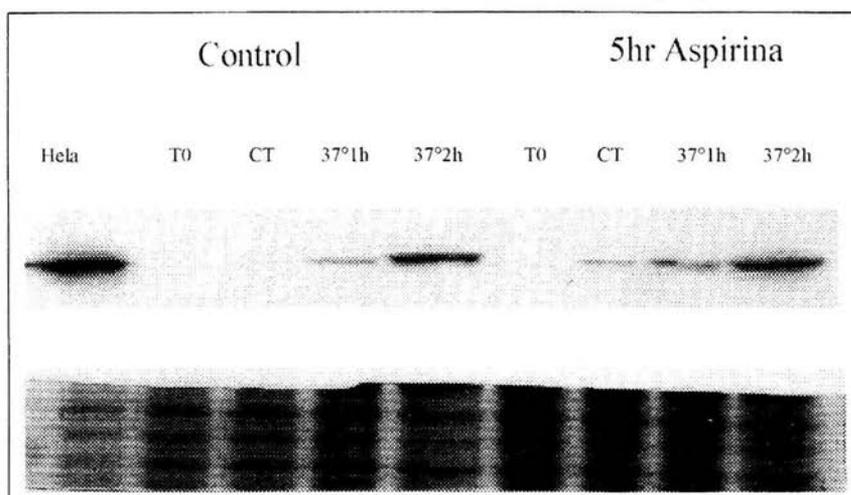


Fig. 3 Expresión de la proteína HSP70 por Western blot. Después de un ayuno de 16 horas, las ratas se separaron en 2 grupos uno recibió una dosis de aspirina y después de 5 horas se obtuvieron los linfocitos, el otro grupo permaneció en ayuno hasta la separación de los linfocitos. Las células fueron tratadas a 42°C por 45 min (CT) y posteriormente se colocaron a 37°C por 2 horas (1h y 2h). Se tomaron muestras de las células a cada tiempo para determinar la expresión de la proteína, así como a las células sin tratamiento térmico (T0).

En las figuras 4 y 5 no se tomaron muestras de células en el tiempo T0, ya que no había expresión de la proteína por la sola administración de la aspirina. En estas figuras 4 y 5 observamos que la expresión de la proteína se ve modificada desde el tiempo de 0.5 horas, incrementándose la expresión de la HSP70 en los diferentes tiempos. Al aumentar el tiempo se incrementa la respuesta al choque térmico observándose que la máxima expresión se da entre 1 y 2 horas, disminuyendo a las 5 horas y desapareciendo a las 24 horas, por lo que podemos sugerir que este efecto es temporal.

**Western Blot de linfocitos en respuesta a una respuesta dosis tiempo en linfocitos**

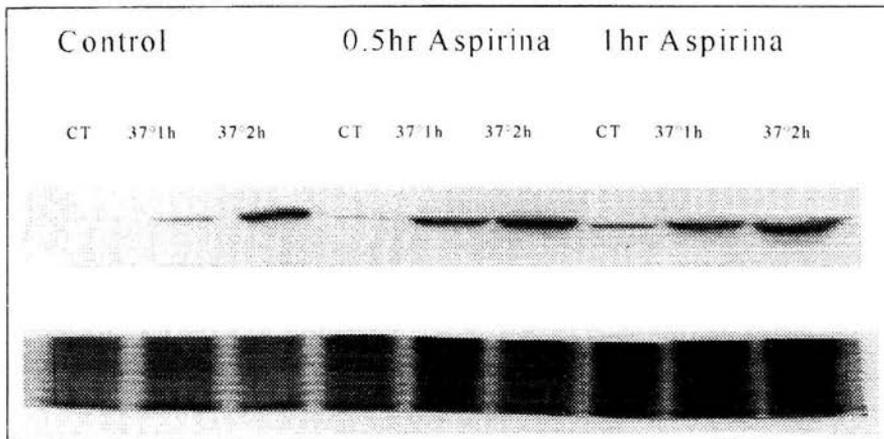


Figura 4

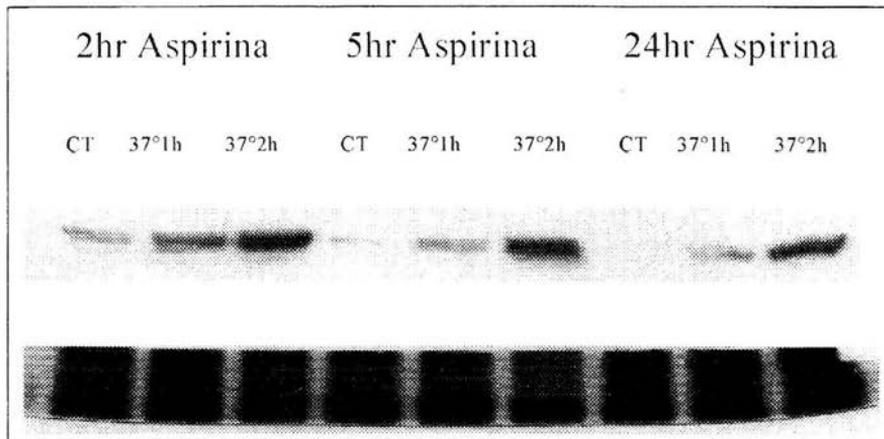
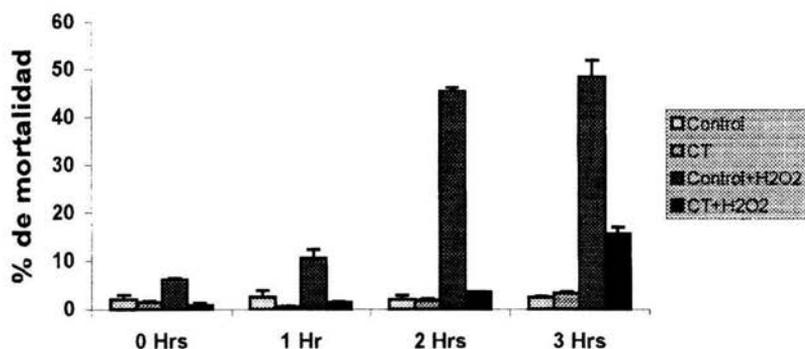


Figura 5

Figuras 4 y 5 Expresión de la proteína HSP70 por Western blot. Después de un ayuno de 16 horas, las ratas recibieron una dosis de aspirina, a las 0.5, 1, 2, 5 y 24 horas post-tratamiento se obtuvieron los linfocitos. Otro grupo permaneció en ayuno. Las células fueron tratadas a 42°C por 45 min (HS) y posteriormente se colocaron a 37°C por 2 horas (1h y 2h). Se tomaron muestras de las células a cada tiempo para determinar la expresión de la proteína.

Una vez determinado el tiempo de 2 horas como aquel en el que se observaba mejor respuesta en la expresión de la proteína, se decidió desafiar a estas células contra agentes oxidantes determinando su mortalidad como un índice de la citoprotección. Para realizar esto, previamente se decidió primero determinar si la expresión de la proteína HSP70 protegería contra estos agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno y etanol), por lo que a un grupo de linfocitos aislados de ratas control se le dividió en 2 grupos: al primer grupo se le incubó a 42° C por 45 minutos y posteriormente se incubaron a 37° C por 2 horas, al segundo grupo se le incubó por 2 horas 45 minutos a 37° C. Estos grupos a su vez se dividieron en 2 grupos: al que se le había estimulado la expresión de la proteína por calor, se le desafió contra 50 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (gráfica 3) y el otro grupo se mantuvo sin agente oxidante. A las células control se les trató con y sin agente oxidante. Se incubaron las células por 3 horas tomando alícuotas cada hora incluyendo el tiempo 0, determinando la mortalidad por exclusión de azul de tripano.

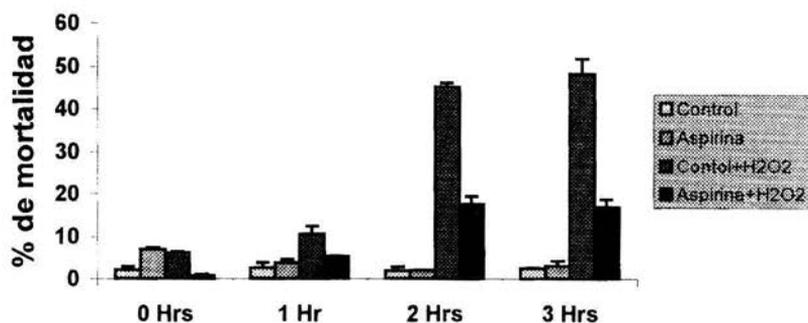
## Linfocitos incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Gráfica. (3) Respuesta celular de linfocitos aislados de rata en ayuno a los que se les dividió en los siguientes grupos: Control (ayuno), CT (Choque Térmico), Ayuno más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ M) y CT más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ M). El peróxido se les agregó directamente a las células en cultivo (37 °C) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos 0, 1, 2 y 3 horas para determinar la mortalidad por exclusión de azul de tripano

En la gráfica 4 se observa que las células estimuladas por calor (CT) y control, ambas sin el peróxido, no muestran cambios en la mortalidad durante el tiempo de incubación; mientras que en los grupos con el agente oxidante se observa que se incrementa la mortalidad en el grupo control en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta alcanzar un máximo de 48.1% a las 3 horas de incubación. Mientras que el grupo CT (estimulación por calor) más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestra una mortalidad máxima de 15.5% a las 3 horas de incubación, evidenciando un efecto protector contra el peróxido.

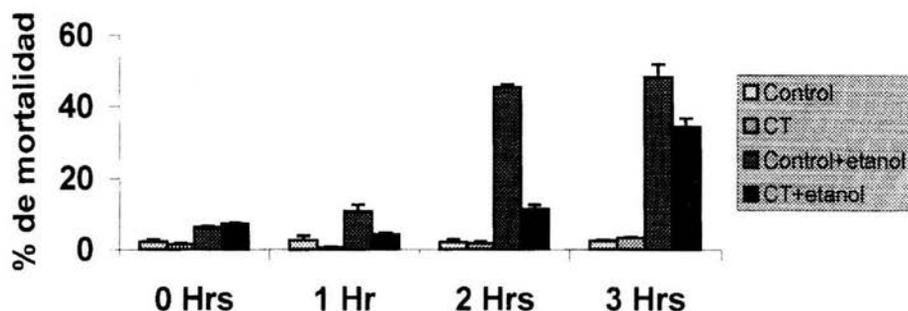
### Linfocitos con 2h después del tratamiento con aspirina o ayuno



Gráfica. (4) Respuesta celular de linfocitos aislados de rata en ayuno a los que se les dividió en los siguientes grupos: Control (ayuno), aspirina (2 Horas), ayuno más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) y aspirina más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) incubándose las células en medio RPMI a 37 °C. El peróxido se les agregó directamente a las células en cultivo, se tomaron alicuotas a diferentes tiempos 0, 1, 2 y 3 horas para determinar la mortalidad por exclusión con azul de tripano .

En la gráfica (5) las células con choque térmico más etanol (100 mM) muestran una mortalidad máxima a las 3 horas de 34.2%, mientras que las células control incubados con etanol muestran una mortalidad a las 3 horas de 59.6%. Los grupos sin el etanol (control y CT), no muestran cambios significativos.

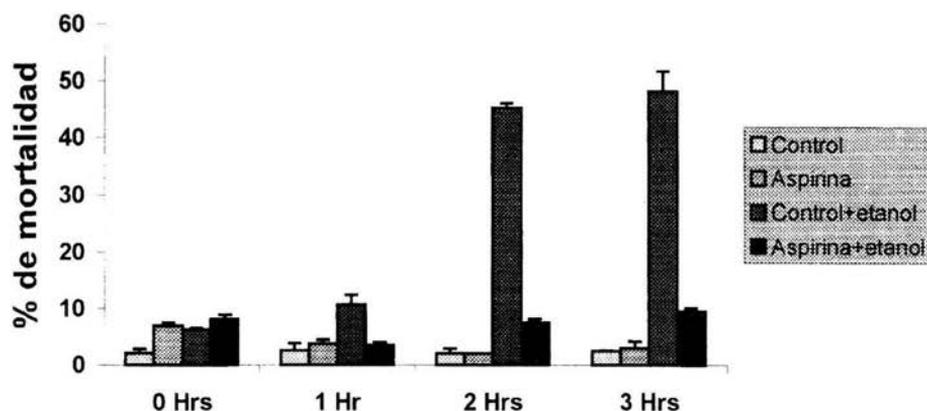
### Linfocitos con choque térmico incubados con etanol (100 mM)



Gráfica. (5) Respuesta celular de linfocitos aislados de rata en ayuno a los que se les dividió en los siguientes grupos: Control (ayuno), CT, Ayuno más etanol (100 mM) y CT más etanol (100 mM). El peróxido se les agregó directamente a las células en cultivo (37 °C) y se tomaron alicuotas a diferentes tiempos 0, 1, 2 y 3 horas para determinar la mortalidad por exclusión de azul de tripano

En la gráfica 6 se observa que las células que se les adicionó el etanol presentaron un incremento en su mortalidad con respecto a las que no se les adicionó el alcohol (control y aspirina) al cabo de las 3 horas; sin embargo las células control más etanol presentan una mortalidad del 47.9%, mientras que las células provenientes de animales tratados con aspirina más etanol presentan una mortalidad del 9.4%, mostrando un efecto citoprotector contra este.

## Linfocitos con 2h después de tratamiento con aspirina o ayuno



Gráfica. (6) Respuesta celular de linfocitos aislados de rata en ayuno a los que se les dividió en los siguientes grupos: Control (ayuno), aspirina (2 Horas), ayuno más etanol (100 mM) y aspirina más etanol (100 mM) incubándose las células en medio RPMI a 37 °C. El peróxido se les agregó directamente a las células en cultivo, se tomaron alicuotas a diferentes tiempos 0, 1, 2 y 3 horas para determinar la mortalidad por exclusión con azul de tripano .

## Discusión

Se ha reportado que el uso de AINEs disminuyen algunos indicadores de estrés oxidativo en modelos de intoxicación alcohólica aguda (Zentella, et al 1992, 1993, 1994); sin embargo solo se han visto los efectos que tienen los AINEs en los radicales libres, producidos durante el consumo de alcohol, sobre algunas moléculas como son la oxidación de ácidos grasos insaturados conocida como lipoperoxidación, la disminución del glutatión, y la liberación de triacilgliceridos del tejido adiposo hacia la corriente sanguínea y su posterior acumulación en el hígado, mientras que el efecto que se presenta en la oxidación de proteínas ha sido poco explorado (Matthew E. Reilly, et al 2000). En modelos de ingesta de etanol, como el sub-crónico y el crónico se han realizado estudios concernientes a la oxidación de proteínas, principalmente enfocados a la presencia y aumento en la concentración de proteínas oxidadas identificadas por su contenido de grupos carbonilo (Calabrese, et al, 2000). En este trabajo se pretendió observar si durante la intoxicación alcohólica aguda es posible detectar la presencia de proteínas oxidadas por la determinación de grupos carbonilos, así como el efecto que se

presenta al administrar simultáneamente la aspirina, comparado con el efecto de la aspirina por si sola.

La intoxicación alcohólica aguda (4g/Kg.) aumenta la concentración de grupos carbonilos en proteínas, como es en páncreas (Altomare, E. et al, 1996), e hígado de rata (Vendemiale, G. et al, 1998); en nuestro modelo pudimos observar que la intoxicación alcohólica aguda (5g/Kg.) aumenta la concentración de proteínas carboniladas en linfocitos aislados de sangre periférica, (gráfica 1), lo cual fue estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo control. La aspirina administrada no incrementó per se el contenido de proteínas carboniladas. Así mismo al co-administrarse simultáneamente la aspirina y el etanol, no se encontraron diferencias con respecto a los grupos control y aspirina, y sí contra el grupo etanol, por lo que la aspirina evita el aumento de proteínas carboniladas si se administra simultáneamente con el etanol. Estos resultados concuerdan con resultados previos de nuestro laboratorio en los que al administrar simultáneamente aspirina con etanol revierte los efectos provocados por el etanol, como es el aumento de los TBARs y TAGs (Zentella, M. et al 1993).

Por otra parte, en el plasma se observa la presencia de proteínas carboniladas en el grupo control como el grupo aspirina más etanol no presentan diferencias entre ellos, pero contra el grupo etanol si existen diferencias significativas. Además se observa que el grupo aspirina sola, presenta un aumento que es estadísticamente significativo contra el grupo control y aspirina mas etanol. No está claro el porque de este efecto. En resumen, la aspirina administrada junto con el etanol evita la formación de grupos carbonilos en las proteínas de linfocitos.

Una vez establecido que la aspirina brinda un efecto citoprotector ante un agentes causante de estrés oxidativo, se decidió observar si estas mismas células obtenidas de ratas a las que se les había administrado aspirina presentaban modificaciones en la expresión de la proteína Hsp70, ya que esta implicada en la citoprotección que brinda contra agentes tóxicos como el etanol (Calabrese, et al, 2000 Chin-Yuan, S., et al 1997, Misako, Saika, et al 2000, Rodenhiser, David I, 1986), 5 horas después de la administración de la aspirina, ya que era el tiempo en que se midieron los efectos del etanol sobre la carbonilación de proteínas. Se probó si la aspirina por sí sola podía modificar la expresión de la proteína, y se constató que por si sola la

aspirina no induce la expresión de la proteína en las células en concordancia con hallazgos previos (Jurivich DA, et al 1992, Winergarden NA, et al 1996,). Sin embargo, surgió la idea de observar si durante la inducción de las HSP70 por calor, las células que procedían de ratas a las que se les había administrado la aspirina previamente, aparecerían estas proteínas a una velocidad diferente, por lo que primero aplicamos el protocolo de choque térmico descrito por Dressel (1999), que consiste en aumentar de la temperatura a 42° C por 45 minutos mas 2 horas de recuperación a 37° C. En nuestro caso, tomamos una muestra de los linfocitos a los diferentes tiempos, esto es una muestra inmediatamente después de obtenerlos (T0), inmediatamente después de los 45 minutos a 42° C (HS), y cada hora cuando se cambió la temperatura a 37° C. En este caso como se había visto en el tiempo 0 no se observa en los linfocitos de las ratas control (ayuno) ni en las ratas con tratamiento de aspirina (5h) la aparición de la proteína. Sin embargo en el tiempo HS se observa que la proteína aparece en el tratamiento de aspirina de forma más temprana que con respecto al grupo control. De esta forma podemos observar que aspirina aparentemente potencia la inducción de la proteína HSP70, correspondiendo con hallazgos previos (Fawcett TW.,

et al 1997), aunque con una dosis más alta de aspirina (100mg/kg de peso animal por vía intraperitoneal). En este trabajo se observa que la administración de la aspirina por si sola no activa la transcripción de la proteína HSP70, sino que potencia su efecto al aplicársele calor, pero las condiciones cambian con respecto a nuestro modelo, ya que la aspirina fue inyectada intraperitonealmente, y la elevación de la temperatura sucedió en el animal integro y los órganos blancos para el análisis fueron pulmón, hígado y riñón. Nuestro modelo por otra parte presenta la ventaja de que podemos aislar fácilmente a las células de nuestro interés (linfocitos), y podemos aplicarle la temperatura seleccionada, así como ir realizando un seguimiento de la expresión de la proteína, a diferentes tiempos por lo que pudimos de esta manera observar que la aspirina favorece una pronta expresión de las HSP70, cuando se le aplica un agente estimulante como lo es el choque térmico (42° C).

Una vez determinando que la aspirina potencia en forma mas temprana la expresión de la proteína al aplicársele estrés por calor se decidió conocer si este efecto era temporal, por lo que se decidió medir este efecto a diferentes tiempos de la administración de la aspirina, y los tiempos seleccionados fueron 0.5, 1, 2, 5 y 24 horas así

como un grupo control (ayuno sin aspirina). No se determinó el tiempo 0 ya que se había establecido que la aspirina por si sola no activaba este la expresión de la proteína. En la figura 3 el tiempo en el que se observa que hay una mayor expresión es al tiempo 2 horas. Este es un efecto que está correlacionado con el metabolismo de la aspirina ya que se ha observado en humanos que la aspirina (en general los salicilatos) se absorbe con rapidez, y se encuentran concentraciones plasmáticas apreciables a los 30 minutos. Después de una dosis individual (40mg/Kg.), se alcanza un valor máximo alrededor de 2 horas, disminuyendo luego en forma gradual (Las bases farmacológicas de la terapéutica, 1991).

Existe una amplia literatura que nos muestra que la sobre expresión tanto de HSP70 constitutiva (Kowit-Yu, C. et al 1998, Ching-Yuan, S. et al 1998, 1999) e inducible (Misako, S. et al 2000, Nagayama, S. et al 2001, Ikeya, S. et al 2001, Zoltán, R. Et al 2002), brindan citoprotección contra agentes oxidantes como el etanol, peróxido de hidrógeno, protegiéndolos contra apoptosis, lipoperoxidación, protección oxidativa. Sin embargo, en todos los casos la proteína HSP70, tanto inducible como constitutiva se encontraba activada o sobreexpresada, lo cual podría ser adverso a

las células a largo plazo ya que estas influyen en la homeostasis proteica, De aquí que un fármaco ideal sería aquel que activara los factores de transcripción de las HSPs (en especial la HSP70), pero que no las sintetizara o que permitiera una más rápida expresión de estas proteínas. En este trabajo se empleó la aspirina, un derivado de salicilato de sodio, el cual se ha demostrado que induce la translocación del HSF al núcleo, pero es insuficiente para elevar la expresión del gen de HSP70 (Jurivich, DA. et al 1995). La aspirina al ser un derivado del salicilato de sodio, según nuestros resultados tampoco propiciaron la síntesis de la HSP70; sin embargo si favorece una respuesta más rápida en la expresión de la proteína HSP70 a desafíos como lo son el choque térmico, por lo que es necesario determinar si efectivamente los factores de transcripción se encuentran activados en el núcleo de los linfocitos y a que nivel se encuentran.

Una vez establecido el tiempo en que la administración de la aspirina presentó el mejor efecto en cuanto a potenciar la expresión de la HSP70, se determinó observar si estas células presentaban una mayor citoprotección contra 2 agentes oxidantes como son el etanol y el peróxido de hidrógeno. En estas gráficas (3 y 5) observamos que

los grupos de CT mas etanol y CT mas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaban una menor mortalidad con respecto a los grupos control mas los agentes oxidantes. Una vez corroborado que efectivamente la expresión de la proteína HSP70 tenía un efecto citoprotector, se utilizaron linfocitos provenientes de ratas a las que se les había administrado por 2 horas la aspirina. Los resultados nos mostraron que los resultados eran semejantes a los que se observaban con linfocitos con CT y en algunos casos mayor sobrevivencia en las células derivadas del tratamiento con aspirina contra CT. Esto podría deberse a que el grupo de inducción por calor de la HSP70, podría verse en desventaja ya que son células que provienen de un estrés térmico, que no obstante no ser letal, si podría influir en que la protección no sea mayor a la observada con respecto a los linfocitos provenientes del tratamiento con aspirina. Estos resultados concuerdan con otros hallazgos previos en los que al sobreexpresar tanto la forma constitutiva como inducible de la HSP70 se registra una mayor resistencia contra agentes oxidantes, como los son el etanol y peróxido de hidrógeno (Kowit-Yu, C. et al 1998, Ching-Yuan, S. et al 1998, 1999).

## Conclusiones

Por lo tanto podemos sugerir las siguientes conclusiones:

1. La administración simultanea de etanol y aspirina in vivo evita la carbonilación de proteínas en linfocitos de rata.
2. La aspirina por sí sola no promueve la expresión la HSP70 en linfocitos; sin embargo, favorece una inducción más rápida de esta proteína cuando se desafían las células a un agente estresante.
3. El mejor tiempo de administración de aspirina fue el de 2 horas.
4. La expresión de HSP70 por calor brinda protección en linfocitos aislados contra etanol y  $H_2O_2$ .
5. Los linfocitos aislados del tratamiento de 2h con aspirina se observa una mayor resistencia contra etanol y  $H_2O_2$  contra el grupo control

## Perspectivas

El presente trabajo muestra que la aspirina puede ser un agente que tenga una acción en la inducción profiláctica de la actividad de las proteínas chaperonas que pueda ser altamente benéfica en muchas situaciones clínicas. Para que esto se pueda realizar es necesario describir como es que la aspirina modifica la expresión de la HSP70, ya sea modificando al factor de transcripción HSF1, por lo que el primer paso será ver si el efecto que observamos al administrar la aspirina por vía orogástrica lo podemos reproducir in vitro, para lo cual es necesario incubar los linfocitos con concentraciones farmacológicas de la aspirina, o bien utilizar ácido salicílico (AS), ya que la aspirina al pasar por el sistema gástrico pierde se desacetila convirtiéndose en AS. Ya que se haya reproducido el efecto in vitro, podríamos ser capaces de observar a que nivel se activa o se favorece la activación de la transcripción de la HSP, si esta es a nivel del factor de transcripción HSF1, o si es algún otro factor como pudieran ser los factores HSF 2, HSF3 ó HSF 4 o algún otro como podría ser el NFkb.

Así mismo se ha observado que algunos AINEs pueden producir  $H_2O_2$ , el cual podría ser el responsable de la activación de alguno de

los factores de transcripción, por lo que lo indicado sería determinar si la aspirina o el AS pueden, al incubarse con linfocitos, favorecer la producción de peróxido, mediante alguna técnica de detección (por ejemplo espectrofotométrica).

## Bibliografía

Altomare E, Grattagliano I, Vendemiale G, Palmieri V, Palasciano G. (1996) "Acute ethanol administration induces oxidative changes in rat pancreatic tissue" *Gut*. May;38(5):742-6.

Amberger, A., Hala, M., Saurwein-Teissl, M., Metzler, B., Grubeck-Loebenstein, B., Xu, Q., y Wick, G. (1999), "Suppressive effects of anti-inflammatory agents on human endothelial cell activation and induction of heat shock proteins", *Mol Med*, 5: 117-128.

Amici C, Rossi A, Santoro MG (1995) "Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the heat shock response". *Cancer Res*. Oct 1;55(19):4452-7.

Bornman L, Steinmann CM, Gericke GS, Polla BS (1998). "In vivo heat shock protects rat myocardial mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun*. May 29;246(3):836-40.

Bradford M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding" *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

Buchner J. (1996). "Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones". *FASEB J* 10:10-19.

Bukau, B. y Horwich, A.L. (1998), "The hsp70 and hsp60 chaperone machines", *Cell*, 92: 351-366.

Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Barcellona ML, Rizza V (1996). "Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat". *Free Radic Biol Med*.;20(3):391-7.

Calabrese, V., Testa, G., Ravagna, A., Bates, T.E., & Stella, A.M. (2000), "HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state", *Biochem Biophys Res Commun*, 269: 397-400.

Ching-Yuan Su, Kowit-Yu Chong, Oliver E. Owen, Wolfgang H. Dillmann<sup>1</sup>, Chawnshang Chang and Chen-Ching Lai (1998) "Constitutive and inducible HSP70s are involved in oxidative resistance evoked by heat shock or ethanol" *J Mol Cell Cardiol* 30, 587–598

Chong, K.Y., Lai, C.C., Lille, S., Chang, C., & Su, C.Y. (1998), "Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection", *J Mol Cell Cardiol*, 30: 599-608.

Cronjé, M.J. y Bornman, L. (1999), "Salicylic acid influences hsp70/hsc70 expression in *Lycopersicon esculentum*: dose- and time-dependent induction or potentiation", *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 265: 422-427.

De Maio, A (1999) "Heat shock proteins: facts, thoughts and dreams" *Shock* 11, 1-12

Dressel Ralf, Meike Lübbers, Lutz Walter, Wolfgang Herr and Eberhard Günther (1999) "Enhanced susceptibility to cytotoxic T lymphocytes without increase of MHC class I antigen expression after conditional overexpression of heat shock protein 70 in target cells" *Eur. J. Immunol.* 29: 3925–3935

Fawcett TW, Xu Q, Holbrook NJ (1997) "Potentiation of heat stress-induced hsp70 expression in vivo by aspirin Cell Stress Chaperones". *Jun*;2(2):104-9.

Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. (1991). "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP". *Nature* 353:726–730.

Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY (1997). "Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance". *J Biol Chem.* Jul 18;272(29):18033-7.

Gianluigi Vendemiale, Ignazio Grattagliano, Anna Signorile and Emanuele Altomare (1998) "Ethanol-induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver: effect of tauroursodeoxycholate" *J of Hepatol*; **28**: 46–53

Gill, R.R., Gbur, C.J.J., Fisher, B.J., Hess, M.L., Fowler, A.A., Kukreja, R.C., y Sholley, M.M. (1998), "Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells", *J Mol Cell Cardiol*, 30: 2739-2749.

Goodman y Gilman (1991) "Las bases farmacológicas de la terapéutica" pp 630-635

Gutiérrez-Salinas, J., Miranda-Garduño, L., Trejo-Izquierdo, E., Díaz-Muñoz, M., Vidrio, S., Morales-González, J.A. Y Hernández-Muñoz, R. (1999), "Redox state and energy metabolism during liver regeneration: alterations produced by acute ethanol administration", *Biochem. Pharmacol.*, 58 (11): 1831-1839.

Gutiérrez-Salinas, J., Zentella de Piña, M. y Piña, E. (1993), "Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes", *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 29 (2): 263-269.

Hightower LE (1991) ".Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity." *Cell*. Jul 26;66(2):191-7

Holownia, A., Ledig, M., Copin, J.C., y Tholey, G. (1995), "The effect of ethanol on HSP70 in cultured rat glial cells and in brain areas of rat pups exposed to ethanol in utero", *Neurochem Res*, 20: 875-878.

Housby, J.N., Cahill, C.M., Chu, B., Prevelige, R., Bickford, K., Stevenson, M.A. y Calderwood, S.K. (1998), "Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes", *Cytokine*, 11 (5): 347-358.

Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. (1996). "HSP27 phosphorylation mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress". *Cancer Res* 56:273-279.

Isabella Dalle-Donnea, Ranieri Rossib, Daniela Giustarinib, Aldo Milzania, Roberto Colombo (2003) "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress" *Clini Chem Acta* 329 23-38

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones". *J Biol Chem* 268:1517-1520.

Jurivich Donald A., Christine Pachetti, Lin Qiu, and Joseph F. Welk (1995) "Salicylate Triggers Heat Shock Factor Differently than Heat" *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 270, No. 41, Issue of October 13, pp. 24489–24495,

Keiichi Ishihara, Kenji Horiguchi, Nobuyuki Yamagishi and Takumi Hatayama (2003) "Identification of sodium salicylate as an hsp inducer using a simple screening system for stress response modulators in mammalian cells" *Eur. J. Biochem.* 270, 3461–3468

Klemenz R, Frohli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A. (1991). "Alpha B-crystallin is a small heat shock protein". *Proc Natl Acad Sci USA*88:3652–3656.

Kubota H, Hynes G, Carne A, Ashworth A, Willison K. (1994). "Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin". *Curr Biol* 4:89–99.

Leppä S, Sistonen L. (1997). "Heat shock response—pathophysiological implications". *Ann Med* 29:73–78.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, et al. (1990) "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins". *Methods Enzymol*;186: 464–78.

Lis J, Wu C (1993) "Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along". *Cell*. Jul 16;74(1):1-4.

Liu, H., Lightfoot, R., y Stevens, J.L. (1996) "Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols", *J Biol Chem*, 271: 4805-4812.

Mager, W.H. y De Kruijff, A.J.J. (1995), "Stress-induced transcriptional activation", *Microbiol. Rev.*, 59 (3): 506-531.

Matthew E. Reilly, David Mantle, Jonathan Salisbury, Timothy J. Peters and Victor R. Preedy (2000) "Comparative Effects of Acute Ethanol Dosage on Liver and Muscle Protein Metabolism" *Biochemical Pharmacology*, Vol. 60, pp. 1773–1785.

Minowada G, Welch WJ (1995). "Clinical implications of the stress response". *J Clin Invest.* Jan;95(1):3-12

Misako Saika, Takashi Ueyama, and Emiko Senba, (December 2000) "Expression of Immediate Early Genes, HSP70, and COX-2 mRNAs in Rat Stomach Following Ethanol" Ingestion *Dig Dis and Sci, Vol. 45, No. 12, pp. 2455–2462*

Morimoto, R.I., Kroeger, P.E., y Cotto, J.J. (1996), "The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions", *EXS*, 77: 139-163.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. (1997) "Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis". *Mol Cell Biol.* Sep;17(9):5317-27.

Nagayama S, Jono H, Suzaki H, Sakai K, Tsuruya E, Yamatsu I, Isohama Y, Miyata T, Kai H. (2001) "Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70". *Life Sci.* Nov 2;69(24):2867-73.

Pahlavani MA, Harris MD, Moore SA, Weindruch R, Richardson A. (1995) "The expression of heat shock protein 70 decreases with age in lymphocytes from rats and rhesus monkeys". *Exp Cell Res.* May;218(1):310-8.

Ritossa FA. (1962). "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*". *Experientia* 18:571–573.

Rodenhiser DI, Jung JH, Atkinson BG. (1986) "The synergistic effect of hyperthermia and ethanol on changing gene expression of mouse lymphocytes". *Can J Genet Cytol.* Dec;28(6):1115-24

Rokutan, K. (2000), "Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection", *J. Gastroenterol Hepatol.*, 15 (Suppl): 12-19).

Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Honda, S., y Kishi, K. (1996) "Glutathione depletion impairs transcriptional activation of heat shock genes in primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells", *J Clin Invest*, 97: 2242-2250.

Saika, M., Ueyama, T. y Semba, E. (2000), "Expression of immediate early genes, HSP70, and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion", *Dig. Dis. Sciences*, 45 (12): 2455-2462.

Saldaña-Balmori, Y.; Zentella de Piña, M.; Guinzberg, R.; Rocha-Hernández, A. y Piña E. (1996). "Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes", *Eur. J. Pharmacol.* 317: 225-229.

Salminen WF Jr, Voellmy R, Roberts SM (1997a) "Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: the potential role of heat shock protein induction" *Toxicol Appl Pharmacol.* Dec;147(2):247-58.

Salminen WF Jr, Voellmy R, Roberts SM . (1997b )"Differential heat shock protein induction by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver" *J Pharmacol Exp Ther.* Sep;282(3):1533-40.

Sarge,KD, Murphy SP and Morimoto RI (1993) "Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absen of stress" *Mol and Cell Biol* vol 13 No. 3: 1392-1407.

Schett, G., Redlich, K., Xu, Q., Bizan, P., Gröger, M., Tohidast-Akrad, M., Keiner, H., Smolen, J. y Steiner, G. (1998), "Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue", *J. Clin. Invest.*, 102 (2): 302-311.

Schoffl F, Prandl R, Reindl A (1998). "Regulation of the heat-shock response". *Plant Physiol.* Aug;117(4):1135-41.

Smith DF, Whitesell L, Katsanis E. (1998). "Molecular chaperones: Biology and prospects for pharmacological intervention". *Pharmacol Rev* 50:493-514.

Soncín, F. y Calderwood, S.K. (1996), "Reciprocal effects of pro-inflammatory stimuli and anti-inflammatory drugs on the activity of heat

shock factor-1 in human monocytes", *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 229: 479-484.

Su, C.Y., Chong, K.Y., Owen, O.E., Dillmann, W.H., Chang, C., y Lai, C.C. (1998) "Constitutive and inducible hsp70s are involved in oxidative resistance evoked by heat shock or ethanol", *J Mol Cell Cardiol*, 30: 587-598.

Velez-Granell CS, Arias AE, Torres-Ruiz JA, Bendayan M. (1994). "Molecular chaperones in pancreatic tissue: The presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells". *J Cell Sci* 107:539-549.

Welch WJ (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease *Physiol Rev.* Oct;72(4):1063-81.

Winegarden NA., Ken SW, Mary S, and Westwood J.T (1996) "Sodium salicylate decreases intracellular ATP, induces both heat shock factor binding and chromosomal puffing, but does not induce HSP70 gene transcription in *Drosophila*" Vol. 271, No. 43, Issue of October 25, pp. 26971-26980.

Zentella P, M., Corona, S., Rocha-Hernández, A., Saldaña-Balmori, Y., Cabrera, G. y Piña, E. (1994), "Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication", *Life Sci*, 54 (19): 1433-1439.

Zentella PM., Hernández-Tobías, A., Saldaña-Balmori, Y., Díaz-Belmont, A. y Piña, E. (1992), "Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug", *FEBS*, 298 (2-3): 123-125.

Zentella PM., Saldaña-Balmori, Y., Hernández-Tobías, A. y Piña, E. (1993), "Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances", *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 17 (6): 1228-1232.

Rakoncay Z JR., Iványi B, Varga I, Boros I, Jednákovits, A. Németh, I Lonovics J, and Tak T (2002) "Nontoxic heat shock protein coinducer

brx-220 protects against acute pancreatitis in rats" Free Radical Biology & Medicine, Vol. 32, No. 12, pp. 1283–1292.

Rakonczay, Z Jr., Tamás S, Takács CS, Boros, I, Lonovics J (2003) "Heat Shock Proteins and the Pancreas" J of Cell Physiol 195:383–391.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA