



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Efecto de la isquemia y la reperfusión en la expresión  
del factor inducible por hipoxia y la hemoxigenasa 1  
en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**EMMANUEL AZTATZI SANTILLÁN**

**MÉXICO, D.F.**

**2011**





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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri**  
**VOCAL:**               **Profesor: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta**  
**SECRETARIO:**       **Profesor: Dra. María Elena Chánez Cárdenas**  
**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Dr. José Ignacio Paramo Ramírez**  
**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA ELENA CHÁNEZ CÁRDENAS** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. MARISOL OROZCO IBARRA** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: EMMANUEL AZTATZI SANTILLÁN** \_\_\_\_\_

- Gracias a DIOS por permitirme llegar y concluir esta etapa de mi vida.
  - A mi padre Emmanuel, por ser mi fortaleza todo este tiempo.
- A mi madre Leti, por cuidarme en todo momento y ser mi guía en la vida.
- A mis hermanos Adrián, Isaac, Omar y Carlos por aguantarme todo este tiempo
  - A Evangelina, que me ha apoyado en mi educación.

A Jenny Balam, por ser mi luz y mi compañera en la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por darme la salud y vida para lograr llegar a esta etapa de la vida.

Gracias a mi papá Emmanuel, por apoyarme en todo momento, por sus consejos y por su apoyo incondicional, gracias por darme la vida.

Gracias a mi mamá Leti, por darme la vida y siempre cuidarme como ángel guardián.

Gracias a mi hermano Adrián y a mis carnales Isaac, Omar y Carlos, por sus consejos, por su apoyo, y por aguantarme todo este tiempo.

Gracias a Evangelina por tus consejos y apoyo.

Gracias a ti Jenny Balam, por llegar a mi vida, apoyarme en todo momento, por la orientación que me has dado, por estar a mi lado todo este tiempo, créeme que no hubiera sido lo mismo sin ti.

!!! TE AMO ALE !!!

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química y a sus maestros y maestras por abrirme sus puertas, darme la mejor educación y formación.

Gracias a la Dra. Ma. Elena por todas sus enseñanzas, consejos y dedicación a esta tesis, gracias por el apoyo y amistad que me dio durante mi estancia en neurología.

Gracias a las Dras Perla, Penelope y Marisol por sus consejos, enseñanzas y amistad.

Gracias a mis compañer@s y amig@s del laboratorio de Patología Vasculare Cerebral, por hacer tan grata mi estancia en neuro: Ana, Bere, Pablo, Marisol, Daniel, Susana, Silvia, Ricardo, Pepe, Karen, Mónica, Felipe, Martín, Ivan, Liliana y Juan.

Gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto No. 90720y a la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por la beca Programa de Becas de Inicio a la Investigación (Probei).

Gracias a mi jurado de tesis por sus comentarios, correcciones y dedicación a este trabajo.

### **ii GRACIAS !!**

A mis amig@s de la primaria por reencontrarnos durante la universidad y seguir en contacto: Gloria, Mariana, Rafael, Laura, Fernanda, Enrique, Ivan y Pablo.

A mis amig@s de la secu que me han acompañado durante mi estancia en CU: Luz, Sandra, Ramón, Daniel y Sergio.

A mis amig@s de la prepa que compartimos grandes momentos estando en la universidad: Peque, Ale, Elsa, Cris, Luly, Mariana, Angélica, Marcela, Sebastian, Lulu, Vera y Luis

A mis amig@s que conocí en aquellas etapas tempranas de la universidad y que pasamos tan padres momentos y que seguimos frecuentándonos: Brenda, Anita, Jacky, Ceci, Sandra, Rodrigo, Alicia Pablo y Mario.

A mis amig@s de la facultad con l@s que pase grandes momentos y estuve gran parte de la universidad: Perla, Gaby, Nancy, Maty, Claus, Marco, Magy, Faby, Ana, Pedro, Susy, Ale, Triny, Liz, Adriana, Ely.

A mis amig@s de la facultad que conocí a mediados y finales de la universidad y que hemos pasado gratos momentos: Nancy, Selene, Sandra, Michael, Abraham, Hector, Leo, Bengy, Cain, Polanco, Omar y Estela.

## Abreviaturas

ABC	Ácido bicinconínico
ACA	Arteria carótida anterior
ACC	Arteria carótida común
AchA	Arteria coroidea anterior
ACM	Arteria cerebral media
ACOMp	Arteria comunicante posterior.
AHT	Arteria hipotalámica
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico
AP-1	Proteína activadora 1
APP	Arteria pterigopalatina
ATP	Adenosín trifosfato
bHLH-PAS	Hélice-bucle-hélice Per/Arnt/Sim
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAT	Catalasa
Cl <sup>-</sup>	Cloro
CO	Monóxido de carbono
CT	Control
Cu <sup>1+</sup>	Iones cuprosos
Cu <sup>2+</sup>	Iones cúpricos
DAG	Diacilglicerol
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
ECA	Arteria carótida externa
ERH	Elementos de respuesta a hipoxia
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Fe <sup>2+</sup>	Hierro
GPx	Glutación peroxidasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HI	Hipoxia isquémica
HIF	Factor inducible por hipoxia
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1-alfa
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
HO-2	Hemo-oxigenasa 2
HSP	Proteínas de choque térmico
ICA	Arteria carótida interna
IEG	Genes tempranos inmediatos
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
I/R	Isquemia y recuperación del flujo sanguíneo
K <sup>+</sup>	Potasio
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
NLS	Señal de localización nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NRF2	Factor relacionado con el NF-E2
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OACM	Oclusión de la arteria cerebral media
ODD	Degradación dependiente de oxígeno

OH·	Radical hidroxilo
ONOO-	Peroxinitrito
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Prolil hidroxilasas
pVHL	von Hippel-Lindau
R	Recuperación del flujo sanguíneo
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TAD	Trasactivación carboxi terminal
TNFR	Familia de receptores TNF
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular



## ÍNDICE

Resumen . . . . .	1
<b>I. ANTECEDENTES</b>	
Isquemia cerebral . . . . .	3
Cascada isquémica . . . . .	5
Pérdida de los gradientes iónicos transmembranales . . . . .	6
Excitotoxicidad . . . . .	6
Incremento del Ca <sup>2+</sup> intracelular . . . . .	7
Despolarizaciones peri-infarto . . . . .	8
Generación de radicales libres y estrés oxidante . . . . .	9
Inflamación . . . . .	10
Muerte celular . . . . .	11
Modelos experimentales de isquemia focal . . . . .	13
Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) . . . . .	15
Regulación transcripcional ante el daño por isquemia . . . . .	16
Factor inducible por hipoxia . . . . .	18
Estabilización del HIF en hipoxia . . . . .	20
Hemoxygenasa . . . . .	21
Productos metabólicos de la HO . . . . .	24
Efectos protectores de la HO-1 . . . . .	26
<b>II. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES</b> . . . . .	29
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
Animales de experimentación . . . . .	30
Inducción de la isquemia cerebral . . . . .	30
Determinación del déficit neurológico . . . . .	31
Niveles de expresión génica por PCR en tiempo real . . . . .	32
Obtención de microsomas para HO-1 . . . . .	33
Obtención de núcleo y citoplasma para HIF . . . . .	33
Cuantificación proteica . . . . .	34
Niveles de expresión proteica por <i>western blot</i> . . . . .	34
Condiciones de inmunodetección de HO-1 . . . . .	35
Condiciones de inmunodetección de HIF-1 $\alpha$ . . . . .	35
Ensayo de la actividad de HO . . . . .	36
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
Niveles transcripcionales del HIF-1 $\alpha$ ante la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo . . . . .	38
Evaluación a nivel de transcrito y proteico para HO-1 ante la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo . . . . .	42
Actividad enzimática para el sistema hemoxygenasa . . . . .	46
<b>V. CONCLUSIONES</b> . . . . .	49
<b>VI. PERSPECTIVAS.</b> . . . . .	50
<b>VII. ARTÍCULO ANEXO</b> . . . . .	51

## Resumen

La isquemia cerebral es un evento que ocurre por la interrupción temporal o permanente del flujo sanguíneo hacia el cerebro. Es un fenómeno que desencadena una compleja serie de mecanismos bioquímicos y moleculares en la zona afectada ya que deteriora las funciones neurológicas a través de la pérdida en la integridad celular, la cual es producida por excitotoxicidad glutamatérgica, desequilibrio iónico, incremento y reacción de los radicales libres, entre otros. Estos procesos ocurren de manera secuencial y dependen del tiempo que dure la isquemia, así como si ésta ocurrió de manera permanente o transitoria. El tratamiento más efectivo ante un evento de isquemia cerebral es la inmediata canalización de los vasos sanguíneos ocluidos, para así restablecer las condiciones normales de flujo sanguíneo. A la fecha no existe tratamiento terapéutico curativo eficiente para la isquemia cerebral, excepto por el activador tisular del plasminógeno recombinante (r-TPA), el cual cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina, que es la encargada de disolver la obstrucción en el vaso sanguíneo. El r-TPA es eficiente sólo dentro de las primeras 4.5 h desde la aparición de los síntomas neurológicos.

Ya que no se sabe cuándo ocurrirá un evento de esta naturaleza, lo que se ha propuesto es estudiar mecanismos endógenos que protejan al tejido involucrado, como es la expresión de genes que regulan las respuestas adaptativas ante la poca disponibilidad de oxígeno. El factor inducible por hipoxia (HIF, *hipoxia inducible factor*), es un factor de transcripción que está regulado a nivel post-traducciona, a su vez éste activa la transcripción de genes que pueden ayudar a proteger al tejido. Uno de los genes regulados por el factor inducible por hipoxia es el gen de la hemoxigenasa 1 (HO-1).

En este trabajo se evaluó la expresión del HIF-1 $\alpha$  así como de la HO-1 en estriado y corteza cerebral, utilizando el modelo de isquemia focal transitoria a través de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) en ratas. Los grupos que se trabajaron fueron ratas control, ratas con 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo (0, 2, 4, 24 y 48 horas). Para HIF-1 $\alpha$  y HO-1 se realizó cuantificación del transcrito por PCR en tiempo real, determinación de la expresión de proteína por *western blot* y actividad enzimática de la hemoxigenasa.

A pesar de los reportes en la literatura que se tienen acerca de que el HIF-1 $\alpha$  se estabiliza en condiciones de hipoxia, en este trabajo no se evidenció su expresión a nivel de transcrito y su detección proteica presentó un patrón de degradación. Para el caso de la HO-1 se encontró que su expresión a nivel de transcrito tuvo un incremento gradual y con diferencias significativas respecto al control hasta llegar a 178 veces para estriado en el grupo de 2 horas de isquemia con 48 horas de recuperación del flujo sanguíneo y también en este grupo pero en corteza de 338 veces.

Al encontrar variaciones a nivel proteico para HO-2, la investigación deberá continuar para determinar la expresión proteica de HO-1 y HO-2. Encontramos que para el sistema HO en condiciones de isquemia y recuperación del flujo sanguíneo hubo actividad enzimática en nuestros grupos a pesar del daño provocado por la OACM.

## ANTECEDENTES

### Isquemia cerebral

La enfermedad cerebrovascular es todo trastorno en el cual un área del cerebro se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o por una hemorragia; en un evento isquémico ocurre una disminución del aporte sanguíneo hacia el cerebro, pudiendo ser de forma total o parcial; de este modo, la isquemia cerebral es un trastorno provocado por la interrupción del flujo sanguíneo hacia el cerebro. La isquemia parcial, comúnmente denominada isquemia focal, puede presentarse como accidente isquémico transitorio o como infarto cerebral, dependiendo de si el tiempo en que se revierte el déficit sanguíneo es menor o mayor de 24 horas, respectivamente; cuando el aporte sanguíneo se disminuye totalmente, el evento se conoce como isquemia global. El evento hemorrágico puede presentarse de dos formas: la primera, conocida como hemorragia cerebral, que se da cuando hay presencia de sangre en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales; y la segunda, denominada hemorragia subaracnoidea, cuando la hemorragia se presenta en el espacio subaracnoideo<sup>1</sup>. Estos eventos pueden provocar que uno o más vasos sanguíneos cerebrales se vean afectados por un proceso patológico.

La isquemia cerebral representa aproximadamente el 80% de todos los accidentes cerebrovasculares, y es resultado de la oclusión embólica o trombótica de la arteria cerebral mayor (aunque con más frecuencia resulta de la oclusión de la arteria cerebral media OACM o de sus ramas)<sup>2</sup>. La isquemia cerebral es la tercera causa más común de muerte en todo el mundo<sup>3</sup>, una de cada seis personas sufre por lo menos un evento en toda su vida<sup>4</sup>, es la principal causa de discapacidad en adultos mayores, y se calcula que cerca del 6% del presupuesto destinado a la salud se destina a este padecimiento.

---

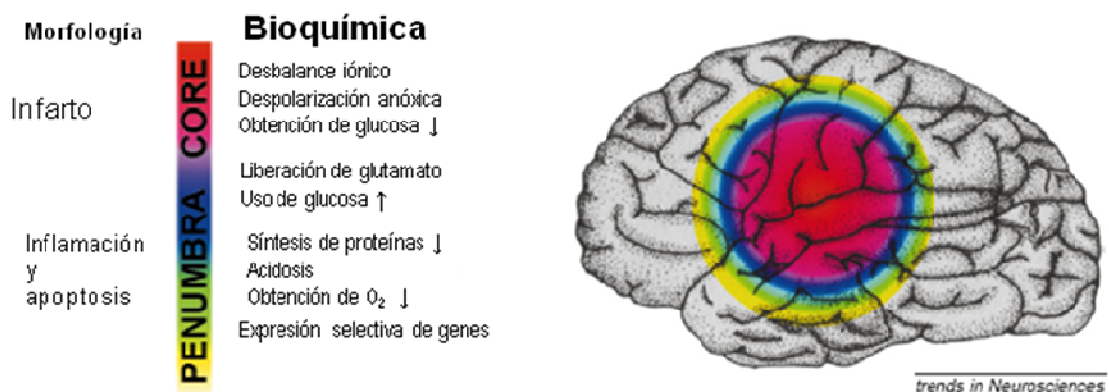
<sup>1</sup> Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. (2001) Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Revista de Neurología. 33:455-464.

<sup>2</sup> Durukan A, Tatlisumak T. (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav. 87:179-197.

<sup>3</sup> Murray CJ, Lopez AD. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet. 349:1269-76.

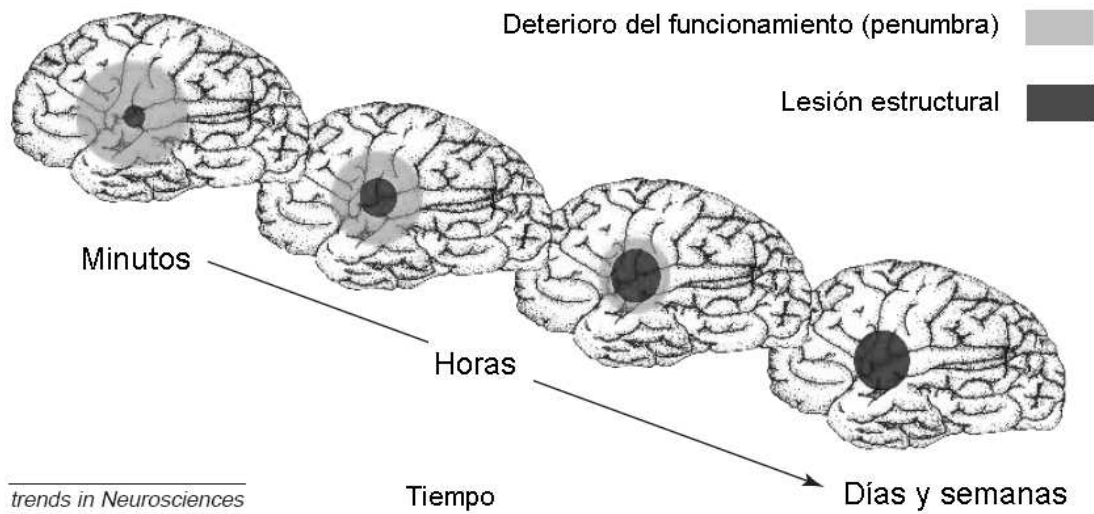
<sup>4</sup> Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, AuR, Kannel WB. (2006) The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. Stroke. 37:345-50.

Las consecuencias de la reducción u oclusión del flujo sanguíneo en el cerebro son complejas y desencadenan la activación de una serie de eventos fisiopatológicos. Si esta oclusión no se elimina dentro de un período de tiempo corto (entre 1 a 4.5 h) se producirá un centro de tejido cerebral infartado también llamado “núcleo del infarto”, rodeado por otra zona de tejido hipóxico y potencialmente rescatable: la penumbra (Figura 1). En la zona de penumbra isquémica la electrofisiología neuronal no está comprometida y el flujo sanguíneo aún se mantiene por encima de los niveles permisibles para la viabilidad neuronal. Si el flujo sanguíneo en esta zona de penumbra desciende por debajo de un nivel crítico y/o se exceden los requerimientos energéticos, la zona de infarto se expandirá inevitablemente (Figura 2), es decir, los niveles de flujo sanguíneo determinan el tamaño del infarto, pues son los que proveen las condiciones esenciales para mantener la homeostasis energética celular.



**Figura 1.** Zona de infarto (área roja) y zona de penumbra isquémica (área azul y amarilla). A la izquierda se muestran algunas alteraciones morfológicas y bioquímicas que ocurren en cada área (Modificado de Dirgnal y col. 1999)<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view Trends Neurosci. 22:391–397.



**Figura 2.** Representación de la evolución del tejido dañado con el paso del tiempo por un evento isquémico. La función celular disminuye, mientras que la lesión estructural crece. (Modificada de Dirgnal y col.1999)<sup>5</sup>.

### Cascada isquémica

La producción de energía en forma de ATP requiere principalmente del aporte de sustratos como la glucosa y el oxígeno. Esto es especialmente importante en el cerebro, en el cual no hay reservas energéticas. Al reducirse el flujo sanguíneo, estos sustratos disminuyen, lo que desencadena los eventos fisiopatológicos de la cascada isquémica, que se caracterizan por<sup>2,5</sup>:

- 1) Pérdida de los gradientes iónicos transmembranales
- 2) Excitotoxicidad
- 3) Incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular
- 5) Despolarizaciones peri-infarto
- 4) Generación de radicales libres y estrés oxidante
- 5) Inflamación
- 6) Muerte celular

## **Pérdida de los gradientes iónicos transmembranales**

La interrupción de los gradientes iónicos en las células a través de las membranas excitables (neuronales) y no excitables (gliales) debido a la pérdida de ATP, se caracteriza por una salida de potasio ( $K^+$ ) de las células, lo que provoca la despolarización celular y una entrada de sodio ( $Na^+$ ), cloro ( $Cl^-$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ) hacia el interior celular<sup>6</sup>. Adicionalmente al privarse del suministro de glucosa y oxígeno, los astrocitos, un tipo de células gliales, comienzan a degradar la glucosa vía glucólisis anaerobia, provocando que el pH intracelular disminuya. El incremento de  $K^+$  extracelular junto al descenso del pH precede a los otros cambios iónicos. En esta fase, los depósitos de ATP se agotan de forma rápida y finalmente producen cambios marcados en la conductancia iónica.

## **Excitotoxicidad**

Uno de los eventos que se desencadenan por la baja energética es la pérdida del potencial de membrana, esto provoca la despolarización de las células neuronales y gliales<sup>5</sup>. A su vez, esta despolarización provoca la liberación de neurotransmisores, como el glutamato, hacia el espacio extracelular de las neuronas presinápticas. La excitotoxicidad es la capacidad de los aminoácidos excitadores de provocar la sobreexcitación en las células nerviosas. La excitotoxicidad se inicia por la sobreactivación de los receptores a glutamato, denominados con base en sus agonistas farmacológicos como: receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor del kainato, receptor del  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA) y receptor metabotrópico<sup>7</sup>. Los tres primeros tipos de receptores están acoplados a canales iónicos y se denominan receptores ionotrópicos, mientras que los receptores tipo metabotrópicos se denominan así porque están acoplados a proteínas G, a través de las cuales, pueden activar la fosfolipasa C para producir los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ). Por otro lado, las proteínas G, pueden activar o inhibir la adenilato ciclasa y, por tanto, aumentar o disminuir la síntesis de AMP

---

<sup>6</sup> Siesjö BK. (2008) Pathophysiology and treatment of focal ischemia. Part I: Pathophysiology. J Neurosurg. 177:169-184.

<sup>7</sup> Massieu L. Muerte por excitotoxicidad. en Enfermedades neurodegenerativas mecanismos moleculares. H. Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. (EDS). Fondo de Cultura Económica. México D.F. 64-79.

cíclico. La excitotoxicidad no sólo se debe a la excitación prolongada de las neuronas, ya que también se produce una serie de reacciones metabólicas que incluyen la activación de múltiples enzimas, que pueden provocar la destrucción neuronal.

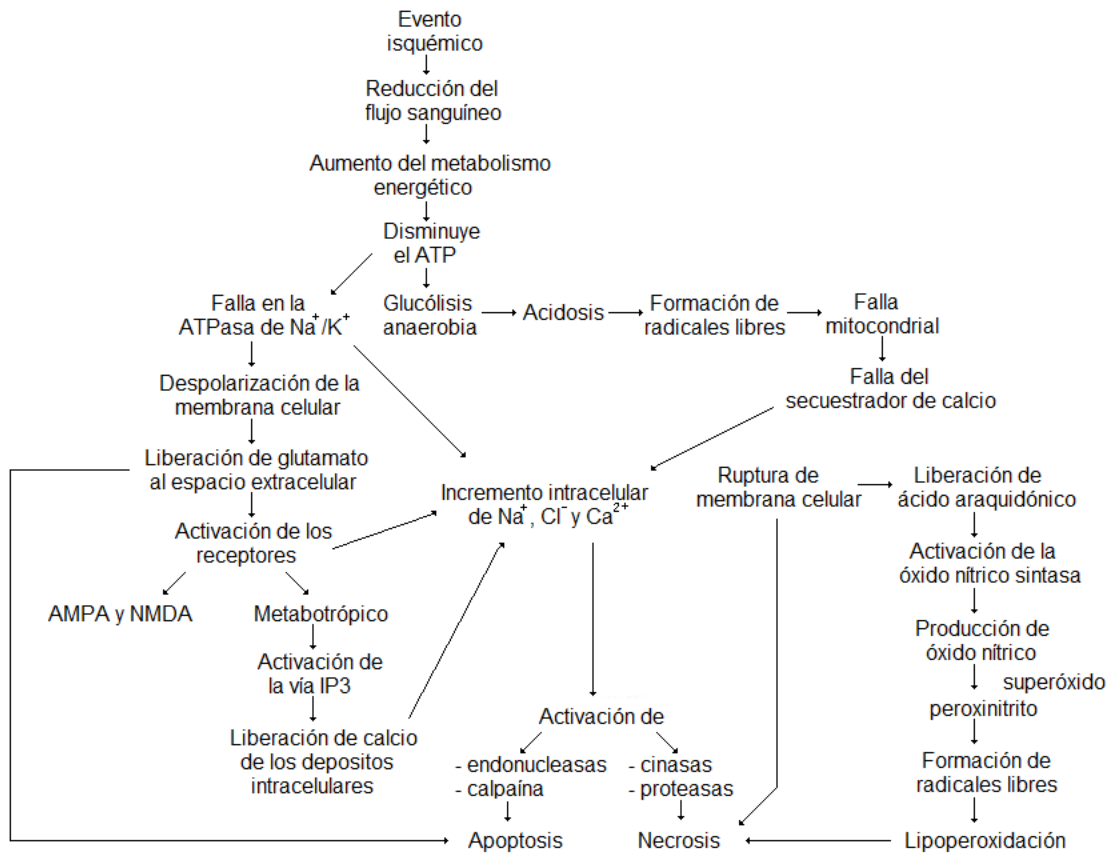
Entre los aminoácidos excitadores se encuentran el glutamato y el aspartato, siendo el primero uno de los neurotransmisores excitadores más abundantes en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Además de su función como neurotransmisor, el glutamato desempeña un papel importante en los procesos de neurodegeneración asociados con desórdenes neurológicos.

### **Incremento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

Cuando se sobreactiva el receptor del glutamato tipo NMDA o se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje por despolarización de la membrana, el  $\text{Ca}^{2+}$  penetra a las células, lo cual tiende a aumentar su concentración citoplásmica. En condiciones normales el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  es regulado por el secuestrador de calcio en la mitocondria o en el sistema retículo endoplásmico mediante una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos mecanismos serían a largo tiempo insuficientes si el catión no se transporta hacia afuera de la célula, lo cual ocurre mediante una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  localizada en la membrana plasmática, o por un intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Na}^+$  que penetra por este último mecanismo es a su vez sacado por la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Como se mencionó anteriormente, la reducción del flujo sanguíneo conduce a la disminución de ATP, lo que provoca que estos mecanismos de extrusión de calcio se bloqueen.

El desajuste en las concentraciones de calcio intracelular provoca la activación de enzimas dependientes de calcio como la proteína cinasa C, la fosforilasa A2, la fosforilasa C, la ciclooxigenasa, la óxido nítrico sintasa dependiente de calcio, las calpaínas, así como varias proteasas y endonucleasas (Figura 3); a su vez, la activación de proteasas citosólicas por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede producir un desajuste del sistema de microtúbulos celulares y degradación proteolítica de proteínas estructurales y funcionales. Estos mecanismos excitotóxicos pueden causar la necrosis, pero también pueden iniciar eventos moleculares que conducen a la apoptosis<sup>5</sup> (Figura 3).





**Figura 3.** Eventos moleculares que se desencadenan por la reducción del flujo sanguíneo en las células neuronales.

### Despolarizaciones peri-infarto

Las despolarizaciones transitorias inducidas por el  $K^+$  extracelular (también denominadas despolarizaciones peri-infarto) pueden contribuir a la expansión de la lesión neuronal. Las despolarizaciones peri-infarto producen la interrupción de los gradientes iónicos y la liberación de transmisores asociados al incremento de  $Ca^{2+}$  libre en la célula; esto conduce a una extensa ruptura de fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos por la activación de  $Ca^{2+}$  intracelular y un incremento del glutamato extracelular.

## Generación de radicales libres y estrés oxidante

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a quitar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Cuando el radical libre consigue sustraer un electrón de otra molécula, esta molécula se vuelve a su vez un radical libre que buscará sustraer un electrón de otra molécula para estabilizarse, iniciándose así una serie de reacciones sucesivas. Estos radicales libres pueden ser especies reactivas de oxígeno (ERO) o especies reactivas de nitrógeno (ERN) los cuales incluyen al anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y al óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ); así como al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que no son radicales pero son muy reactivos. La defensa que tienen las células frente a las ERO/ERN son los sistemas antioxidantes que las convertirán en especies estables. Cuando el contenido intracelular de ERO/ERN sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidante, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. El estrés oxidante se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer, entre otras.

Una consecuencia de la isquemia cerebral focal y particularmente cuando ocurre la recuperación del flujo sanguíneo, es la producción de radicales libres<sup>2</sup>. Existen varias formas de generación de estos radicales, entre las que se encuentran las siguientes: Durante los desajustes de calcio intracelular las proteasas contribuyen al rompimiento de la membrana celular y a la liberación del ácido araquidónico, cuyo metabolismo favorece la producción de radicales libres<sup>5</sup>. Un evento que se produce, es la formación de poros transitorios en la mitocondria, que provocan el aumento de radicales libres y la liberación de moléculas apoptóticas<sup>8</sup>. Otra fuente de éstos es la producción de  $NO^{\bullet}$  por la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) que se activa por el receptor NMDA. El  $NO^{\bullet}$  puede reaccionar con el  $O_2^{\bullet-}$ , produciendo  $ONOO^-$  que es altamente reactivo. A su vez éstos

---

<sup>8</sup> Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19:151–67.

pueden inducir la lipoperoxidación, provocando daño a las membranas, desregulación en los procesos celulares así como mutaciones en el ADN. Las proteasas activadas por calcio como la calpaína 1, catalizan la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, la cual interviene en el catabolismo de las bases púricas, con la consecuente producción de radicales libres. Otra forma de provocar el aumento de los radicales libres es cuando el glutamato inhibe al transportador de cisteína, la cual forma parte del tripéptido glutatión, un agente reductor intracelular que funciona como mecanismo de protección al estrés oxidante.

Estos son algunos de los mecanismos por los cuales se producen los radicales libres, éstos a su vez van a provocar daño celular por lipoperoxidación, daño en las membranas, consumen la fuente de antioxidantes endógenos, alteran la regulación de los procesos celulares y mutaciones en el genoma. El daño celular provoca aberraciones en la homeostasis de los iones, la señalización celular y la expresión génica. Los radicales de oxígeno sirven como importantes moléculas de señalización las cuales activan la inflamación y la apoptosis<sup>5</sup>.

## **Inflamación**

Al producirse la lesión isquémica, en las zonas aledañas al tejido dañado, se desencadenan cascadas inflamatorias que pueden actuar como una espada de doble filo. Con pocos minutos de oclusión, las células neuronales expresan una regulación positiva de genes proinflamatorios que producen los mediadores de la inflamación (como el factor activador de plaquetas, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , y la interleucina 1  $\beta$ ). Además de esto, en el endotelio vascular, se da la expresión de moléculas de adhesión (como la molécula de adhesión intercelular 1 y selectinas), lo cual es una señal para que migren neutrófilos desde la sangre hacia el parénquima cerebral, seguido por los macrófagos y los monocitos. El tipo de mediadores inflamatorios así como el nivel de estimulación, será lo que determine el equilibrio entre los efectos negativos o positivos de la inflamación<sup>9</sup>.

---

<sup>9</sup> Barone F.C, Feuerstein GZ. (1999) Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 19: 819–834

Un efecto perjudicial es el número incontrolado de macrófagos y neutrófilos infiltrados ya que sus mecanismos inmunológicos provocan un aumento en la generación de radicales libres que provocan daños en la integridad vascular conduciendo a la muerte celular. Sin embargo, los macrófagos y la respuesta microglial después de la isquemia son necesarios para el barrido de los escombros necróticos y facilitar la plasticidad<sup>10</sup>. Por ejemplo, el sistema de complemento que se activó en el cerebro post isquémico inicia la respuesta local inflamatoria que contribuye a la supervivencia neuronal y a la reorganización tisular. Por lo tanto, la inflamación cerebral puede ejercer efectos benéficos o perjudiciales en función del contexto fisiopatológico<sup>11</sup>

## **Muerte celular**

El proceso de muerte celular isquémica puede presentarse de dos modos: necrosis y apoptosis. La necrosis se presenta en mayor grado en la región del núcleo, mientras que en la penumbra, la muerte celular se presenta por ambos tipos de muerte celular<sup>5</sup>.

La muerte celular programada o apoptosis es un evento que se activa por diversos procesos, entre los que se encuentran: excitotoxicidad, formación de radicales libres, inflamación, liberación del citocromo c de la mitocondria, daño mitocondrial y del ADN, entre otros. La apoptosis puede producirse después de una lesión isquémica y principalmente se desarrolla en la penumbra isquémica<sup>12,13,14</sup>. La apoptosis es un proceso que requiere de energía, por lo que al recuperarse el flujo sanguíneo podría aumentar la apoptosis en las células<sup>15</sup>.

Después de presentarse un evento isquémico, existen dos vías por las cuales se de la apoptosis, una es la vía intrínseca y la otra es la vía extrínseca. En la primera las proteínas

---

<sup>10</sup> Danton GH, Dietrich WD. (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62:127–36.

<sup>11</sup> van Beek J, Elward K, Gasque P. (2003) Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 992:56-71.

<sup>12</sup> Fisher M, Schaebitz W. (2000) An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med* 160:3196–206.

<sup>13</sup> Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19:151–67.

<sup>14</sup> Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. (2004) Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 1:17–25.

<sup>15</sup> Schaller B, Graf R. (2004) Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 351–71.

apoptóticas (una familia de proteínas llamadas Bcl-2) conducen a la liberación del citocromo c de la mitocondria, que se une a la proteína Apaf-1 y a la pro-caspasa 9 para acelerar la activación a caspasa 9, de este modo se inicia la activación de la cascada de caspasas y en última instancia llevan a la muerte neuronal<sup>16,17</sup>. La vía extrínseca se basa en que la membrana celular existen receptores de muerte celular, entre los cuales existe la familia de receptores TNF (TNFR). Un tipo de estos receptores es el receptor Fas (CD95), estos tipos de receptores están caracterizados por poseer de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína, así como un dominio intracelular en el carboxilo terminal denominado dominio de muerte. El mecanismo de acción consiste en la unión del ligando FasL con el receptor CD95, esta unión activa al receptor, posteriormente un complejo de proteínas se asocia con el CD95 activado, después el adaptador FADD (*Fas-associated death domain*) o Mort1 se une al complejo a través del dominio de muerte del receptor, por interacciones homólogas todo este complejo formado recluta a la procaspasa-8. Esta procaspasa es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa se libera al citoplasma, formando un heterodímero<sup>18</sup>. La caspasa-8 activa, rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que provoca su activación y finaliza con la muerte celular.

Estas vías apoptóticas pueden presentarse en el área de penumbra isquémica debido a que todavía se encuentran irrigadas por la circulación colateral, sin embargo, en el área isquémica evidentemente la muerte celular ocurre por necrosis.

Por otra parte la muerte celular por necrosis es un fenómeno que depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de enzimas líticas constitutivas que destruyen componentes celulares<sup>19,20,21</sup>. La necrosis se produce en

---

<sup>16</sup> Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP- dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91: 479-489.

<sup>17</sup> Emerit J, Edeas M, Bricaire F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 58: 39-46.

<sup>18</sup> Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.

<sup>19</sup> Siesjö BK. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg*. 77: 169-184.

<sup>20</sup> Siesjö BK. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg*. 77: 337-354.

forma indiscriminada y desordenada debido a la pérdida de la homeostasis osmótica, la cual es provocada por un trauma fisiológico como es la anoxia aguda, la escasez de nutrientes, entre otros. Al perderse la homeostasis, las células se hinchan y después hay lisis celular, provocando la salida del contenido celular al tejido circundante, lo cual conlleva a una respuesta inflamatoria. La gravedad y la duración de la isquemia son factores que determinan si las células pueden someterse a una rápida muerte celular, necrosis, o un deterioro más lento y controlado, la apoptosis. Como se mencionó anteriormente, la excitotoxicidad inducida por glutamato, la alteración de las concentraciones de calcio intracelular y el estrés oxidante entre otros, son factores que favorecen la destrucción neuronal. La gravedad de la lesión isquémica determina la extensión del infarto, pudiéndose extender hasta la penumbra.

### **Modelos experimentales de isquemia focal**

Los primeros conocimientos sobre la isquemia cerebral se obtuvieron a partir del estudio en animales superiores, sin embargo, en la actualidad la mayoría de los experimentos se llevan a cabo en animales pequeños como la rata y el ratón. El uso de animales pequeños para estudios de investigación, como en el caso de la isquemia cerebral, presenta claras ventajas en cuanto a menor costo y una mayor aceptación con respecto a las cuestiones éticas.

La rata es el animal más comúnmente usado en estudios de isquemia cerebral, por su parecido en cuanto a la anatomía de los seres humanos y la fisiología cerebral<sup>22</sup>; por sus dimensiones es fácil monitorear los parámetros fisiológicos, así como el análisis de las muestras cerebrales<sup>23</sup>. También existe una gran homogeneidad entre las cepas y es relativamente sencillo realizar estudios reproducibles<sup>24</sup>.

---

<sup>21</sup> Díez-Tejedor E, Alonso de Leciana M, Barinagarrementeria F, Cantú C. (1998) Fisiopatología de la isquemia cerebral. El daño de isquemia reperfusion. En *Enfermedad vascular cerebral*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 13-27.

<sup>22</sup> Mhairi Macrae I. (1992) New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*. 34:302-8.

<sup>23</sup> Takizawa S, Hogan M, Hakim AM. (1991) The effects of a competitive NMDA receptor antagonist (CGS-19755) on cerebral blood flow and pH in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 11:786-93.

<sup>24</sup> Brinker G, Franke C, Hoehn M, Uhlenkuken U, Hossmann KA. (1999) Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport*. 10:3269-72.

Los modelos experimentales de isquemia focal cerebral se han desarrollado para simular la isquemia cerebral de los humanos y sirven como una herramienta indispensable en el campo de la investigación. El número y la diversidad de los modelos experimentales en la isquemia focal se han incrementado en las décadas recientes y los estudios en animales han proporcionado un mayor conocimiento acerca de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la isquemia cerebral focal.

Existen varios modelos por medio de los cuales se puede inducir una isquemia focal cerebral, los principales modelos en roedores son los siguientes: Dentro de los modelos que no requieren craniectomía, se encuentran el modelo embólico (que a su vez se divide en dos categorías, el tromboembólico y modelo embólico sin coágulo), el modelo de sutura intraluminal para OACM, el modelo por fototrombosis y el modelo de isquemia cerebral inducido por endotelina 1. Los modelos que requieren de craniectomía son la cirugía directa para OACM u otros vasos sanguíneos, el modelo de Tamura (que permite el acceso a regiones proximales a la ACM) y la técnica de oclusión de vasos en Tandem (que involucra la electrocauterización de arterias o vasos sanguíneos).

Para producir la isquemia cerebral en animales de laboratorio se puede utilizar un modelo de isquemia permanente o transitoria, en donde el tamaño de la lesión isquémica dependerá del tiempo que dure la isquemia. Para obtener volúmenes de infarto reproducibles, es requerido un tiempo mínimo de isquemia entre 60 a 90 minutos, razón por la cual, los modelos de isquemia focal transitoria usualmente utilizan 90 a 120 minutos de isquemia<sup>5</sup>. Cuando una arteria ocluida es recanalizada (recuperación del flujo sanguíneo) por un modelo de isquemia cerebral transitoria, como es el caso de la isquemia cerebral en humanos, las consecuencias de la recuperación del flujo sanguíneo en el territorio isquémico se pueden evaluar<sup>25,26</sup>; en cambio, cuando se utiliza un modelo de isquemia cerebral permanente se puede estudiar la isquemia sin el efecto de la recuperación del flujo sanguíneo.

---

<sup>25</sup> Aronowski J, Strong R, Grotta JC. (1997) Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17:1048–56.

<sup>26</sup> Gürsoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T. (2004) Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 35: 1449–53.

Dentro de los criterios que se deben tomar en consideración para elegir el modelo isquémico se encuentran los siguientes<sup>27</sup>:

- El proceso isquémico y las respuestas fisiopatológicas deben ser semejantes a la isquemia cerebral presentada en humanos.
- La zona de lesión isquémica debe ser reproducible.
- La técnica usada para realizar el procedimiento debe ser relativamente fácil y lo menos invasiva posible.
- Las variables fisiológicas deben ser monitoreadas y mantenidas en un rango normal.
- Las muestras del cerebro deben estar fácilmente disponibles para pruebas histopatológicas, bioquímicas y para la evaluación biológica molecular.
- El costo y esfuerzo deben ser razonables.

### **Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM)**

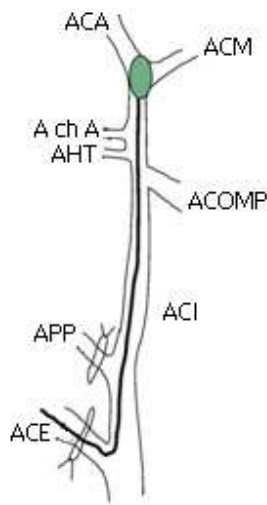
Entre los modelos experimentales que se encuentran para provocar un evento de isquemia cerebral focal, se encuentra la OACM y, a su vez, una variante para ocluir esta arteria es la sutura intraluminal de la misma. Esta técnica es la más frecuentemente usada en ratas y en ratones, ya que tiene la característica de no ser muy invasiva y sirve para realizar una isquemia transitoria o permanente de manera controlada.

El procedimiento para ocluir la arteria cerebral media (ACM) se realiza mediante la introducción de un monofilamento dentro de la arteria carótida externa hasta bloquear el flujo sanguíneo de la ACM (Figura 4).

---

<sup>27</sup> Li F, Fisher M. (2001) Animal modeling for developing stroke therapy. In: Fisher M, editor. Stroke therapy. Woburn, MA: Butterworth-Heinemann. p. 83–96.





**Figura 4.** Técnica de sutura intraluminal de la arteria cerebral media. Inserción del monofilamento por la arteria carótida externa, siguiendo la arteria carótida interna, hasta ocluir la arteria cerebral media. ACA, arteria carótida anterior; AchA, arteria coroidea anterior; ACC, arteria carótida común; ECA, arteria carótida externa; ICA, arteria carótida interna; AHT, arteria hipotalámica; APP, arteria pterigopalatina; ACOMpP, arteria comunicante posterior.

Utilizando esta técnica se puede obtener una zona de infarto reproducible, afectando a la corteza frontoparietal y el caudado putamen lateral. Para evaluar el efecto de la recuperación del flujo sanguíneo se puede retirar el monofilamento después de un período determinado de oclusión.

Dependiendo de la forma, tamaño y longitud insertada del monofilamento, la ACM puede ser ocluida selectivamente o en conjunto con las arterias aledañas (arteria comunicante posterior, la arteria carótida interna y la arteria carótida común). Algunas de las desventajas que pueden ocurrir con éste método son: ruptura de los vasos, una subsecuente hemorragia, hipertermia y la inadecuada oclusión; sin embargo, este modelo es el más ampliamente utilizado ya que es muy reproducible, no es muy invasivo y permite tener una isquemia permanente o transitoria de manera controlada.

En este trabajo se utilizó como modelo de isquemia cerebral focal, la OACM.

### **Regulación transcripcional ante el daño por isquemia**

Si se permite la recuperación del flujo sanguíneo después de presentarse un evento isquémico cerebral focal, el resultado es el cambio drástico del metabolismo energético, el cual provocará diversas reacciones neuronales, gliales y en los vasos sanguíneos<sup>28</sup>.

Una de las respuestas más interesantes de las células a un cambio metabólico, como ocurren en la isquemia y en la recuperación del flujo sanguíneo (I/R), es el cambio en la

<sup>28</sup>Schmidt-Kastner R, Zhang B, Belayev L, Khoutorova L, Amin R, Busto R, Ginsberg M, (2002) DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 108: 81–93

expresión genética. Algunos fenómenos que se presentan son la expresión de nuevos genes, la sobreexpresión o decremento en otros genes y a menudo se refleja como la activación de mecanismos protectores<sup>1</sup>.

Se han observado varias señales de expresión génica después de la isquemia cerebral focal<sup>29</sup>, como lo demuestra la rápida regulación positiva del ARNm de las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés *heat shock protein*) e inmediatamente del ARNm de los genes de respuesta inmediata (IEG, por sus siglas en inglés *immediate early genes*)<sup>30,31,32</sup>. Recientemente Lu y col.<sup>33</sup> utilizando la tecnología de microarreglos en ratas, han encontrado que después de una lesión focal cerebral (I/R) se sobre expresan IEGs, factores de transcripción, y HSP a los 30 min de presentarse la inflamación y la apoptosis, teniendo un pico máximo de 4 a 24 horas. La expresión de los genes de estrés, como lo es el hsp70<sup>34</sup> y el hsp32<sup>35</sup> (gen de la hemoxigenasa HO-1) son particularmente interesantes ya que se expresan en la penumbra isquémica. Ciertos genes de respuesta inmediata como c-fos, c-jun y junB<sup>36</sup>, pueden ser activados por las despolarizaciones peri-infarto, además estos genes pueden estar sobreexpresados en el hemisferio ipsilateral<sup>37</sup>. El resultado de esto es la producción de proteínas y factores de transcripción además de la inducción de otros genes que se encuentran fuera del área isquémica.

Teniendo en consideración todos estos eventos, la detección de los cambios en los genes después de la isquemia es un fenómeno que puede ayudar a la comprensión de las

---

<sup>29</sup> Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. (2000) Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 20:1011–1032.

<sup>30</sup> Akins PT, Liu PK, Hsu CY. (1996) Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe?. *Stroke.* 27:1682–1687.

<sup>31</sup> Koistinaho J, Hökfelt T. (1997) Altered gene expression in brain ischemia, *Neuroreport* 8:i–viii.

<sup>32</sup> Chen H, Chopp M, Schultz L, Bodzin G, Garcia JH. (1993) Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Neurol. Sci.* 118:109–116.

<sup>33</sup> Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti R, Hartings JA, Whipple R, Vahey MT, Polavarapu RG, Woller KL, Tortella FC, Dave JR. (2004). Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J. Neurosci. Res.* 77:843–857.

<sup>34</sup> Sharp FR, Kinouchi H, Koistinaho J, Chan PH, Sagar SM. (1993) HSP70 heat shock gene regulation during ischemia. *Stroke* 24:I72-5.

<sup>35</sup> Nimura T, Weinstein PR, Massa SM, Panter S, Sharp FR. (1996) Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 37:201-8.

<sup>36</sup> Kiessling M, Gass P. (1994) Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain Pathology* 4:77-83.

<sup>37</sup> Hata R, Mies G, Wiessner C, Hossmann KA. (1998) Differential expression of c-fos and hsp72 mRNA in focal cerebral ischemia of mice. *Neuroreport.* 9:27-32.

diferentes vías moleculares por las cuales las células pueden sobrevivir o en su defecto morir<sup>38,39,40</sup>.

### **Factor inducible por hipoxia**

La disminución del aporte de oxígeno durante la isquemia cerebral provoca una serie de cambios en la expresión de diversos genes que codifican para proteínas importantes. Algunos de estos genes se regulan por el factor inducible por hipoxia (HIF, *hipoxia inducible factor*); este factor activa la transcripción de genes que codifican para proteínas que median las respuestas adaptativas ante la poca disponibilidad de oxígeno.

El HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico que está constituido por dos subunidades: la subunidad  $\alpha$ , que es la forma inducible (expresada en el citosol) y la otra es la subunidad  $\beta$ , que es la forma constitutiva (expresada en el núcleo)<sup>41</sup>. Existen otras dos subunidades  $\alpha$  que tienen similitudes estructurales y bioquímicas con HIF-1 $\alpha$ , la HIF-2 $\alpha$  y la HIF-3 $\alpha$ <sup>42,43</sup>, aunque no se tiene mucha información de éstas. Las subunidades de HIF pertenecen a un familia de factores de transcripción eucarionte, que se caracterizan por poseer un dominio “*basic helix-loop-helix Per/Arnt/Sim* (bHLH-PAS)” el cual es responsable de la unión al ADN y a la dimerización de la subunidad  $\alpha$  con la  $\beta$ . Además de esto, HIF-1 $\alpha$  posee un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), así como dos dominios de transactivación carboxi terminal (TAD) y una señal de localización nuclear (NLS).

---

<sup>38</sup> Schuhmann MU, Heine G, Skardelly M, Jaeger M, Selle H. (2005) Brain injury and proteomics/peptidomics: is it relevant? an overview. *Acta Neurochir Suppl* 95:465–70.

<sup>39</sup> Fonteh AN, Harrington RJ, Huhmer AF, Biringer RG, Riggins JN, Harrington MG. (2006) Identification of disease markers in human cerebrospinal fluid using lipidomic and proteomic methods. *Dis Markers*. 22:39–64.

<sup>40</sup> Chen A, Liao WP, Lu Q, Wong WS, Wong PT. (2007) Upregulation of dihydropyrimidinase- related protein 2, spectrin alpha II chain, heat shock cognate protein 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in rats-a proteomics approach. *Neurochem Int*. 50:1078-86.

<sup>41</sup> Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:5510–4.

<sup>42</sup> Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. (2002) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 17:271–273.

<sup>43</sup> Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 $\alpha$ . *Gene Expr*. 7:205–213.

La subunidad regulada específicamente por la concentración de oxígeno es HIF-1 $\alpha$  y, a pesar de que existen familias de proteínas reguladoras de la homeostasis del oxígeno, HIF-1 es el regulador principal en la hipoxia<sup>44</sup>.

En condiciones normales de oxígeno (normoxia) HIF-1 $\alpha$  se une a la molécula chaperona Hsp90, este complejo en presencia de 2-oxoglutarato es hidroxilado por las prolin hidroxilasas (PHs) en las prolinas P402 y P564 que están en el dominio ODD, además HIF-1  $\alpha$  es acetilado por la acetiltransferasa. Esta hidroxilación y acetilación hechas al HIF-  $\alpha$  son señales para ser reconocido por la proteína E3-ubiquitin ligasa von Hippel-Lindau (pVHL) que coloca una cadena de ubiquitinas al complejo y finalmente todo este complejo es degradado vía proteosomal<sup>45</sup>.

Una forma de inhibir la activación transcripcional por HIF-1 $\alpha$  en normoxia se da por la presencia de oxígeno y 2 oxoglutarato, los cuales activan a la asparaginil hidroxilasa que hidroxila la asparagina del HIF-1 $\alpha$ ; esta hidroxilación impide la unión del HIF-1 $\alpha$  a sus co-activadores en el núcleo, previniendo así la activación transcripcional de HIF<sup>46,47</sup>.

Aunque aparentemente la transcripción y síntesis de HIF-1  $\alpha$  es constitutiva y no parece estar afectada por oxígeno<sup>48</sup>, HIF-1 $\alpha$  tiene un corto tiempo de vida y es degradado rápidamente en normoxia<sup>49</sup>.

### **Estabilización del HIF en hipoxia**

Se ha descrito<sup>50</sup> que la actividad de las PH se inhibe cuando la concentración de oxígeno es menor al 5%. Otra forma que inhibir a las PHs es por las ERN/ERO que alteran

---

<sup>44</sup> Semenza GL. (2000) HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14:1983–1991.

<sup>45</sup> Ran R, Xu H, Lu A, Bernaudin M, Sharp FR. (2005) Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev. Neurosci.* 27:87–92.

<sup>46</sup> Rocha S. (2007) Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.* 32:389-97.

<sup>47</sup> Semenza GL. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 7:345-50.

<sup>48</sup> Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood.* 92:2260–2268.

<sup>49</sup> Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5510–5514.

<sup>50</sup> Simon MC. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF  $\alpha$  stabilization. *Adv Exp Med Biol.* 588:165–170.

el estado de oxidación de su cofactor, el  $\text{Fe}^{2+}$ , pasando a su estado oxidado  $\text{Fe}^{3+}$  e inactivandolas<sup>8</sup>.

En condiciones hipóxicas las PH trabajan con baja eficiencia, por lo tanto HIF-1 $\alpha$  no se hidroxila y no continúan los pasos de su degradación. En este caso se dice que HIF-1 $\alpha$  se estabiliza, lo que conduce a su translocación al núcleo y a su posterior unión con la subunidad  $\beta$ , formando así el heterodímero HIF-1  $\alpha/\beta$ ; una vez formado, éste se unirá a la secuencia de ADN en los ERH del promotor de genes de respuesta a hipoxia, con el fin de regular su expresión<sup>Error! Marcador no definido.46,51,52,53</sup>.

Otra forma de estabilizar al HIF-1 $\alpha$  por hipoxia es a través de la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (por sus siglas en inglés Mitogen-activated protein kinases MAPK) que fosforila al HIF-1 $\alpha$  e induce su estabilización<sup>54</sup>.

Hasta la fecha se sabe que más de 70 genes son regulados por HIF-1<sup>55</sup>, éstos corresponden a una serie de proteínas que son clave en la angiogenesis, como son: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el receptor FLT-1 del VEGF, el inhibidor del activador de plasminógeno 1, el factor de crecimiento trasformante *TGF $\beta$ K*; en la regulación del tono vascular el gen del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$ , y el de la endotelina 1; genes del metabolismo de la glucosa como la hexocinasa 1 y 2, la lactato deshidrogenasa A, los transportadores de glucosa, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, la enolasa 1; genes del suministro de oxígeno como la eritropoietina; genes del control del HIF: *EGLN1* *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 and 3*, HIF3A inhibitory PAS domain y genes de muerte celular como BCL2/adenovirus E1B, 19 kDa interacting protein 3 BNIP3 entre otros<sup>56,57,58,59</sup>.

---

<sup>51</sup> Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. (2007) Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 80:51-60.

<sup>52</sup> Bernhardt WM, Warnecke C, Willam C, Tanaka T, Wiesener MS, Eckardt KU. (2007) Organ protection by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Methods Enzymol.*435:221-45.

<sup>53</sup> Brahim-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. (2007) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol.* 19:223-9.

<sup>54</sup> Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C. (2001) Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med.* 31:847-855.

<sup>55</sup> Semenza GL. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3:721-732.

<sup>56</sup> Rocha S. (2007) Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.*32:389-97.

<sup>57</sup> Semenza GL. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.*7:345-50.

A pesar de la opinión generalizada de que la estabilización de la proteína HIF por las diferentes vías tiene como función la protección durante la isquemia cerebral, también puede tener un papel como regulador pro-apoptótico como segunda respuesta ante la isquemia. Al parecer, la severidad de la hipoxia es la que determina si las células se adaptan a las condiciones o mueren por apoptosis. Por lo tanto, HIF-1 tiene una respuesta diferencial; por una parte manteniendo la viabilidad celular cuando haya condiciones de hipoxia leve a corto plazo y por otra parte induciendo la muerte celular cuando existe una hipoxia prolongada<sup>60,61</sup>. Se ha demostrado que los niveles de HIF-1 $\alpha$  aumentan después de una exposición a hipoxia, teniendo un pico de 3 a 4 horas y un aumento persistente hasta las 24 horas después del evento hipóxico<sup>62,63</sup>.

## Hemoxigenasa

El tratamiento más adecuado para la isquemia cerebral aguda es la inmediata canalización de las arterias ocluidas<sup>64</sup>, sin embargo el efecto de la recuperación del flujo sanguíneo en la región isquémica puede agravar el daño cerebral<sup>65</sup>, ya que se desencadenan mecanismos celulares como es la excitotoxicidad inducida por los receptores NMDA, los

---

<sup>58</sup> Ratan RR, Siddiq A, Aminova L. (2004) Translation of ischemic preconditioning to the patient: prolyl hydroxylase inhibition and hypoxia inducible factor-1 as novel targets for stroke therapy. *Stroke*. 35: 2687-2689.

<sup>59</sup> Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. (2007) Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*. 80:51-60.

<sup>60</sup> Schmid T, Zhou J, Brüne B. (2004) HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*. 8:423-31.

<sup>61</sup> Chen C, Hu Q, Yan J, Lei J, Qin L, Shi X, Luan L, Yang L, Wang K, Han J, Nanda A, Zhou C. (2007) Multiple effects of 2ME2 and D609 on the cortical expression of HIF-1 $\alpha$  and apoptotic genes in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model. *J Neurochem*. 102:1831-41.

<sup>62</sup> van den Tweel ER, Kavelaars A, Lombardi MS, Nijboer CH, Groenendaal F, van Bel F, Heijnen CJ. (2006) Bilateral molecular changes in a neonatal rat model of unilateral hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res*. 59:434-439.

<sup>63</sup> Calvert JW, Cahill J, Yamaguchi-Okada M, Zhang JH. (2006) Oxygen treatment after experimental hypoxia-ischemia in neonatal rats alters the expression of HIF-1 $\alpha$  and its downstream target genes. *J Appl Physiol* 101:853-865.

<sup>64</sup> Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke.(1995) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 333:1581-1587.

<sup>65</sup> Hallenbeck JM, Dutka AJ. (1990) Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol*. 47:1245-1254.

cuales pueden alterar la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>66</sup>. El daño secundario puede causar la formación de ERN/ERO, que están involucradas en el daño oxidante, la inflamación y la apoptosis<sup>67</sup>. Por lo tanto, se ha propuesto que una de las terapias protectoras para lograr la neuroprotección, es la estimulación de un sistema antioxidante endógeno<sup>68</sup>. Existen muchas enzimas que podrían generar protección, como las enzimas antioxidantes, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y la hemoxigenasa (HO)<sup>69,70</sup>.

La HO es una enzima microsomal que cataboliza la degradación del grupo hemo, para producir cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), y biliverdina; ésta última es inmediatamente reducida a bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa (Figura 5)<sup>71,72</sup>. A la fecha se han identificado dos isoformas de la HO: HO-1 y HO-2. La primera, también conocida como la proteína de choque térmico Hsp32, tiene un peso de 32 kDa y es la forma inducible; y la HO-2 que tiene 36 kDa y que es la isoforma constitutiva. Ambas isoformas son producto de genes individuales<sup>73</sup>.

---

<sup>66</sup> Xiao ZY, Sun CK, Xiao XW, Lin YZ, Li S, Ma H, Song GR, Cheng R. (2006) [Effects of Ginkgo biloba extract against excitotoxicity induced by NMDA receptors and mechanism thereof]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 86:2479–2484.

<sup>67</sup> Chan PH. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21:2–14.

<sup>68</sup> Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Lowery SL, Cipolla MJ. (2001) Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke*. 32:1000–1004.

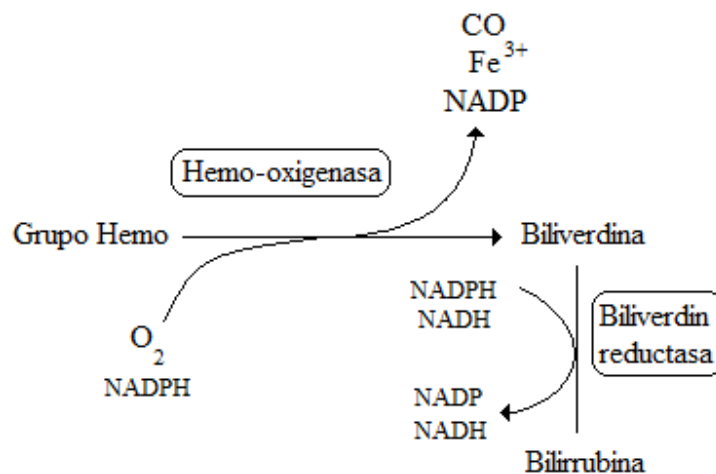
<sup>69</sup> Margail I, Plotkine M, Lerouet D. (2005) Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39:429-443.

<sup>70</sup> Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell* 39:44-84.

<sup>71</sup> Harder Y, Amon M, Schramm R, Rücker M, Scheuer C, Pittet B, Erni D, Menger MD. (2008) Ischemia-induced up-regulation of heme oxygenase-1 protects from apoptotic cell death and tissue necrosis. *J Surg Res* 150: 293–303.

<sup>72</sup> Kirkby KA, Adin CA. (2006) Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290: F563–F571.

<sup>73</sup> Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem*. 261:411–419.



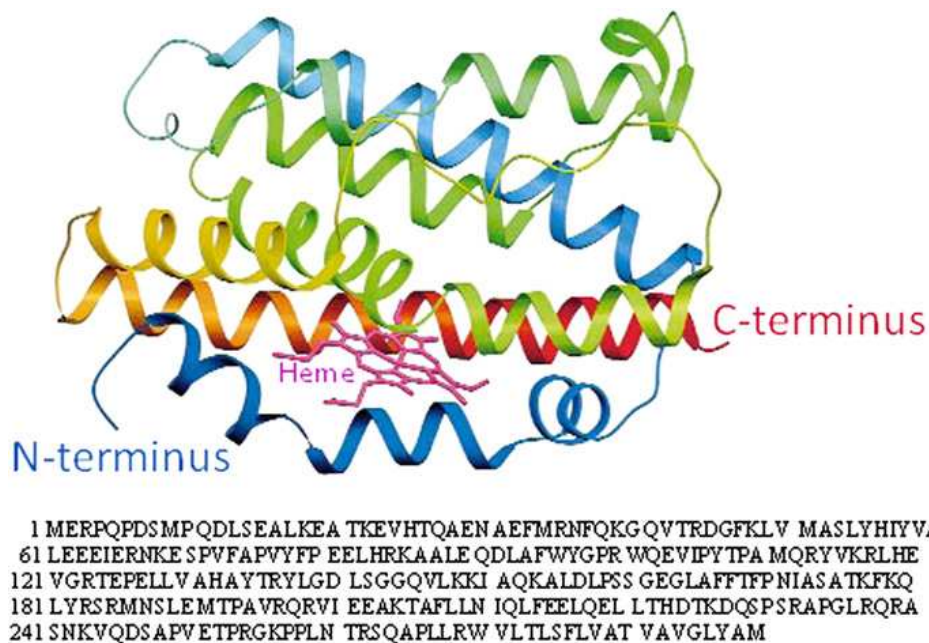
**Figura 5.** Reacción enzimática de la hemo-oxigenasa. Esquema de la conversión catalítica del grupo hemo para dar bilirrubina, monóxido de carbono (CO) y hierro (Fe<sup>3+</sup>) (Modificado de Immenschuh y col. 2000)<sup>74</sup>.

La similitud más importante entre HO-1 y HO-2 consiste en un dominio común de 24 aminoácidos, entre los cuales sólo difieren en un residuo, esto hace que ambas proteínas sean muy activas al catabolizar al grupo hemo<sup>75</sup>. La HO-2 es abundante en los testículos y el cerebro de los mamíferos, no así la HO-1, que se expresa en bajos niveles en condiciones fisiológicas, excepto en el bazo e hígado, donde es abundante.

<sup>74</sup> Immenschuh S, Ramadori G. (2000) Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol.* 60:1121–1128.

<sup>75</sup> Maines MD. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:517– 554.





**Figura 6.** Estructura de la hemoxigenasa-1 (HO-1) formando el complejo con su sustrato, el grupo hemo, y la secuencia de aminoácidos que la integran (Tomado de Bucolo & Drago)<sup>76</sup>.

En la figura 6 se presenta la secuencia de aminoácidos de la HO-1 así como su estructura formando el complejo con su sustrato, el grupo hemo. El grupo hemo desempeña un papel fundamental en diversos procesos biológicos como la fracción prostética de las hemoproteínas que están implicadas en la respiración celular; la generación de energía; la biotransformación oxidativa (en el citocromo P450); el crecimiento; procesos de diferenciación; generación de mediadores inflamatorios como los eicosanoides (a través de la ciclooxigenasa) y el óxido nítrico (a través de la sintasa de óxido nítrico)<sup>76</sup>.

### Productos metabólicos de la HO

Por la reacción que cataboliza la HO, se obtienen los siguientes productos metabólicos: biliverdina, bilirrubina, CO y  $Fe^{2+}$ . Se ha demostrado que la bilirrubina es un pigmento biliar que tiene potentes propiedades antioxidantes<sup>77</sup>; estas observaciones han sido recientemente corroboradas por Doré y col. quienes demostraron que la bilirrubina

<sup>76</sup> Bucolo C, Drago F. (2009) Focus on molecules: heme oxygenase-1. *Exp Eye Res.* 89:822–823.

<sup>77</sup> Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 235:1043–1046.

derivada de la actividad de la HO provee protección a las células neuronales<sup>78</sup>. Se tienen reportes en la literatura que la biliverdina y la bilirrubina actúan como antioxidantes, además de poseer efectos anti-inflamatorios<sup>79</sup>. Uno de los efectos anti-inflamatorios de la biliverdina que se observó en el trasplante de órganos fue la disminución en la infiltración de leucocitos, una menor proliferación de células T, y la supervivencia extendida de trasplantes de corazón<sup>80</sup>. En el modelo de rata de endotoxinas inducida por choque, la biliverdina redujo los niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias y aumentó la producción de las citocinas anti-inflamatorias<sup>81</sup>. La bilirrubina inhibió tanto la activación de células endoteliales mediante la supresión de la selectina E y como la expresión de la molécula de adhesión celular vascular-1<sup>82</sup>. Un mecanismo que puede explicar estos efectos de la biliverdina y bilirrubina es por la inactivación de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción estrictamente necesario para la transcripción de los genes pro-inflamatorios<sup>81,82</sup>.

El CO, derivado de la actividad de la HO, es un importante mensajero celular con diversas funciones fisiológicas<sup>83</sup> como son: la protección contra la isquemia celular, el mantenimiento de la perfusión tisular adecuada, la regulación de la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, y la disminución de las moléculas de adhesión<sup>76</sup>. En el hígado el CO está implicado en la regulación de las funciones hepatobiliares, como es la biotransformación dependiente del citocromo P450. El CO derivado de HO-1 protege la microcirculación

---

<sup>78</sup> Doré S, Takahashi M, Ferris CD, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. (1999) Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:2445–2450.

<sup>79</sup> Ollinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, Margreiter R, Bach FH. (2007) Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation. *Antioxid Redox Signal*. 9:2175-2185.

<sup>80</sup> Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, Tsui TY, Berberat PO, Usheva A, Csizmadia E, Smith RN, Soares MP, Bach FH. (2004) Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J*. 18:765-767.

<sup>81</sup> Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Ollinger R, Choi AM, Otterbein LE: (2005) Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 89:L1131-L1137.

<sup>82</sup> Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH: (2004) Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol*. 172:3553-3563.

<sup>83</sup> Suematsu M, Ishimura Y. (2000) The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology*. 31:3–6.

hepática en condiciones de estrés<sup>83</sup>; por otro lado, el CO participa como regulador del tono del sistema cardiovascular al producir vasodilatación<sup>84</sup>.

El hierro es un cofactor esencial de numerosas enzimas celulares y proteínas dependientes del sistema redox, sin embargo algunos de los efectos tóxicos de su producción en exceso es la generación de ERO por la reacción de Fenton. Sin embargo, se ha demostrado que la síntesis de ferritina (un acarreador del hierro) aumenta en función del incremento en la actividad de HO-1 en fibroblastos de la piel durante las respuestas al estrés celular, evitando así la citotoxicidad por hierro<sup>85</sup>. La idea de que la expresión génica de HO-1 está implicada en la regulación fisiológica de la homeostasis del hierro encuentra apoyo por los resultados en los que la deficiencia de HO-1 simultáneamente conduce a la deficiencia de hierro y a la sobrecarga de hierro en el hígado<sup>86</sup>. Más recientemente, se ha demostrado que la citoprotección en cultivos celulares por HO-1 puede ser atribuida al aumento en la regulación del hierro celular<sup>87</sup>.

### **Efectos protectores de la HO-1**

Se ha demostrado que la HO-1 tiene un efecto protector en diversos estados fisiopatológicos, incluyendo la prevención del daño hepático relacionado con la inflamación y apoptosis<sup>88</sup>, mejora la disfunción contráctil de las células musculares<sup>89</sup>, la

---

<sup>84</sup> Sammut IA, Foresti R, Clark JE, Exon DJ, Vesely MJ, Sarathchandra P, Green CJ and Motterlini R. (1998) Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol.* 125:1437–1444.

<sup>85</sup> Vile GF, Tyrrell RM. (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem.* 268:14678–14681.

<sup>86</sup> Poss KD, Tonegawa S. (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:10919–10924.

<sup>87</sup> Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD, Snyder SH. (1999) Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol.* 3:152-157.

<sup>88</sup> Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. (2003) Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology.* 38:909-918.

<sup>89</sup> Taillé C, Foresti R, Lanone S, Zedda C, Green C, Aubier M, Motterlini R, Boczkowski J. (2001) Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:753-761.

atenuación de rechazo a un xenoinjerto cardíaco<sup>90</sup> y la reducción en la recuperación del flujo sanguíneo<sup>91,92,93</sup>.

La HO-1 es considerada como protectora ante enfermedades clínicas como es el daño por I/R, la enfermedad de Alzheimer, la hipertensión, la aterosclerosis y la diabetes<sup>94,95</sup>.

Se ha demostrado que la inducción de HO-1 con diversos agentes, como son los flavonoides y las estatinas, trae consigo una serie de resultados benéficos, incluyendo efectos anti-apoptóticos, anti-inflamatorios, la supresión de las lesiones ateroscleróticas después del trasplante de la aorta, la prevención de la reperfusión miocárdica inducida por la fibrilación ventricular, y la protección contra la lesión pulmonar isquémica<sup>96</sup>.

Existen varios factores de estrés que pueden ser inductores de la HO-1 y a su vez sobre regular su expresión como son: metales pesados, agentes tiol reactivos, mediadores de la inflamación, hormonas, agentes oxidantes, endotoxinas, estrés asociado al retículo endoplásmico, isquemia, hiperoxia, hipertermia, radiación e hipoxia<sup>93</sup>.

La regulación al alza de HO-1 por inductores de estrés depende de una variedad de reguladores transcripcionales como son: el factor de choque térmico, el factor nuclear-kappa B, la proteína activadora 1 (AP-1), el factor relacionado con el NF-E2 (NRF2), HIF-1 $\alpha$  y MAPK, las vías de señalización (fosfatidilinositol 3-cinasa, o la proteína cinasa A y C)<sup>97,98</sup>.

---

<sup>90</sup> Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. (1998) Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med.* 4:1073-1077.

<sup>91</sup> Rensing H, Bauer I, Datene V, Pätou C, Pannen BH, Bauer M. (1999) Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med.* 27:2766-2775.

<sup>92</sup> Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, Yamasaki A, Fujiwara T, Odaka Y, Hirakawa M, Fujita H, Akagi R. (2000) Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med.* 28:809-817.

<sup>93</sup> Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW. (2004) Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant.* 9:84-87.

<sup>94</sup> Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. (1999) Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem.* 72:1187-1203.

<sup>95</sup> Abraham NG, Kappas A. (2005) Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med.* 39:1-25.

<sup>96</sup> Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. (2008) Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med.* 34:649-658.

<sup>97</sup> Alam J, Cook JL. (2007) How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36:166-174.

<sup>98</sup> Ferrándiz ML, Devesa I. (2008) Inducers of heme oxygenase-1. *Curr Pharm Des.* 14:473-486.

Después de un periodo de isquemia, varios resultados indican que la regulación al alza de HO-1 parece ser un mecanismo que da el cerebro para reducir el daño neuronal. Algunos de estos resultados son los siguientes:

Koistinaho y colaboradores<sup>99</sup> estudiaron en cerebros de roedores la HO-1, encontrando que está localizada en ciertas poblaciones neuronales, pero cuando hay un shock térmico o liberación de glutamato *in vivo* o estrés oxidante *in vitro*, la inducción de HO-1 es predominantemente en las células gliales. Panahian y col.<sup>100</sup> estudiaron en ratones transgénicos a los que se sobreexpresó HO-1, que después de una isquemia global de 6 a 24 hrs, fueron menos susceptibles al daño neuronal. Paschen y col.<sup>101</sup> evaluaron por PCR semicuantitativo la expresión de HO-1 con 30 min de isquemia global y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo, observando un incremento en la expresión de HO-1 8 a 9 veces respecto al control en el estriado y la corteza cerebral. Sutherland y col.<sup>102</sup> en un estudio de OACM e hipoxia, analizaron los tipos celulares y en que regiones cerebrales se expresaban HO-1 y HO-2. Ellos encontraron que tanto las neuronas como las células gliales expresaron HO-1 en la corteza, el hipocampo, el tálamo, el sistema olfativo entre otros.

Estos resultados han conducido a postular que la inducción de HO-1 y por sus productos metabólicos, CO, biliverdina y bilirrubina, podría ser útil para fines terapéuticos en el tratamiento de la disfunción vascular, los estados de enfermedad inflamatoria, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades cerebrovasculares<sup>76</sup>.

---

<sup>99</sup> Koistinaho J, Miettinen S, Keinänen R, Vartiainen N, Roivainen R, Laitinen JT. (1996) Long-term induction of heme oxygenase-1 (HSP-32) in astrocytes and microglia following transient focal brain ischaemia in the rat. *Eur J Neurosci.* 8:2265-2272.

<sup>100</sup> Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. (1999) Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem.* 72:1187-1203.

<sup>101</sup> Paschen W, Uto A, Djuricic B, Schmitt J. (1994) Hemeoxygenase expression after reversible ischemia of rat brain. *Neurosci Lett.* 180:5-8.

<sup>102</sup> Sutherland BA, Rahman RM, Clarkson AN, Shaw OM, Nair SM, Appleton I. (2009) Cerebral heme oxygenase 1 and 2 spatial distribution is modulated following injury from hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci. Res.* 65:326-334.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la expresión de la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) y el gen de la hemoxigenasa 1 (HO-1) en un modelo de isquemia focal transitoria en ratas por oclusión de la arteria cerebral media (OACM).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar los cambios en la expresión a nivel de transcrito de HIF-1  $\alpha$  y HO-1 en corteza y estriado cerebral inducidos por dos horas de isquemia y recuperación del flujo sanguíneo a diferentes tiempos, en un modelo de OACM.
- Cuantificar la expresión proteica de HIF-1  $\alpha$  y HO-1 en corteza y estriado cerebral con dos horas de isquemia y recuperación del flujo sanguíneo a diferentes tiempos, en el modelo de OACM.
- Determinar la actividad enzimática de HO en corteza y estriado cerebral a dos horas de isquemia y recuperación del flujo sanguíneo a diferentes tiempos, en el modelo de OACM.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar de un peso entre 280 a 320 g, proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Los animales se mantuvieron alimentados, hidratados y con ciclos de luz/oscuridad de 12 h.

### Inducción de la isquemia cerebral

Los procedimientos experimentales están apegados a los lineamientos del Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales se anestesiaron con halotano y se sometieron al procedimiento quirúrgico para inducir el daño cerebral siguiendo la técnica propuesta por Longa y col.<sup>103</sup>, a través de la oclusión temporal de la ACM, teniendo los siguientes grupos:

- Ratas control (CT)
- 2 h de isquemia sin recuperación del flujo sanguíneo (2I/0R)
- 2 h de isquemia con tiempos de recuperación de flujo sanguíneo de 2, 4, 24 y 48 h (2I/2R, 2I/4R, 2I/24R, 2I/48R).

A los animales con recuperación del flujo sanguíneo, se les volvió a anestésiar para retirar el monofilamento después de 2 h de isquemia.

El grupo *Sham* (ratas que se someten al procedimiento quirúrgico pero sin inducción de la isquemia) no se incluyó, ya que en estudios previos de este laboratorio, no se han encontrado diferencias entre los animales del grupo *sham* y los del grupo control.

---

<sup>103</sup> Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats Stroke 20:84-91.

## Determinación del déficit neurológico

La determinación del déficit neurológico se realizó para determinar que el procedimiento quirúrgico fue adecuado. Por lo que el déficit se evaluó determinando los cambios en la actividad motora de las ratas, realizando cinco pruebas<sup>104,105</sup>:

1. Movilidad espontánea.
2. Reflejo de agarrar.
3. Barra horizontal.
4. Flexión de la pata contralateral a la lesión.
5. Giros contralaterales.

**1) Movilidad espontánea.** Esta prueba consiste en colocar al animal sobre una superficie plana, las ratas sin cirugía (ratas control) comienzan a explorar y a moverse rápidamente del lugar donde se depositaron, mientras que las ratas que presentan algún daño neurológico se mueven muy poco o no se mueven. **2) Reflejo de agarrar.** Esta prueba consiste en extender un cable a unos 40 cm de la superficie de una superficie plana, y observar cómo se sujeta a éste la rata. Las ratas control se sujetan con ambas patas y no se caen, las ratas con daño neurológico no pueden sostenerse con ambas patas. **3) Barra horizontal.** Del mismo modo que el reflejo de agarrar, consisten en que las ratas se sujeten del cable y que se sostengan. Las ratas control se sujetan del cable y tratan de caminar por el cable, en cambio las ratas que presentan algún daño neurológico no pueden ni sujetarse del cable ni tratar de caminar sobre de él. **4) Flexión de la pata contralateral a la lesión.** Para esta prueba se levanta a la rata por la cola y se mantiene suspendida en el aire, las ratas que no presentan daño extienden ambas patas delanteras hacia enfrente, mientras que las ratas que presentan daño contraen la pata contralateral a la lesión provocada. **5) Giros contralaterales.** Esta prueba consiste en colocar al animal sobre la mesa y levantarlo por la cola, de modo que las patas traseras se levanten de la mesa y las patas delanteras queden sobre la superficie plana, las ratas

---

<sup>104</sup> Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. (1992) Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*. 31:100-106.

<sup>105</sup> van der Staay FJ, Augstein KH, Horvath E. (1996) Sensorimotor impairments in Wistar Kyoto rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the middle cerebral artery: recovery of function. *Brain Res*. 715:180-188.



sin daño comienzan a caminar hacia enfrente o hacia los lados, mientras que las ratas con la lesión rápidamente comienzan a dar giros en sentido contralateral a la lesión.

A cada prueba se le asignó un valor de 0 si el comportamiento es normal y un valor de 1 si la conducta está alterada. El daño asociado al área de infarto está caracterizado según resultados preliminares obtenidos en el laboratorio, por un valor igual o superior a 2, por lo que las ratas que presenten un valor mayor a 2 pueden utilizarse.

### **Niveles de expresión génica por PCR en tiempo real.**

Después de la cirugía los animales se decapitaron, se extrajo la corteza y el estriado cerebral (manteniendo los tejidos en frío). Se obtuvo el ARN total de estas secciones cerebrales utilizando un estuche comercial (TRIZOL, Invitrogene)

El ARN total se cuantificó espectrofotométricamente (260/280 *ratio*). Se utilizaron 5 µg de ARN para sintetizar el ADNc, usando hexámeros azarosos (50 ng) y desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs, 500µM) con la transcriptasa reversa (MV-MLV *reverse transcriptase*, Promega, 200U) en un termociclador a 37°C durante 1 h.

El ADNc se utilizó para amplificar los genes transcritos de HIF-1 $\alpha$  y de HO-1 usando las sondas Taqman Rn00577560\_m1 y Rn00561387\_m1 para HIF-1 $\alpha$  y HO-1, respectivamente (Catálogo de sondas específicas para ratas, Applied Biosystems) marcadas con FAM (fluoróforo que emitirá la señal a detectar por PCR en tiempo real). La amplificación de los genes generó un producto de 200 pb para cada gen. Como control de carga endógeno se utilizó ARN ribosomal 18S marcado con VIC (Applied Biosystems). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems). Todas las muestras evaluadas se hicieron por triplicado y tuvieron una  $n= 6-8$ .

La expresión relativa de las muestras en comparación con el ARN 18S se determinó usando el método comparativo de Ct ( $\Delta$ Ct).

### **Obtención de microsomas para HO-1**

Los animales se decapitaron y se obtuvieron la corteza y el estriado cerebral (manteniéndolas en hielo). Se trabajó de manera independiente con la corteza y el estriado cerebral.

El tejido se homogenizó en amortiguador de fosfatos 0.1M K-Phos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M, llevado a pH 7.4 con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1M). El volumen obtenido se transfirió a un tubo de microcentrífuga al que se le aplicó ultrasonido por 10 segundos a una potencia de 130 W usando un sonicador (VCX130PB – Sonicador 130W) para lisar las células. Después de este paso el volumen se ajustó a un mililitro para poder centrifugar a 3000 xg a 4°C por 10 min. El sobrenadante se recuperó en otro tubo y se centrifugó a 12,000 xg a 4°C por 20 min. El sobrenadante se recuperó y se colocó en tubos de ultracentrífuga para centrifugar a 105,000 x g a 4°C por 50 min. El sobrenadante de la ultracentrifugación se desecha, la pastilla se solubiliza por sonicación en un volumen aproximado de 300  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos con magnesio K-Phos/Mg (5.6 g de cloruro de magnesio en 20 mL de amortiguador de fosfatos, K-Phos/Mg). Se determinó la concentración de proteína para cada una de las muestras.

### **Obtención de núcleo y citoplasma para HIF**

La obtención de las fracciones nuclear y citoplásmica se realizó con un kit comercial (NE-PER™ Nuclear and cytoplasmic extraction Reagents PIERCE). Se homogenizó el estriado o la corteza utilizando el reactivo CER I (el volumen del reactivo es diez veces el peso del tejido) junto con inhibidores de proteasas y se dejó reposar por 10 min en hielo. Posteriormente se adicionó el reactivo CER II (se adicionan 5.5  $\mu\text{L}$  CER II, por cada 100  $\mu\text{L}$  de CER I). Esta mezcla se agitó por 5 segundos y se dejó reposar por 1 min en hielo. Se volvió a agitar por 5 segundos y se centrifugó a 16,000 xg a 4°C por 5 min. El sobrenadante del paso anterior (fracción citosólica) se recupera en otro tubo y se mantiene en hielo, mientras que la pastilla se resuspendió con el reactivo NER (se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de NER por cada 100 mg de tejido). Se agitó en un vórtex por 15 segundos dejando reposar por 10 min en hielo (este paso se repitió 4 veces más). Una última centrifugación se realizó a 16,000 xg a 4°C por 10 min. El sobrenadante que tiene la fracción nuclear se recupera. Se cuantificó la concentración proteica de cada una de las muestras.

## Cuantificación proteica

Se realizó por el método del Ácido bicinonínico (ABC) con un kit comercial (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce). Este método se basa en el hecho de que las proteínas reducen los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^{1+}$ ) en condiciones alcalinas. A su vez, los iones  $\text{Cu}^{1+}$  reaccionan con el ABC (verdoso) para dar una coloración morada que es proporcional al contenido proteico de la muestra.

Para la curva estándar se utilizó albúmina de suero bovino, a las siguientes concentraciones: 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Para las muestras cerebrales se realizó una dilución (1:20). Tanto para la curva estándar como para las muestras cerebrales se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de volumen y se adicionó 1 mL de la mezcla reactiva (50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B). Las muestras se incubaron a 37°C por 30 min. Para detener la reacción las muestras se enfriaron en hielo y se determinó la concentración de proteína espectrofotométricamente a 562 nm.

## Niveles de expresión proteica por *western blot*

Las muestras obtenidas de microsomas se utilizaron para medir la expresión proteica de HO-1 y las muestras obtenidas de la separación de núcleo y citoplasma se ocuparon para medir la expresión proteica de HIF-1 $\alpha$ .

Para las muestras de HO-1 tanto de corteza como de estriado cerebral se trabajó de la siguiente manera: se les adicionó amortiguador de carga 2X (Tris-HCl/SDS 0.5 M, SDS 4%, azul de bromofenol 1%, glicerol 20%, 3.1% DTT) en una relación 1:1 volumen /volumen y se hirvieron durante 5 min. Para cada una de las muestras se colocó el volumen necesario para cargar 30  $\mu\text{g}$  de proteína total en un gel desnaturante de poliacrilamida al 10% (acrilamida 30% /bisacrilamida 0.8%, Tris-HCl 1.5 M con SDS 0.4% pH 8.8, PSA 10% y TEMED) y 1.5 mm de grosor siguiendo el método de Laemmli<sup>106</sup>.

La electroforesis se llevó a cabo por 1.5 h a 30-50 volts. Los geles se colocaron en amortiguador de transferencia por 20 min y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 350 miliamperios durante 2 h en una cámara de transferencia fría.

---

<sup>106</sup> Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

## **Condiciones de inmunodetección de HO-1**

Las membranas transferidas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos salino con Tween (PBS-T  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0.1% y pH 7.5) por 3 h.

Con la misma solución de bloqueo se preparó la dilución 1:5,000 del anticuerpo anti HO-1 (anticuerpo primario de Stressgen) dejando incubar 1 h 30 min a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C por 24 h. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con amortiguador PBS-T, y se preparó la dilución 1:10,000 del anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) (anticuerpo secundario de Stressgen) y se dejó incubar por 1.5 h a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con amortiguador PBS-T.

La unión de las proteínas reconocidas se evidenció mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) donde el peróxido de luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario que al reaccionar produce una luminiscencia que se cuantifica utilizando placas radiográficas de alta sensibilidad.

Se utilizó HO-2 como control de carga endógeno, ocupando las mismas condiciones de incubación, lavado y revelado que para HO-1 pero con las siguientes diluciones de los anticuerpos: el anticuerpo primario anti-HO-2 se trabajó a una dilución de 1:2,500 (Stressgen) y del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) a una dilución de 1:10,000 (Stressgen).

## **Condiciones de inmunodetección de HIF-1 $\alpha$**

Las muestras de HIF se trabajaron de modo similar que las de HO-1, pero cargando 60  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra y adicionando amortiguador de carga 6X (Tris-HCl/SDS 1.5 M, SDS 12%, azul de bromofenol 3%, glicerol 60%, 9.3% DTT) y con las siguientes variaciones de anticuerpo: las diluciones de los anticuerpos fueron en amortiguador TBS (Tris base 20 mM, NaCl 0.5 M a pH 7.5) para el anticuerpo primario anti-HIF (Santa Cruz) se utilizó una dilución de 1:250 incubado a 4°C por 24 h, después se realizaron 4 lavados, 2 con amortiguador TBS y leche (Tris base 20 mM, NaCl 0.5 M

a pH 7,5, 0.1% Tween 20 y leche al 1%) y 2 con amortiguador TTBS (Tris base 20 mM, NaCl 0.5M a pH 7,5 y 0.1% Tween 20). El anticuerpo secundario se trabajó con un dilución 1:35,000 a 4°C por 24 h, 8 lavados se realizaron (4 con TBS y leche y 4 más con TTBS). Como control de carga para las muestras de citosol se utilizó actina a una dilución de 1:1,000 del anticuerpo primario incubado a 4°C por 24 h, se hicieron 4 lavados TBS y leche y para el anticuerpo secundario la dilución fue de 1:20,000 incubándose a 37°C por 1 h, con 4 lavados de TBS y leche.

#### Análisis densitométrico

Para cuantificar la expresión proteica de HO-1 se realizó mediante el software Image J (NIH), haciendo una relación entre la expresión de HO-1 y HO-2.

#### **Ensayo de la actividad de HO**

##### Preparación de las muestras:

Se utilizaron 100 µg de proteína total y se ajustó con K-Phos/Mg a un volumen de 175 µL por cada muestra.

##### Preparación del blanco:

Se prepararon dos blancos de reacción, uno para las muestras de corteza y otro para las muestras de estriado del siguiente modo: Se eligió la muestra que tuviera la mayor cantidad de proteína total, tanto para corteza como para estriado y se procedió del mismo modo en que se prepararon las muestras. Posteriormente los blancos se calentaron en baño María a ebullición durante 10 min.

##### Preparación de la mezcla de reacción y βNADPH

Dependiendo del número de muestras se preparó la mezcla de reacción. Para 20 muestras se utilizaron 500 µL de citosol de hígado de ratón, 50 µL de hemina 2 mM, 250 µL de glucosa-6 fosfato 20 mM, 5 µL de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa 800 U/mL y 195 µL de K- Phos/Mg. Para las 20 muestras se ocuparon 500 µL de β-NADPH 8 mM

### Procedimiento del ensayo de actividad de HO

A cada una de las muestras y blancos preparados se les adicionó 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y 25  $\mu\text{L}$  del  $\beta\text{NADPH}$ , se agitaron en un vórtex por 10 segundos y posteriormente se mantuvieron en un baño de agua a una temperatura de 37° C por 90 min. Desde este momento las muestras se mantuvieron en oscuridad ya que los productos de la reacción son sensibles a la luz. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo por cada muestra para detener la reacción y se agitaron dos veces en un vórtex por 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 21,9123 xg a 4°C a por 2 min. Las muestras se leyeron por espectrofotometría haciendo un barrido de 550 a 450 nm, en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU-640.

Para el cálculo de la actividad de HO se realizó una diferencia entre las densidades ópticas de 464 a 530 nm ( $\Delta\text{OD}$ ) el coeficiente de extinción molar de la bilirrubina es de  $\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 464 nm. La fórmula para calcular la actividad es la siguiente:

$$\frac{(\Delta\text{DO}_{\text{muestra}} - \Delta\text{DO}_{\text{blanco}}) (0.5 * 1 \times 10^6)}{(40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} * \text{mg proteína})} = \text{pmol de bilirrubina/ mg proteína} * \text{h}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La isquemia cerebral desencadena una compleja serie de mecanismos bioquímicos y moleculares que deterioran las funciones neurológicas a través del desbalance en la homeostasis celular, la cual es producida por excitotoxicidad glutamatérgica, desequilibrio iónico, incremento y reacción de los radicales libres, entre otros. Estos procesos conducen a la activación de los mecanismos de señalización los cuales, dependiendo su distribución tendrán contacto con sus moléculas blanco y de este modo provocan la expresión de genes responsables de activar la supervivencia celular o la muerte celular. Por otra parte, las reacciones inflamatorias iniciadas en la penumbra isquémica y las alteraciones en la comunicación entre las células endoteliales, los astrocitos y las neuronas contribuyen al origen y desarrollo del daño celular<sup>107</sup>. Al comprender sistemáticamente estos mecanismos moleculares y tener la posibilidad de modular la cadena de eventos que llevan a la supervivencia o al daño celular se podrán generar estrategias que ayuden a la neuroprotección.

### **Niveles transcripcionales del HIF-1 $\alpha$ ante la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo**

Una de las más intrigantes reacciones de las células frente a un severo daño metabólico es el cambio en la expresión génica, que a menudo se presenta como la activación de mecanismos protectores. Se ha observado un incremento en la expresión génica después de la isquemia focal cerebral<sup>29</sup>, así como, inmediatamente después de la recirculación, previa a períodos críticos de isquemia cerebral, como lo demuestra la rápida sobre regulación de las proteínas de choque térmico y los genes de respuesta inmediata, a nivel de ARNm. Dependiendo del gen en estudio se puede suponer una latencia de varios minutos hasta horas entre el estímulo celular (I/R) y el incremento de la expresión génica (a nivel de ARNm)<sup>30,31,29</sup>. Al disminuir las concentraciones de oxígeno durante la isquemia ocurren cambios en la expresión de varios genes que codifican para proteínas importantes, varios de estos genes inducibles por hipoxia se ven regulados por el factor de transcripción HIF-1. Éste se caracteriza por ser el mediador más importante de las respuestas celulares y moleculares en hipoxia e

---

<sup>107</sup> Suresh L. Mehta, Namratta Manhas, Ram Raghubir (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics Brain research reviews 54:34–66.

isquemia de muchos órganos incluyendo el cerebro<sup>108</sup>. El HIF-1 está constituido por dos subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ . La primera es la forma inducible y la segunda es la forma constitutiva. Una de las regulaciones que se conocen para el HIF-1 es a nivel post-traducciona, en la cual bajo condiciones normales de oxígeno HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por las prolihidroxilasas. Posterior a ésto la proteína E3-ubiquitin ligasa von Hippel-Lindau (pVHL) coloca una cadena de ubiquitinas al complejo, finalmente todo este complejo es degradado vía proteosomal<sup>45</sup>. Al disminuir el flujo sanguíneo las prolihidroxilasas funcionan de manera ineficiente, por lo que no hidroxilan al HIF-1 $\alpha$  y éste se estabiliza, aquí HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo y se dimeriza con la subunidad HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\alpha/\beta$  activa a los elementos de respuesta a hipoxia para regular la activación transcripcional de genes. A pesar de que la mayor parte de los resultados apoyan la regulación postraducciona de HIF-1 $\alpha$ , existen algunas observaciones sobre la regulación positiva de HIF-1 $\alpha$  a nivel transcripcional. Uno de los más citados, es el realizado por Bergeron y colaboradores (1999) en el que se realizó una isquemia permanente por OACM en ratas, mostrando que HIF-1 $\alpha$  se induce después de 4 h de isquemia (por hibridación *in situ*)<sup>109</sup> así como después de 32 h (por PCR semicuantitativo)<sup>110</sup>. En este trabajo se evaluó el efecto de la I/R en la expresión del HIF-1 $\alpha$  a nivel transcripcional para evaluar los posibles cambios en el mensajero por la reducción y posterior recuperación del flujo sanguíneo en el modelo de OACM en ratas.

Para este trabajo se obtuvieron los siguientes grupos: ratas control (CT), 2 horas de isquemia con diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo (0, 2, 4, 24 y 48 horas). La expresión del transcrito de HIF-1 $\alpha$  se cuantificó por PCR en tiempo real y los resultados se presentan en la figura 7.

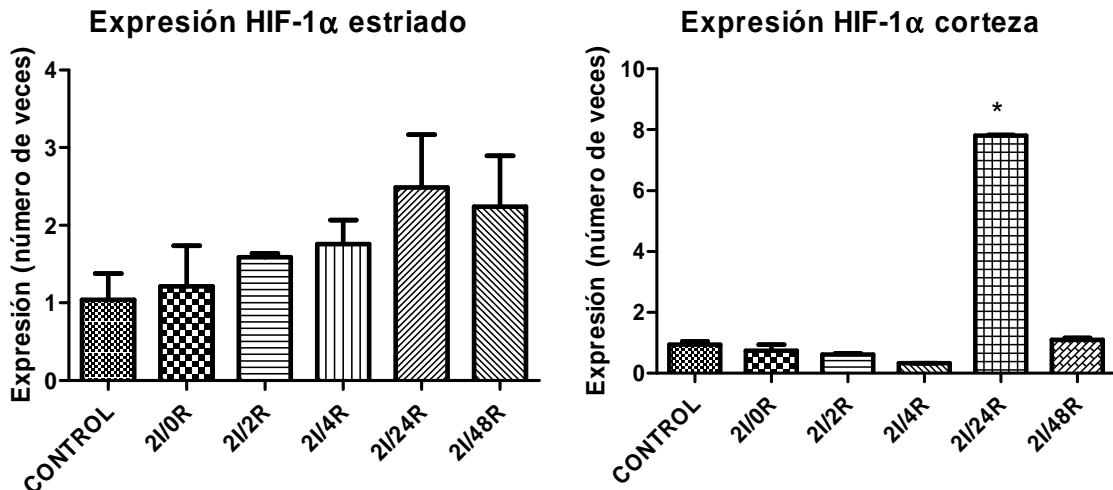
---

<sup>108</sup> Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. (2006) Regulating celular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc. Res.* 71:642–651.

<sup>109</sup> Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci.* 11:4159-4170.

<sup>110</sup> Zhang B, Tanaka J, Yang L, Yang L, Sakanaka M, Hata R, Maeda N, Mitsuda N. (2004) Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. *Neuroscience* 126:433-440.





**Figura 7.** Efecto de la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo a diferentes tiempos en la expresión relativa de HIF-1 $\alpha$  en estriado y corteza. Se grafica la expresión relativa del transcrito de HIF-1 $\alpha$  utilizando 1 ó 2 hrs de isquemia (I) y 2 hrs de I con 0, 2, 4, 24 y 48 hrs de recuperación del flujo sanguíneo (R). ANOVA 1 vía, y Dunnet. Media  $\pm$  D.E. ( $n=4$ ). \* $P<0.05$  vs. CT.

En los ensayos de PCR en tiempo real existen dos tipos de cuantificación, la absoluta y la relativa, ambos casos utilizan el valor de Ct (del inglés *cycle threshold*) que equivale al número de ciclos necesarios para que se alcance un umbral en la señal de fluorescencia. En el caso de la cuantificación relativa, para calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas de ARN se comparan los Cts de las muestras, ya que mientras mayor cantidad del ADNc blanco haya en una muestra, es menor el número de ciclos que se requiere para alcanzar este umbral. El Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial de ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad de ARNm.

Para este trabajo se utilizó la cuantificación relativa que mide los cambios en el estado basal de un gen de interés (en este caso HIF-1 $\alpha$  y HO-1) comparado con un gen endógeno (en este caso el 18S ribosomal) cuya expresión es constante. En el caso de la cuantificación absoluta se usa una cantidad conocida de ADN o ARN ya que se conoce la cantidad absoluta del estándar interno.

Los datos se normalizaron para el valor del gen blanco y el obtenido para el gen endógeno. En este caso se utilizó el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )<sup>111</sup>. Este método es un modelo matemático que calcula los cambios en expresión génica como un cambio

<sup>111</sup> Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods* 25:402-408.

relativo en la expresión (cuantificado en número de veces) entre una muestra experimental (o gen de interés) y un calibrador (o gen endógeno). Para esto se realizó un ensayo de validación usando diluciones seriadas tanto para el gen problema como para el gen endógeno. Se obtuvieron los valores de  $\Delta Ct$  ( $Ct$  gen -  $Ct$  endógeno) y se graficaron en el eje  $y$  contra el logaritmo de la concentración en cada una de las diluciones en el eje  $x$ . La pendiente de la recta debe ser menor o igual a 0.1 para que el método sea válido. Este método requiere que la eficiencia de amplificación  $E$  sea la misma para el gen blanco y el gen endógeno, y se requieren productos de PCR pequeños (aproximadamente 150-200 pb).

Para calcular la expresión de un gen en número de veces se determina el  $\Delta Ct$  ( $Ct$  del gen menos el  $Ct$  del endógeno) para cada muestra, posteriormente se obtiene el  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  de cada muestra menos el  $\Delta Ct$  promedio del control) y se calcula el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , de este modo se obtiene la expresión en número de veces del gen estudiado.

En las graficas de la figura 7 se puede observar que no existe diferencia significativa respecto al control para la expresión del HIF-1 $\alpha$  en los diferentes grupos tanto en estriado como en corteza cerebral. Estas dos regiones de tejido fueron evaluadas ya que el estriado y la corteza cerebral son zonas irrigadas por la ACM y la corteza corresponde a la zona de penumbra, la cual constituye tejido dañado pero que puede ser recuperado ya que existe circulación colateral para esta zona. En la corteza hay un aumento a las 2I/24R que es significativo respecto al control, cabe mencionar que se repitió el experimento para la corteza con las mismas muestras y presentó el mismo patrón, por lo que se deberá evaluar con otro grupo diferente de ratas. Una forma en la que se puede determinar el cambio es evaluando la expresión de HIF-1 $\alpha$  con 2h de isquemia e introducir más tiempos de recuperación del flujo sanguíneo entre las 4 y 24 horas para saber cómo se da el cambio.

Como se mencionó anteriormente se sabe que la regulación del HIF-1 $\alpha$  es a nivel postraducciona, por lo que se decidió evaluar su expresión a nivel de proteína por *western blot*, los resultados que se obtuvieron no se muestran ya que las bandas para todos los grupos presentaron un patrón de degradación. Al tratar de mejorar la señal se pudo obtener una banda específica, sin embargo, ésta se observó a 25 kDa, esta banda no corresponde al HIF-1 $\alpha$  completo ya que éste pesa 120 kDa. Esta degradación pudo

deberse al proceso de obtención de núcleo y citoplasma o a que no se encontraron las condiciones óptimas para el procesamiento y detección de HIF-1 $\alpha$  en las muestras. En condiciones hipóxicas HIF-1 $\alpha$  es estabilizado, por lo que se debió ver su banda en la muestra con 2 horas de isquemia, sin embargo no se observó ninguna señal. Estos resultados se deberán evaluar para encontrar las condiciones de detección para HIF-1 $\alpha$ , ya que este factor inducible por hipoxia debe de estar presente al menos en las condiciones hipóxicas. En el caso de las muestras con 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de recuperación de flujo sanguíneo las bandas tendrían que disminuir debido a que al recuperarse el flujo vuelven las condiciones “normales” de oxígeno y HIF-1 $\alpha$  es degradado.

### **Evaluación a nivel de transcrito y proteico para HO-1 ante la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo.**

Como se mencionó en la introducción, a la fecha el único fármaco utilizado para la protección en isquemia cerebral es el r-TPA, es que eficiente únicamente dentro de las 4.5 h de la aparición de los síntomas neurologicos<sup>69</sup>. Sin embargo, no se sabe cuándo ocurrirá un evento isquémico, por lo que una de las formas de proteger al tejido podría ser la estimulación de un sistema endógeno, como lo es la HO-1 que ha mostrado ser uno de los mecanismos protectores más importantes contra el daño en I/R<sup>112</sup>. En injertos y trasplantes, la HO-1 previene el daño por I/R atenuando la apoptosis<sup>113</sup> y su sobreexpresión protege a través de una vía antiapoptótica ante el daño por I/R en un modelo de daño cardíaco en ratas<sup>114</sup> así como en modelos de daño hepático<sup>115</sup>. Otros de los reportes que se tienen acerca del sistema HO-1 es que está implicado en el mantenimiento de la homeostasis celular y puede proporcionar defensa celular gracias a

---

<sup>112</sup> Aztatzi-Santillán E, Nares-López FE, Márquez-Valadez B, Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME. (2010) The Protective Role of Heme Oxygenase-1 in Cerebral Ischemia. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*.

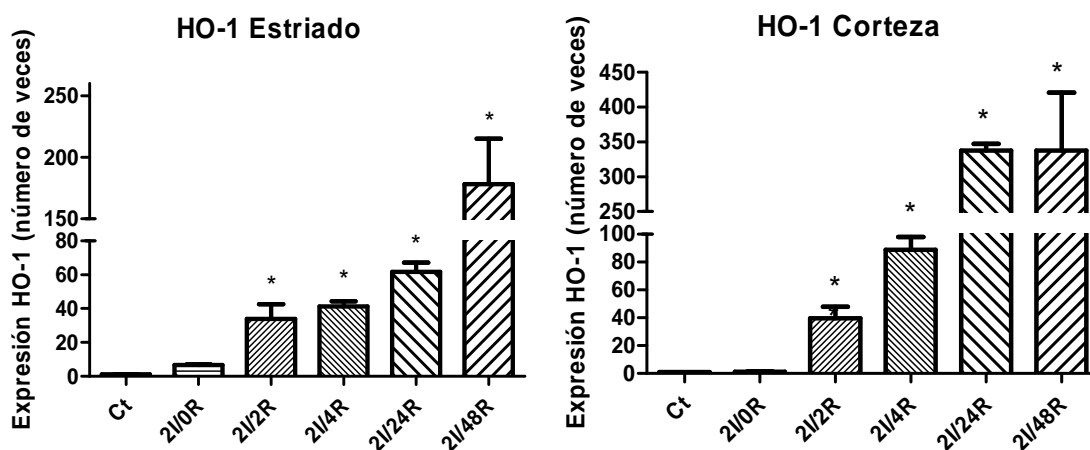
<sup>113</sup> Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. (2003) Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int*.63:1564-1573.

<sup>114</sup> Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, Ledermann M, Baer HU, Dufour JF. (2002) Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* 35:1082-1092.

<sup>115</sup> Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busutil RW, Kupiec-Weglinski JW. (2002) Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation*. 27;73:287-292.

sus propiedades anti-apoptóticas, anti-inflamatorias y anti-oxidantes, debido principalmente a los productos de su reacción<sup>116</sup>.

En este trabajo se evaluó la expresión de HO-1 en un modelo de I/R con la OACM en ratas, a los mismos tiempos de I y R utilizados para HIF-1 $\alpha$ . Los resultados de esta expresión se muestran en la figura 8.



**Figura 8.** Efecto de la isquemia y recuperación del flujo sanguíneo en la expresión relativa de HO-1 en estriado y corteza. Se grafica la expresión relativa del transcrito de HO-1 utilizando 1 ó 2 hrs de isquemia (I) y 2 h de isquemia con 0, 2, 4, 24, 48 hrs de recuperación del flujo sanguíneo (R). *Anova* 1 vía y Dunnet. Media  $\pm$  D.E. ( $n=6-8$ ). \* $P<0.05$  vs. CT.

La expresión relativa de HO-1 en el estriado tiene una tendencia gradual al aumento iniciando el cambio significativo a las 2I/2R con 33.9 veces. Éste incremento llega a un pico a las 2I/48R, teniendo un aumento de 178 veces de expresión de HO-1 respecto al control. En el caso de la corteza se observa una tendencia similar a la que presenta el estriado. Para la corteza cerebral, la máxima expresión de HO-1 se tiene a las 2I/48R con un valor mayor de 338 veces de expresión. En primera instancia la diferencia en expresión de HO-1 que existe entre el estriado y la corteza, se debe posiblemente a que la región del estriado cerebral es más propensa al daño y las células ya no pueden expresar mucho la HO-1, mientras que en el área de la corteza cerebral el tejido no se ha dañado mucho y la expresión es mucho mayor. Uno de los reportes con

<sup>116</sup> Otterbein LE, Choi AM. (2000) Heme oxygenase: colors of defence against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279:L1029–L1037.

los que se pueden comparar estos resultados es con los obtenidos por Paschen y col.<sup>117</sup>, en los cuales evalúan por PCR semicuantitativo la expresión de HO-1 en hipocampo, corteza y estriado. Ellos realizaron 30 min de isquemia global con 2, 4, 8 y 24 horas de recuperación del flujo sanguíneo. Este grupo reporta un incremento después de la isquemia hasta las 24 horas de recuperación del flujo sanguíneo, de 8 a 9 veces la expresión de HO-1 respecto al control para corteza y estriado respectivamente.

Los valores de expresión del gen HO-1 son indicativos de que es un sistema que juega un papel importante en las respuestas que se dan frente a un evento de I/R. Uno de los resultados en los que se ha visto implicado en la respuesta protectora de la HO-1 frente a la isquemia es en los ratones *knockout* para HO-1 sometidos a preconditionamiento isquémico (PCI). Previamente se demostró que la HO-1 es activada 24 horas después del PCI y sigue siendo sobrerregulada hasta los 7 días en cerebros de ratas recién nacidas<sup>118</sup>. Recientemente Zeynalov y col.<sup>119</sup> han demostrado que usando ratones silvestres y *knockout* para HO-1 a los cuales se les sometió a OACM de forma transitoria o permanente, el PCI protegió a ratas silvestres, reduciendo el volumen de infarto a 57% y a 33.9% para la isquemia transitoria o permanente respectivamente e incrementó la HO-1a nivel proteico. Mientras que el PCI no protegió a los ratones *knockout* para HO-1, indicando que la HO-1 está involucrada en la protección mediada por PCI.

Con los resultados obtenidos en esta tesis se puede evidenciar que la isquemia, así como la recuperación del flujo sanguíneo son dos factores importantes para inducir en gran medida a la HO-1. Además de esto, se tienen reportes que este sistema de HO está involucrado en la protección frente a agentes oxidantes en las células, como lo demuestra el estudio hecho por Li Volti y col.<sup>120</sup> en que la inducción de HO-1 por SnCl<sub>2</sub> o el tratamiento con biliverdina en tejido renal, redujo en gran medida la producción de hidroperóxido lipídico (producto de la peroxidación lipídica), así como la reducción de

---

<sup>117</sup> Paschen W, Uto A, Djuricic B, Schmitt J. (1994) Hemeoxygenase expression after reversible ischemia of rat brain. *Neurosci Lett.* Oct 10;180:5-8.

<sup>118</sup> Bergeron M, Ferriero DM, Vreman HJ, Stevenson DK, Sharp FR. (1997) Hypoxia ischemia, but not hypoxia alone, induces the expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in newborn rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17:647-658.

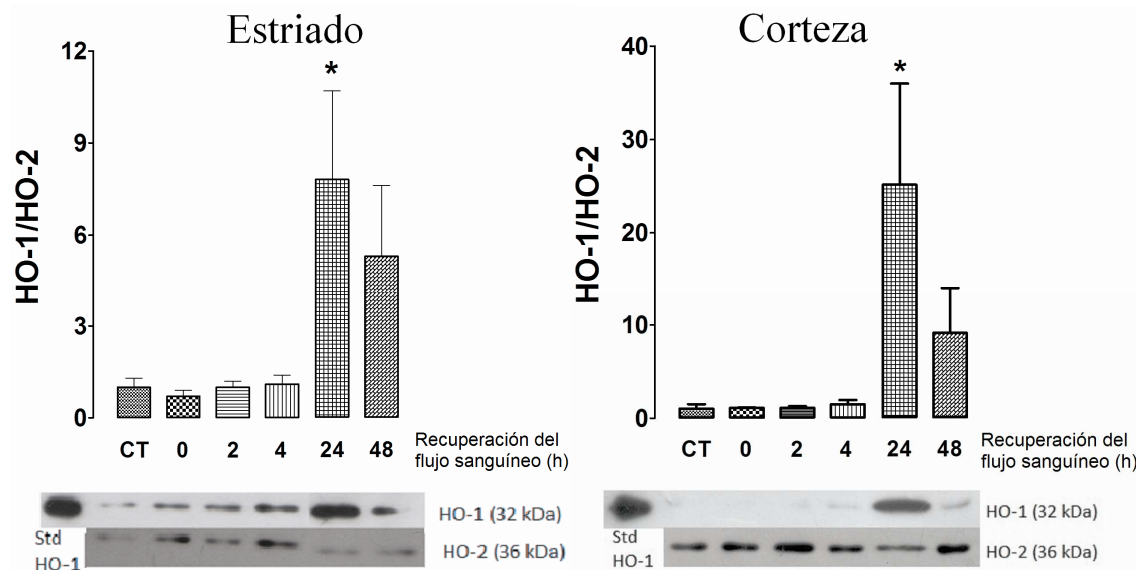
<sup>119</sup> Zeynalov E, Shah ZA, Li RC, Doré S. (2009) Heme oxygenase 1 is associated with ischemic preconditioning-induced protection against brain ischemia. *Neurobiol Dis.* 35:264-269.

<sup>120</sup> Li Volti G, Sorrenti V, Murabito P, Galvano F, Veroux M, Gullo A, Acquaviva R, Stacchiotti A, Bonomini F, Vanella L, Di Giacomo C. (2007) Pharmacological Induction of Heme Oxygenase-1 Inhibits iNOS and Oxidative Stress in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings.* 39:2986-2991.

la formación de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (ambas moléculas altamente reactivas implicadas en complicaciones cardiovasculares).

Como se mencionó anteriormente la recuperación del flujo sanguíneo después de un evento isquémico conduce al aumento del estrés oxidante por las ERN/ERO<sup>2</sup>. La sobreexpresión de HO-1 es probablemente una respuesta celular para aminorar el daño oxidante, el cual puede ser disminuido por los productos de la reacción de la HO-1, como es el caso de la biliverdina y de la bilirrubina. Esto se ve corroborado por los resultados de Doré y col.<sup>121</sup> que exploraron el efecto neuroprotector de la bilirrubina al provocar daño oxidante con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en cultivos neuronales. La neurotoxicidad fue significativamente mayor en cultivos de HO-2<sup>-/-</sup>. Los cultivos tratados con bilirrubina unida con albúmina humana presentaron un daño celular menor, indicando que el sistema biliverdina/biliverdina puede proteger las células.

Después de observar el incremento en el transcrito de HO-1, se decidió evaluar la expresión a nivel de proteína por *western blot*, para ver si las células en estas condiciones son capaces de sintetizar esta proteína. Los resultados de cantidad de proteína se presentan en la figura 9.



**Figura 9.** Análisis densitométrico para la expresión de HO-1 en estriado y corteza cerebral a 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo. Se grafica el promedio de los datos  $\pm$  EEM,  $n=5-6$  \* $p<0.01$  vs. 0 (control)

<sup>121</sup> Doré S, Snyder SH. (1999) Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. *Ann N Y Acad Sci* 890:167–172.

Como se puede observar en el estriado cerebral la primera barra representa el control, que es el nivel basal de HO-1, la siguiente barra representa 2 hrs de isquemia sin recuperación del flujo sanguíneo. Este valor es menor al control, esto puede deberse a que el daño causado por la isquemia disminuye la cantidad de proteína HO-1. Posteriormente los otros grupos a los que se sometió a 2 hrs de isquemia y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo presentan un incremento en la cantidad de HO-1, hasta un pico a las 2-24 (2 hrs de isquemia y 24 hrs de recuperación del flujo sanguíneo). En el caso del estriado, 2 h de isquemia y 24 o 48 h de recuperación del flujo sanguíneo muestran un incremento de 7.8 y 5.3, respectivamente. Sin embargo, debido a la dispersión de los datos, únicamente 2I/24R tiene una diferencia significativa. En el caso de la corteza se presenta una tendencia similar a la obtenida en el estriado, con un aumento significativo de 25.1 veces a las 2I/24R y disminuye a 9.1 veces a las 2I/48R. Como se puede observar hay una mayor cantidad de proteína HO-1 en corteza que en estriado, al igual que los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, esto puede deberse a que la corteza está más alejada del daño y de este modo las células aún son capaces de expresar mayor cantidad de HO-1.

La HO-2 es la enzima constitutiva encontrada en altas concentraciones en el cerebro, glándulas adrenales y los testículos<sup>122</sup>. Se ha determinado en áreas como corteza, hipocampo, estriado y tálamo de ratas, que los niveles proteicos de HO-2 no cambian respecto al control al inducir una isquemia global<sup>123,124</sup>. En este trabajo se utilizó como control de carga la HO-2 porque se ha reportado que su nivel proteico no cambia<sup>125,74,126</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo para la cantidad de proteína, se encontró que las bandas obtenidas por *western blot* para HO-2 presentaron variaciones en corteza y estriado cerebral. Al encontrar esto revisamos en la literatura si había reportes recientes de cambios en la cantidad de proteína para HO-2 en condiciones de

---

<sup>122</sup> Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD. (1990) Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem* 265:8212–8217.

<sup>123</sup> Geddes JW, Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD, Maines MD. (1996) Permanent focal and transient global cerebral ischemia increase glial and neuronal expression of heme oxygenase-1, but not heme oxygenase-2, protein in rat brain. *Neurosci Lett.* 210:205–208.

<sup>124</sup> Takeda A, Kimpara T, Onodera H, Itoyama Y, Shibahara S, Kogure K. (1996) Regional difference in induction of heme oxygenase-1 protein following rat transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett.* 205:169–172.

<sup>125</sup> McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. (1997) Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 272:12568.

<sup>126</sup> Maines MD, Panahian N. (2001) The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* 502:249.

isquemia y encontramos que Sutherland y col.<sup>127</sup> observaron que existe un aumento en la expresión de HO-2 en células neuronales y gliales post-isquemia cerebral y en particular en el modelo de hipoxia isquémica (HI). El modelo HI produce una lesión cerebral unilateral a través de una combinación de hipoxia e isquemia global. La propuesta de estos autores es que el componente hipóxico podría ser el responsable de aumentar la expresión HO-2. Otra evidencia de que HO-2 no es estrictamente constitutiva, fue la observada por Govindaraju y col.<sup>128</sup> quienes determinaron que la expresión de la proteína HO-2 se incrementó en la aorta torácica de rata tras 16 hrs de hipoxia. Este es otro indicativo de que la expresión de HO-2 se puede inducir. Estos reportes nos hacen pensar que la HO-2, considerada constitutiva no lo es en todas las condiciones de hipoxia prolongada.

Los resultados de esta tesis son otro indicativo de que la expresión de HO-2, considerada como constitutiva, no lo es en condiciones de I/R. Por otro lado, en este trabajo al haber aislado fracciones microsomales, no estábamos seguros de que una proteína constitutiva, como la tubulina o la actina nos dieran una señal adecuada, por lo que elegimos utilizar la HO-2, que era considerada constitutiva y conocida como proteína microsomal. Entonces, para conocer la cantidad de proteína HO-1 real en estos grupos se deberá utilizar otro control de carga como la tubulina.

### **Actividad enzimática para el sistema hemoxigenasa**

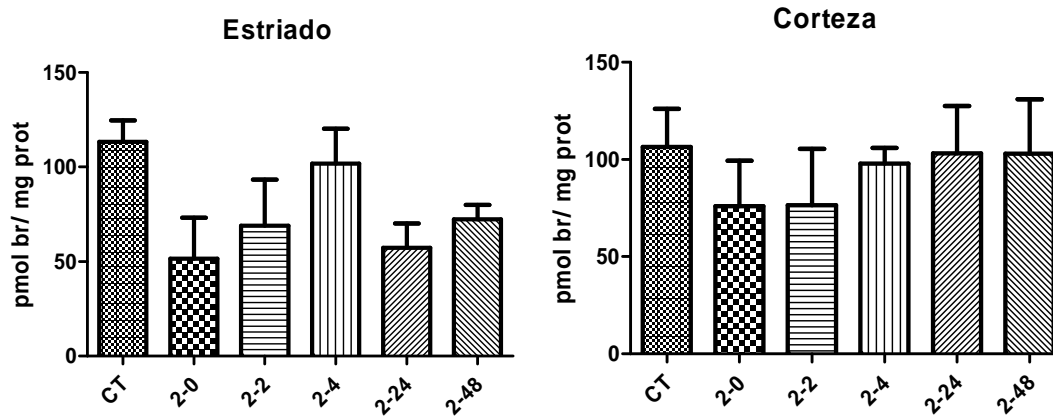
El claro incremento a 2I/24R en la expresión proteica de HO-1, nos indica una respuesta por parte de las células sobrevivientes a la isquemia, por lo que se decidió evaluar si la actividad de la enzima correspondía a este incremento y determinar si la enzima era funcional bajo esas condiciones. Esta actividad se determinó por el método de la producción de bilirrubina que se produce por la acción consecutiva de la HO y de la biliverdina reductasa, utilizando como sustrato inicial al grupo hemo. Los resultados de actividad de HO se presentan en la figura 10.

---

<sup>127</sup> Sutherland B, Rahman R, Clarkson A, Shaw O, Nair S, Appleton I. (2009) Cerebral heme oxygenase 1 and 2 spatial distribution is modulated following injury from hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci. Res.* doi:10.1016/j.neures.2009.08.007

<sup>128</sup> Govindaraju V, Teoh H, Hamid Q, Cernacek P, Ward ME. (2005) Interaction between endothelial heme oxygenase-2 and endothelin-1 in altered aortic reactivity after hypoxia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H962–H970.





**Figura 10.** Actividad enzimática de HO por producción de bilirrubina en estriado y corteza cerebral a dos horas de isquemia y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo. Se grafica el promedio de los datos  $\pm$  EEM,  $n=5-6$ .

En la determinación de la actividad enzimática para el sistema HO, los resultados representan la actividad de HO-1 y HO-2 para formar bilirrubina. Las barras control presentan la actividad enzimática del sistema HO en condiciones basales tanto para estriado como para corteza cerebral. Posteriormente a 2 horas de isquemia sin recuperación del flujo sanguíneo la actividad de HO disminuye. Esto puede ser atribuido al daño causado a las células por el período de isquemia. Para las siguientes barras con 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo aumenta la actividad enzimática y sólo en la corteza llega a recuperarse a niveles basales. Aunque el análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa en los grupos de estriado y corteza cerebral, se puede observar que en estriado hay una menor actividad enzimática que en corteza, excepto a las 2I/4R, en la cual parece que hay un aumento considerable en la actividad de HO. El estriado es más afectado por I/R ya que es la zona principalmente irrigada por la ACM y esto puede estar relacionado con la menor actividad presentada a las 2I/24R y 2I/48R.

Estos resultados sugieren que la expresión del sistema HO juega un papel muy importante en la respuesta a la isquemia y en particular en la recuperación del flujo sanguíneo. La función principal del sistema HO es degradar la molécula hemo para producir hierro, monóxido de carbono y biliverdina ésta última es inmediatamente reducida a bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa. Las propiedades intrínsecas de estos subproductos pueden ser los causantes de la señalización intracelular y los factores antioxidantes para la neuroprotección.

## CONCLUSIONES

- Se demostró por PCR en tiempo real que la expresión del HIF-1 $\alpha$  no presentó cambios significativos en la corteza y estriado cerebral de las ratas sometidas a isquemia cerebral y diferentes tiempos de recuperación del flujo sanguíneo. Esto coincide con todas las evidencias que apoyan que la regulación de HIF-1 $\alpha$  es post-traducciona l y no a nivel de transcrito.
- En la determinación proteica hecha por *western blot* para HIF-1 $\alpha$ , se encontró degradada la proteína, esto puede deberse a la labilidad que tiene la proteína en condiciones de oxígeno.
- En el análisis por PCR en tiempo real para la expresión de la HO-1, se observó un incremento gradual y con diferencia significativa para la corteza y estriado cerebral desde las 2 horas de isquemia con 2 horas de recuperación del flujo sanguíneo hasta un pico a las 2 horas de isquemia con 48 horas de recuperación del flujo sanguíneo. Este grupo presentó un aumento de 175 veces para el estriado y un aumento de 380 veces para la corteza.
- La expresión proteica medida por *western blot* presentó un aumento con diferencia significativa a las 2 horas de isquemia y 24 horas de recuperación del flujo sanguíneo tanto para la corteza como para el estriado. Por las variaciones observadas para HO-2, esta investigación tendrá que continuar para determinar la expresión de HO-1 y HO-2 en nuestros grupos.
- A pesar del daño provocado a la corteza y al estriado cerebral, se logró evidenciar que el sistema HO tiene la capacidad de presentar actividad enzimática luego de estar expuesto al daño por isquemia y recuperación del flujo sanguíneo.

## **PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

Los resultados de este trabajo son la base de una investigación que se lleva actualmente en el laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Es la primera vez que se presentan resultados por PCR en tiempo real para la HO-1. Dada la sensibilidad de esta técnica y los niveles de expresión encontrados para HO-1, podemos suponer que el sistema HO tiene una respuesta importante como resultado de la I/R.

En el caso de la expresión a nivel de transcrito en la corteza cerebral para HIF-1 $\alpha$  se deberá seguir trabajando en su determinación, incluyendo nuevos grupos entre las 2I/4R y 2I/24R, para determinar si la diferencia significativa encontrada a las 2I/24R es real.

La cuantificación proteica para HO-1 se deberá evaluar con un control endógeno que no cambie su expresión en condiciones de I/R. Por otro lado, resulta muy interesante determinar la expresión de HO-2 a nivel transcripcional y proteico como resultado de la isquemia y la recuperación del flujo sanguíneo en el modelo de OACM.

# The Protective Role of Heme Oxygenase-1 in Cerebral Ischemia

Emmanuel Aztatzi-Santillán<sup>1</sup>, Felipe Eduardo Nares-López<sup>1</sup>, Berenice Márquez-Valadez<sup>2</sup>, Penélope Aguilera<sup>1</sup> and María Elena Cháñez-Cárdenas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, <sup>2</sup>Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A., México D.F. 14269, México

**Abstract:** Cerebral ischemia is one of the leading causes of death and disability in industrialized countries, with no curative treatments to date. Identification of potential targets and elucidation of their physiological role under stress conditions may give support to the development of drugs and strategies to contend with this pathology. In the last years, Heme oxygenase-1 (HO-1) has been recognized by many groups as a potential target in ischemic damage. HO-1 is the enzyme responsible for the conversion of the heme group to biliverdin, carbon monoxide and iron; a highly regulated cytoprotective enzyme able to respond to numerous chemical or physical stressors, many of which decrease oxygen availability and generate oxidative stress. The disruption of HO-1 activity has been widely associated with a bad outcome in many disorders, and a protective role through its heme catabolism products has been observed in transplantation, cardiac ischemia, limb ischemia/reperfusion and different alterations that involve ischemia and reperfusion events. Here, we review recent reports supporting the protective role of HO-1 in cerebral ischemia. Results on the endogenous HO-1 response, overexpression of HO-1 and compounds that reduce ischemic damage through the induction of HO-1 in cerebral ischemia in *in vivo* and *in vitro* models are analyzed.

**Keywords:** Cerebral ischemia, heme-oxygenase -1, neuroprotection, oxidative stress.

## INTRODUCTION

Transient or permanent reduction of cerebral blood flow and the consequent decrease in oxygen and glucose supply to the brain cause cerebral ischemia. Biochemical damage involves the ATP depletion which elicits the loss of membrane potential. The disruption in ion homeostasis originated by the disturbance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>/H-ATPase pumps, and the reversed Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> transporter, provokes an increase in intracellular Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations, as well as extracellular K<sup>+</sup>. The loss of membrane potential depolarizes cells with the consequent massive release and accumulation in the extracellular space of glutamate and aspartate. An increase in Ca<sup>2+</sup> concentrations, the generation of reactive oxygen and nitrogen species leading to oxidative stress and free radical generation, the inhibition of protein synthesis, and further inflammation and apoptosis, are part of an "ischemic cascade" that ends in deadly events in the brain tissue. Although this sequence of events has been extensively characterized, clinically, cerebral ischemia is a disorder with no efficient treatments to date. Beside the use of thrombolytics, which have a narrow therapeutic window, the only possible action to contend with cerebral ischemia damage is the control of risk factors, which has shown to decrease the incidence of events. Cerebral ischemia is along with cancer and cardiac arrest, one of the most important causes of death in industrialized countries and the first cause of disability, with an important economic cost to society.

In addition to the biochemical response, stress by oxygen absence triggers a gene expression program to activate protective signals for a recovery process or to stimulate additional tissue injury depending on the intensity and length of the ischemic insult. Based on this transcriptional activation, an interesting approach to study cerebral ischemia is the use of ischemic preconditioning (IP), an event in which a brief ischemic episode results in resistance to a subsequent and severe ischemic insult. The study of endogenous cell response to ischemic events could clarify targets, inducible proteins and pathways to deal with ischemic damage. In this review, we discuss about the role of the stress inducible protein HO-1 in cerebral ischemia.

Several strategies that have provided information on HO-1 in ischemic processes were first observed in cardiac or renal ischemia as well as grafts and transplant-induced ischemic events. However, relevant information has been generated on HO-1 in cerebral ischemia over the recent years, since results suggest that HO-1 is part of the IP response. An overview of HO-1 and results on the protective role of HO-1 in cerebral ischemia are discussed. Finally the use of potential neuroprotective compounds that involve HO-1 activity and overexpression in their protective mechanisms are reviewed.

## HEME OXYGENASE

HO is a cytoprotective enzyme responsible for the first step in the catalysis of the heme group generated within the cell from heme-containing proteins such as myoglobins, cytochromes, catalases, etc [1]. HO catalyzes the conversion of a pro-oxidant molecule (b-type heme) into iron (Fe<sup>2+</sup>) and the physiological products biliverdin IX<sub>α</sub> and carbon monox-

\*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Av Insurgentes Sur 3877, México D.F. 14269, México; Tel: +(52)5556063822, Ext: 2009; Fax: +(52)5554240808; E-mail: echanez@bq.unam.mx ; echanezc@gmail.com

ide (CO) using heme both as a prosthetic group and as substrate. HO has been known as an adaptive cellular response to different stress conditions. Even the CO generated by the reaction has been recognized as a toxic molecule at high concentrations, positive effects of physiological CO have been observed particularly as vasodilator and regulator of the vascular tone [1,2]. In turn, biliverdin generated by HO catalysis is a natural and potent antioxidant. Evidences suggest that in the cell, biliverdin generated by HO is immediately converted to bilirubin, a pigment with potent antioxidant properties, by the biliverdin reductase enzyme. The third product is  $\text{Fe}^{2+}$ , identified as cytotoxic particularly because it participates in Fenton's reaction. However, it is known that ferritin, an iron binding protein, sequesters the ferrous ion, thus reducing its harmful effects. In fact, a role of HO in iron homeostasis, particularly during the reuse of iron for erythropoiesis, has been suggested [3]. It has been discussed by Idriss *et al.* [2], that current published results on HO-1 show that protective effects of bilirubin and CO exceed the potentially damaging effects of  $\text{Fe}^{2+}$ .

### THE INDUCIBLE HEME OXYGENASE-1 (HO-1)

HO is an endoplasmic reticulum-associated protein. Two isoforms of HO are known, a 32 kDa inducible HO-1, and the 38 kDa HO-2 constitutive isoform. The carboxy-terminal hydrophobic protein domain segment of HO-1 and the HO-2 isoforms suggests a general membrane compartmentalization. In fact, it has been proposed that HO-1 is compartmentalized in other subcellular domains [4] such as in liver mitochondria [5]. HO-2 isoform is abundant in testis and brain of mammals, opposite to the HO-1 inducible form, which is expressed at low basal levels under physiological conditions, except in spleen, where it is abundant. However, HO-1 responds to diverse stimuli by transcriptional regulation.

In addition to heme role as HO-1 inducer, numerous stressors such as heavy metals, thiol-reactive agents, inflammatory mediators, hormones, oxidants, endotoxin, endoplasmic reticulum associated stress, ischemia, hyperoxia, hyperthermia, radiation and hypoxia are potent inducers of HO-1 [6]. Many of the chemical or physical stressors are agents that decrease oxygen concentration or provoke oxidative stress.

As a protective enzyme, HO-1 upregulation by stress inducers depends on a variety of transcriptional regulators such as the heat shock factor, nuclear factor-kappa B, Activator protein 1 (AP-1), NF-E2 related factor (Nrf2), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), and upstream kinases, mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathways, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), or protein kinases A and C (PKA, PKC) [7,8].

A considerable amount of evidence supports the protective role of HO-1 in atherosclerotic vascular disease [3], cardiovascular disease [2] and ischemic-reperfusion injury, particularly in limb ischemia and transplant grafts. In transplanted organs, the ischemic-reperfusion injury involves inflammatory processes and reactive oxygen species generation. Local HO-1 overexpression includes antioxidant activity, maintenance of microcirculation, and antiapoptotic and anti-inflammatory functions, suggesting that the HO-pathway is a complex and coordinated protective system.

The overexpression of endogenous HO-1 is capable of reducing cell death by apoptosis and necrosis of chronically ischemic musculocutaneous tissue [9]. Protective role of endogenous HO-1 has been reported in limb ischemia/reperfusion (I/R), and HO-1 induction in transplantation has been used as a therapeutic target to prevent I/R injury (reviewed in [6]). The observed protection has been attributed to the products of heme catabolism, preventing the progression of liver injury after limb I/R [10]. The use of *hmx1*<sup>+/+</sup> and *hmx1*<sup>-/-</sup> mice to functionally evaluate the role of HO-1 in different diseases has shown that the lack of HO-1 worsens the pathologic outcome of several diseases such as myocardial infarction, atherosclerosis, restenosis, ischemic reperfusion injury in kidney, lung or heart, endotoxin shock, experimental cerebral malaria, severe sepsis, xenograft and allograft rejection and autoimmune neuroinflammation (reviewed in [11]).

### ENDOGENOUS HO-1 AND CEREBRAL ISCHEMIA STUDIES

#### HO-1 Response to Cerebral Ischemia

HO isoforms have been determined in the different brain regions. In the normal rodent brain HO-1 is localized in selected neuronal populations, but heat shock, *in vivo* glutathione depletion and *in vitro* oxidative stress induce HO-1 predominantly in glial cells [12]. More recently, using a real time RT-PCR approach, Scapagnini *et al.* [13] assessed the mRNA expression profiles of HO isoforms. They determined HO mRNAs in frontal, parietal, occipital and temporal cortex, hippocampus, striatum, bulb, pons and cerebellum. Results showed that HO-2 mRNA is expressed in all the regions tested, while HO-1 is minimally detectable.

Several results along literature suggest that post-ischemic upregulation of HO-1 appears to be part of the response mechanisms of the brain to reduce neuronal damage. Particularly, some studies in transgenic mice overexpressing HO-1 revealed that they were less susceptible to the middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced neuronal injury than control mice after 6 and 24 h of permanent ischemia when infarct volume was determined [14]. It was also observed that ischemia and reperfusion modify HO-1 expression. Semiquantitative PCR in hippocampus, striatum and cortex, estimated after 30 minutes of global ischemia and 2, 4, 8 and 24 h of reperfusion showed a constant increase in HO-1 (8- and 9-fold increase of control) after 24 h of recirculation in the cortex and striatum. In the hippocampus, HO-1 mRNA levels peaked at 4 h after ischemia (9-fold of control) and declined to 4.5-fold of control at 24 h after ischemia [15]. Moreover, in a model of forebrain ischemia, the gene expression of HO-1 was determined by Northern blot and *in situ* hybridization. After 20 min of ischemia, HO-1 mRNA was not detectable in RNA obtained from sham or 0.5 h reperfusion rats. In contrast, after 1.5 h reperfusion, HO-1 mRNA was detectable, and the maximum levels were observed at 12 h, to be decreased later. The HO-1 mRNA distribution was further studied and results revealed that after 12 h of reperfusion, there is a marked increase in neuronal and glia-like cells from neocortex, hippocampus and part of the thalamus [16]. Another study showed that after 90 min of MCAO, HO-1 mRNA levels increased from 4 h to 7 days, with a

peak at 12 h. Immunodetection of HO-1 also showed that this molecule is localized in astrocytes and microglial cells in the perifocal area, although some perifocal neurons were also HO-1-immunoreactive. In the infarcted area HO-1-positive microglia/macrophages were detected in double-labelling experiments. An activity assay also demonstrated a two-fold increase in HO activity in the infarcted core [12].

A recent study using MCAO and hypoxia models analyzed HO-1 and HO-2 by western blot and immunodetection to determine their regional and cellular distribution after ischemia and hypoxia. Brain regions that had upregulated immunoreactivity for HO-1 in both neurons and glial cells following hypoxia were also regions that had greater susceptibility to ischemic damage, and they included the cerebral cortex, the hippocampus, the thalamus and the olfactory system. Other brain regions such as the amygdala, the midbrain, the pons, the medulla and the cranial nerve nuclei, exhibited some HO-1 immunoreactivity following cerebral ischemia [17].

### Protective Role of HO-1 in Ischemia

Consistent evidence that HO-1 is involved in the protective response to ischemia has been shown through HO-1 knockout mice subjected to IP. Previous work has shown that HO-1 is activated 24 h after IP and remains up-regulated for up to 7 days in newborn rat brains [18]. Recently, using HO-1 knockout mice subjected to transient or permanent MCAO (tMCAO or pMCAO, respectively), it was observed that IP protected wt rat brains by reducing infarct volumes in the two models by 57.4% and 33.9% respectively, while increased HO-1 protein levels. Of note, IP did not protect HO-1 knockout mice, indicating that neuroprotective effects of IP are at least partially mediated via HO-1 [19].

In a model of transient focal ischemia developed by extradural compression (EC) of the sensorimotor cortex, the neuroprotective role of endogenous HO-1 in ischemia was also observed. Comparing non-insulin dependent Goto-Kakizaki (GK) diabetic rats with normal Wistar rats, it was observed that HO-1 was reduced in the first, while EC provoked hyperglycemia in both strains. After 48 h reperfusion, HO-1 mRNA expression was 7- to 8-fold higher in the ischemic cortex of both strains, showing that hyperglycemia may induce mRNA expression, and this upregulation could be an endogenous response to an increased pro-oxidant state. HO-1 protein however, is reduced in the cortex of GK rats after 48 h of reperfusion, which is associated with a more severe neuronal death in these rats when compared with Wistar control rats. Apparently, this contradiction in mRNA and protein is due to a different post-transcriptional regulation of HO-1 in diabetic rats, which was already observed in previous works [20].

### Induction of HO-1 by different Compounds in Cerebral Ischemia Studies

In cerebral ischemia, the use of compounds to induce overexpression of HO-1 is a useful strategy. Here, we reviewed recent research in using compounds that have shown neuroprotection through HO-1 induction in *in vivo* and *in vitro* models of ischemia damage.

### Natural Compounds

A lot of evidence indicates that antioxidant compounds affect the expression of transcriptional factors and antioxidant enzymes. The powdered rhizome of *Curcuma longa* Linn, curcumin, a known compound with antioxidant and anti-inflammatory properties, has shown to protect in ischemic models. Using pMCAO ischemia, the transcription factor Nrf2, and gene and protein levels of HO-1 were upregulated after 3 h of ischemia onset and peaked at 24 h. This overexpression results in improved brain edema and behavioral deficits [21].

The increase in HO-1 protein expression has also been related with protection with other compounds. This is the case of Sasim administration. Although the mechanism has not been elucidated, positive effects with Sasim, a seven herbal mixture used in the traditional oriental medicine were observed in cerebral infarction patients. Using THP-1 differentiated macrophage-like (THP-1/M) cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from these patients, Kim *et al.* [22] evaluated lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- $\alpha$  at the levels of secretory protein, and mRNA in both PBMCs and THP-1/M cells. It was observed that LPS-induced TNF- $\alpha$  was considerably suppressed when HO-1 was strongly upregulated at mRNA and protein level in response to Sasim administration. In addition, the use of a tin protoporphyrin IX, an inhibitor of HO-1 catalytic activity, blocked Sasim effects, suggesting that this mixture decreases the inflammatory process in cerebral infarction through the induction of HO-1 [22].

Based on previous observations that Prostaglandin E1 (PGE1) and lithium protect neurons against ischemic injury, a study was designed to know if lithium could potentiate the neuroprotection of PGE1 against cerebral ischemia. It was also studied if this synergetic effect involved heat shock proteins HSP70 and HO-1. The authors pretreated pMCAO rats with lithium, and PGE1 was administered immediately after the ischemic insult. Treatment with PGE1 or lithium alone reduced infarct volume, neurological deficits and brain edema induced by focal cerebral ischemia, and a greater neuroprotection was observed when PGE1 and lithium were given together. It was also observed that protein levels of HO-1 were significantly upregulated 24 h after the co-administration of these drugs [23].

The secosteroid 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-D3), a modulator of the immune system, has also shown a neuroprotective effect in the MCAO model of cerebral ischemia [24], and more recently in the focal cortical ischemia elicited by photothrombosis [25]. In the late model, it has been reported that glial HO-1 immunoreactivity is transiently upregulated. Although the infarct area was not reduced, a reduction in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in remote cortical regions affected by a secondary spread of injury was observed, suggesting that 1,25-D3 exerts a protective action in regions affected by secondary injury-related responses.

### HO-1 Overexpression through Nrf2 Regulation

Nrf2 is a transcription factor that induces an antioxidant enzyme gene expression pathway in response to a variety of

stimuli, including antioxidants, xenobiotics, metals and UV irradiation and protects cells from oxidative stress-induced cell death [26]. It has been hypothesized that Nrf2-ARE (antioxidant response element) activation is a neuroprotective pathway which confers resistance to a variety of oxidative stress-related neurodegenerative insults [27]. Recent reports on the use of compounds that overexpress HO-1 through the activation of this transcription factor in cerebral ischemia are resumed in this section.

Among all the compounds that have been proposed as efficient protective agents against cerebral ischemia are the statins. These compounds act as inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase. They are lipid-lowering agents that reduce cardiovascular morbidity and mortality by lowering cholesterol levels and subsequent atherosclerotic changes in vessels. Additionally, they can cross the blood brain barrier. One of the most effective statins in cerebral ischemia is Simvastatin, which has been shown to reduce infarct size and improve clinical outcome after focal cerebral ischemia in mice. The effect of Simvastatin in HO-1 expression using Neuro 2A and the oxygen glucose deprivation (OGD) model was studied. It was observed that 50  $\mu$ M Simvastatin in pretreated cells subjected to OGD resulted in a time-dependent upregulation of HO-1 transcript and protein. HO-1 mRNA levels were apparent as early as 3 h after treatment, peaked at 6 h (> 100-fold) and significantly reduced by 24 h. HO-1 protein expression after glucose deprivation was more evident in cells pretreated with Simvastatin 50  $\mu$ M for 24 h than in those treated with Simvastatin alone. The role of Nrf2 transcription factor was elucidated after Simvastatin treatment, preceding increased HO-1 mRNA. HO-1 increase was reduced with Nrf2 small interfering RNA. The authors also correlated HO-1 increase with the induction of apoptosis following activated caspase 3 and apoptotic cells by flow cytometry and corroborated these results with the use of HO-1 inhibitors [28].

Other compounds that protect through Nrf2 pathway and HO-1 are Sulphoraphane (SFP) and Plumbagin. SFP is a naturally occurring isothiocyanate abundantly present in vegetables such as broccoli. A reduction in infarct volume as result of temporal focal ischemia with SFP was observed. The *i.p.* injection of 5 mg/kg of SFP 15 min after the onset of ischemia resulted in Nrf2 induced genes. In addition, HO-1 was increased in mRNA and protein levels, and an elevation of HO-1 immunoreactivity in neurons and astrocytes was observed [29]. In order to test if the use of SFP as an activator of the Nrf2 antioxidant pathway can protect immature neurons from oxidative stress-induced death, mouse hippocampal neuronal cultures from embryonic fetuses were subjected to OGD or hemin toxicity. Treatment of immature neurons with SFP immediately after OGD during reoxygenation was effective in protecting immature neurons from delayed cell death. Exposure of immature hippocampal neurons to hemin induced significant cell death, and both pre- and co-treatment with SFP were remarkably effective in blocking cytotoxicity. Moreover, the expression of HO-1 gene was examined by real time RT-PCR. Treatment of immature neurons with SFP resulted in HO-1 mRNA induction. No HO-1 induction was observed when neurons were exposed to OGD alone. SFP treatment of OGD-exposed neurons resulted in induction of HO-1. Unlike the OGD insult, hemin treatment

alone resulted in induction of HO-1, while no additional increase was obtained by co-treating cells with SFP and hemin [30].

The other compound, Naphthoquinone plumbagin (PL), is a naturally occurring pigment in the genus *Plumbago* of the family *Plumbaginaceae* of flowering plants. PL possesses anti-microbial activity, and activates the Nrf2/ARE pathway, thereby resulting in the up-regulation of target genes and increased resistance of neurons to oxidative and metabolic insults in cultured cells, as well as ischemic stroke *in vivo*. Using human neuroblastoma SH-SY5Y cells and cultures of primary cerebral cortical neurons of rats with OGD and mice with MCAO, it was observed that PL activates the Nrf2/ARE pathway by a PI3 kinase-mediated mechanism. Transcript levels of HO-1, among other target genes, such as Thioredoxin reductase 1 and NADPH/ coenzyme Q oxidoreductase 1, were determined by western blot and immunostaining. PL treatment increased the protein levels of HO-1 in a concentration-dependent manner. In *in vivo* experiments, the expression of HO-1 in the cortex and striatum was increased, whereas the pre-treatment with PL decreased infarct volume. In fact, the use of a PI3 kinase inhibitor blocked the ability of PL to up-regulate HO-1 and protected neurons against oxidative stress, as expected [31].

Another natural product, *Ginkgo biloba* extract EGb761, has shown to significantly improve the outcome in mice after cerebral ischemia and reperfusion in terms of neurobehavioral function and infarct size, without affecting physiological parameters. The authors used a prophylactic treatment 7 days before MCAO in mice, as well as a post-treatment at 5 min or 4.5 h after the onset of reperfusion. Both treatments showed a less neurological dysfunction and smaller infarct volumes. The use of HO-1 knockouts prevented the observed effect, supporting a role of HO-1 in neuroprotection. Using primary cortical neuronal cultures, significant induction of HO-1 levels in a dose- and time-dependent manner was observed for EGb761 treatment. The authors also showed that *de novo* HO-1 induction was required for neuroprotection using the protein synthesis inhibitor cycloheximide and the mRNA synthesis inhibitor actinomycin D, both being able to completely block the HO-1 induction by EGb761. Protection against glutamate-induced excitotoxicity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress has also been observed in cells with EGb761 [32].

## Other Compounds

A list of other compounds with different origin and mechanisms of action are resumed below. It includes heme related compounds, iron chelators or heme catabolism by-products (Table 1). All of them have shown to protect *via* HO-1 induction in cerebral ischemia models.

## Hemopexin

Hemopexin (HPX) is a high affinity binding protein that associates with extracellular free heme to form heme-HPX complexes. Comparing HPX<sup>-/-</sup> and wt mice, Li *et al.* [33] observed that HPX is involved in protection against ischemic damage induced by tMCAO since HPX<sup>-/-</sup> mice infarct volumes and neurologic deficits were larger than in wild type mice. By means of oxidative stress induction, using a radical

**Table 1. The Use of Compounds that Protect in Cerebral Ischemia Damage through HO-1 Induction**

Reference	Compound	Model and Ischemia Conditions	Treatment	Effect
Li <i>et al.</i> , 2009 [33]	Heme-Hemopexin Complex	tMCAO 90 min, 96 h R in wt C57BL/6 and HPX <i>-/-</i> rats. Different neuronal lines were also used (embryonic and post-natal cortical neurons, HO-1 <i>-/-</i> embryonic HEK 293).	Heme-HPX administration to cell culture experiments. Heme-HPX (1, 5, 10, or 20 mmol/L) (treatment only to cell culture experiments).	↑ in HPX <i>-/-</i> mice infarct volumes and ↑ in neurologic deficits. ↑ HO-1 mRNA and protein cortical neurons 6 h after the addition of heme-HPX. ↓ cell death in neurons by heme-HPX. HO <i>-/-</i> cells+heme-HPX did not prevent cell death.
Cervera <i>et al.</i> , 2004 [35]	Unfractionated heparin	tMCAO, 1 h I, 3h R. Sprague-Dawley rats	A bolus of 200 U/kg was given, 3 h after the occlusion, followed by a 24-h intraperitoneal perfusion of 70 U/kg/h, which maintained a 24-h steady plasma heparinemia 0.3–0.6 U/ml. Infusion treatment was maintained until sacrifice (1 or 7 d).	46% ↓ infarct volume at 24 h after UH reduction. ↓ infarct volume at 7 d. ↑ interleukin 10 plasma levels, ↓ VCAM-1. WB of HO-1 showed ↑ HO-1, significantly higher in the ipsilateral hemisphere.
Demougeot <i>et al.</i> , 2004 [37]	2,2'-Dipyridyl [2,2'-bipyridine]	Cortical photothrombotic vascular occlusion. Wistar rats. The skull was irradiated for 5 min, beginning 30 s before the dye injection.	Systemic application DP 20 mg/kg <i>i.p.</i> 15 min before and 1 h after ischemia.	50% ↓ in infarct volume by DP treatment. ↓ ischemia-induced glutathione loss, ↑ HIF-1 α expression, ↑ HO-1 expression.
Deguchi <i>et al.</i> , 2008 [38]	Biliverdin	90 Min MCAO in Wistar rats	<i>i.p.</i> BV (100 mg/kg in 2 mL) at the onset of reperfusion	The use of an HO-1 product protects against ischemia damage. ↓ infarct volume, ↓ O <sub>2</sub> production and oxidative injuries.

Symbols: increase (↑), decrease (↓). Abbreviations: BV, Biliverdin; DP, 2,2'-Dipyridyl [2,2'-bipyridine]; HPX, Hemopexin complex; *i.p.*, intraperitoneal; MCAO, middle cerebral artery occlusion; tMCAO, transient MCAO; O<sub>2</sub>, superoxide anion; VCAM, Vascular Cell Adhesion Molecule; WB, western blot.

donor or adding heme in cortical neuron cultures, they observed that heme-HPX neuronal protection occurs through HO-1 induction. HO-1 mRNA and protein levels were induced dose dependently in cortical neurons 6 h after the addition of heme-HPX to the medium. The neuronal cell death induced by heme or the free radical donor was prevented by the addition of heme-HPX in wt but not in HO-1 *-/-* cells, thus suggesting that HO-1 induction by heme-HPX is part of the observed protective mechanism [33].

### Unfractionated Heparin

Unfractionated heparin (UH) has been used in ischemic stroke to improve neurological outcome as it stops thrombus progression, facilitates collateral circulation and prevents deep venous thrombosis or pulmonary embolism [34]. UH was used in MCAO model in order to confirm its neuroprotective effect using equivalent doses to those used in clinical practice. After 1 h of ischemia and 3 h of reperfusion, the authors determined infarct volume, cerebral blood flow, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), interleukine-IL-10 and HO-1 expression. Results from this work showed that neuroprotection is associated with modulation of the inflammatory process and overexpression of HO-1, which was increased as result of UH administration [35].

### 2,2'-dipyridyl (DP)

Iron homeostasis is disrupted after ischemia. Due to the accumulation of high levels of ferritin, the role of free iron in the production of ROS and the inhibition of prolif-

hydroxylation in the regulation of α subunit of HIF-1α (for a review see [36]), iron chelators are of obvious interest as therapeutic agents in this pathology. In permanent focal ischemia induced by cortical phototrombotic vascular occlusion, the effect of liposoluble iron chelator DP was examined. DP (20 mg/kg) was applied systemically (10 mg/kg, *i.p.*) 15 min before and 1h after brain ischemia induction. DP treatment showed a significant decrease in infarct size of almost 50%. No enlargement of the infarct volume after prolongation of ischemia from 24 h to 3 days was observed, suggesting a potential inhibition of the deleterious mechanisms involved in the transformation of penumbra into infarct area. DP decreased HIF-1 content in all examined cortical regions (ipsilateral and contralateral), but selectively increased HO-1 content at the ischemic core, showing that HO-1 expression is largely dependent on the severity of oxidative stress [37].

### Biliverdin (BV)

It has been proposed that neuroprotection of HO-1 is the result of byproducts of heme catalysis. BV, one of these products, has shown to mediate the protective effects of HO-1 while scavenging ROS. Reduced infarct volume of tMCAO rats administrated with 100 mg/kg BV at the onset of reperfusion was observed. This neuroprotection by BV was associated with less superoxide production and decreased oxidative injury of brain cells induced by tMCAO in rats. Theoretically, HO-1 inducers may exhibit more potent protective effects than BV alone as the contribution of each



byproduct may account for its protective function. Furthermore, HO-1 can eliminate prooxidant-free heme and prevents catalytic iron release leading to hydroxyl radicals, thus opening a therapeutic possibility for the use of HO-1 inducers or byproducts through HO systems [38].

### CONCLUDING REMARKS

The inducible and highly regulated cytoprotective enzyme HO-1 acts as an adaptive cellular response to different stress conditions. HO-1 responds to a lot of stressors, many of which involve a decrease in oxygen concentration and an increase in oxidative stress. Cellular damage by cerebral ischemia has shown to induce the HO-1 protective pathway and an upregulation is observed in regions with a greater susceptibility. In *in vitro* and *in vivo* models, the induction of HO-1 by IP, or as a result of ischemic damage, shows that HO-1 responds to ischemic, anoxic and pro-oxidant states with protective results. HO-1 is also a highly regulated enzyme, and transcription factors and protein kinase pathways are involved in its up-regulation. In fact, the transcription factor Nrf2, a regulator of the antioxidant enzyme gene expression pathway, has been implicated in the neuroprotective results observed by Simvastatin, Plumbagin, SFP and *Ginkgo biloba*, by controlling the induction of HO-1. In cerebral ischemia models, iron chelators, heme related compounds or heme catabolism by-products have shown to exert protection by HO-1 induction. The use of natural compounds such as curcumin, Sasim and PGE1 to reduce infarct area or ischemic damage have shown to protect through HO-1 up-regulation. Altogether, this evidence supports the role of HO-1 pathway as a protective response in cerebral ischemic damage. The study and characterization of its role in this disorder would clarify the use of HO-1 as a neuroprotective target in a near future.

### ACKNOWLEDGMENTS

The Laboratorio of Patología Vascular Cerebral is partially supported by Grant 90720 (M.E.C.-C.) CONACyT, México. E.A.-Z. was supported by a fellowship from Grant 90720 CONACyT. B.M.-V. and E.A.-Z are beneficiaries from PROBEI program (Mexico).

### REFERENCES

- [1] Doré, S. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**, *32*, 1276-1282.
- [2] Idriss, N.K.; Blann, A.D.; Lip, G.Y. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2008**, *52*, 971-978.
- [3] Stocker, R.; Perella, M.A. Heme oxygenase-1. A novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation*, **2006**, *114*, 2178-2189.
- [4] Ryter, S.W.; Alam, J.; Choi, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.*, **2006**, *86*, 583-650.
- [5] Converso, D.P.; Taillé, C.; Carreras, M.C.; Jaitovich, A.; Poderoso, J.J.; Boczkowski, J. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J.*, **2006**, *20*, 1236-1238.
- [6] Tsuchihashi, S.; Fondevila, C.; Kupiec-Weglinski, J.W. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann. Transplant.*, **2004**, *9*, 84-87.
- [7] Alam, J.; Cook, J.L. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2007**, *36*, 166-174.
- [8] Ferrándiz, M.L.; Devesa, I. Inducers of heme oxygenase-1. *Curr. Pharm. Des.*, **2008**, *14*, 473-486.
- [9] Harder, Y.; Amon, M.; Schramm, R.; Rücker, M.; Scheuer, C.; Pittet, B.; Erni, D.; Menger, M.D. Ischemia-induced up-regulation of heme oxygenase-1 protects from apoptotic cell death and tissue necrosis. *J. Surg. Res.*, **2008**, *150*, 293-303.
- [10] McCarter, S.D.; Akyea, T.G.; Lu, X.; Bihari, A.; Scott, J.R.; Badhwar, A.; Dungey, A.A.; Harris, K.A.; Feng, Q.; Potter, R.F. Endogenous heme oxygenase induction is a critical mechanism attenuating apoptosis and restoring microvascular perfusion following limb ischemia/reperfusion. *Surgery*, **2004**, *136*, 67-75.
- [11] Soares, M.P.; Bach, F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol. Med.*, **2009**, *15*, 50-58.
- [12] Koistinaho, J.; Miettinen, S.; Keinänen, R.; Vartiainen, N.; Roivainen, R.; Laitinen, J.T. Long-term induction of heme oxygenase-1 (HSP-32) in astrocytes and microglia following transient focal brain ischaemia in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **1996**, *8*, 2265-2272.
- [13] Scapagnini, G.; D'Agata, V.; Calabrese, V.; Pascale, A.; Colombrita, C.; Alkon, D.; Cavallaro, S. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.*, **2002**, *954*, 51-59.
- [14] Panahian, N.; Yoshiura, M.; Maines, M.D. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J. Neurochem.*, **1999**, *72*, 1187-1203.
- [15] Paschen, W.; Uto, A.; Djuricic, B.; Schmitt, J. Hemeoxygenase expression after reversible ischemia of rat brain. *Neurosci. Lett.*, **1994**, *180*, 5-8.
- [16] Takeda, A.; Onodera, H.; Sugimoto, A.; Itoyama, Y.; Kogure, K.; Shibahara, S. Increased expression of heme oxygenase mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res.*, **1994**, *666*, 120-124.
- [17] Sutherland, B.A.; Rahman, R.M.; Clarkson, A.N.; Shaw, O.M.; Nair, S.M.; Appleton, I. Cerebral heme oxygenase 1 and 2 spatial distribution is modulated following injury from hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci. Res.*, **2009**, *65*, 326-334.
- [18] Bergeron, M.; Ferriero, D.M.; Vreman, H.J.; Stevenson, D.K.; Sharp, F.R. Hypoxia ischemia, but not hypoxia alone, induces the expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in newborn rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1997**, *17*, 647-658.
- [19] Zeynalov, E.; Shah, Z.A.; Li, R.C.; Doré, S. Heme oxygenase 1 is associated with ischemic preconditioning-induced protection against brain ischemia. *Neurobiol. Dis.*, **2009**, *35*, 264-269.
- [20] Moreira, T.J.; Cebere, A.; Cebers, G.; Östenson, C.G.; Eféndic, S.; Liljequist, S. Reduced HO-1 protein expression is associated with more severe neurodegeneration after transient ischemia induced by cortical compression in diabetic Goto-Kakizaki rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2007**, *27*, 1710-1723.
- [21] Yang, C.; Zhang, X.; Fan, H.; Liu, Y. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res.*, **2009**, *28*, 133-141.
- [22] Kim, Y.; So, H.S.; Moon, B.S.; Youn, M.J.; Kim, H.J.; Shin, Y.L.; Moon, S.K.; Song, M.S.; Choi, K.Y.; Song, J.; Park, R. Sasim attenuates LPS-induced TNF- $\alpha$  production through the induction of HO-1 in THP-1 differentiated macrophage-like cells. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, *119*, 122-128.
- [23] Han, R.; Gao, B.; Sheng, R.; Zhang, L.S.; Zhang, H.L.; Gu, Z.L.; Qin, Z.H. Synergistic effects of prostaglandin E1 and lithium in a rat model of cerebral ischemia. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2008**, *29*, 1141-1149.
- [24] Wang, Y.; Chiang, Y.H.; Su, T.P.; Hayashi, T.; Morales, M.; Hoffer, B.J.; Lin, S.Z. Vitamin D(3) attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. *Neuropharmacology*, **2000**, *39*, 873-880.
- [25] Oermann, E.; Bidmon, H.J.; Witte, O.W.; Zilles, K. Effects of 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D3 on the expression of HO-1 and GFAP in glial cells of the photothrombotically lesioned cerebral cortex. *J. Chem. Neuroanat.*, **2004**, *28*, 225-238.
- [26] Niture, S.K.; Kaspar, J.W.; Shen, J.; Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010**, *244*, 37-42.
- [27] Johnson, J.A.; Johnson, D.A.; Kraft, A.D.; Calkins, M.J.; Jakel, R.J.; Vargas, M.R.; Chen, P.C. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1147*, 61-69.

- [28] Hsieh, C.H.; Rau, C.S. Simvastatin-induced heme oxygenase-1 increases apoptosis of Neuro 2A cells in response to glucose deprivation. *Toxicol. Sci.*, **2008**, *101*, 112-121.
- [29] Zhao, J.; Kobori, N.; Aronowski, J.; Dash, P.K. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci. Lett.*, **2006**, *393*, 108-112.
- [30] Soane, L.; Li Dai, W.; Fiskum, G.; Bambrick, L.L. Sulforaphane protects immature hippocampal neurons against death caused by exposure to hemin or to oxygen and glucose deprivation. *J. Neurosci Res.*, **2010**, *88*, 1355-1363.
- [31] Son, T.G.; Camandola, S.; Arumugam, T.V.; Cutler, R.G.; Telljohann, R.S.; Mughal, M.R.; Moore, T.A.; Luo, W.; Yu, Q.S.; Johnson, D.A.; Johnson, J.A.; Greig, N.H.; Mattson, M.P. Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, **2010**, *112*, 1316-1326.
- [32] Saleem, S.; Zhuang, H.; Biswal, S.; Christen, Y.; Doré, S. Ginkgo Biloba extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury. *Stroke*, **2008**, *39*, 3389-3396.
- [33] Li, R.; Saleem, S.; Zhen, G.; Cao, W.; Zhuang, H.; Lee, J.; Smith, A.; Altruda, F.; Tolosano, E.; Doré, S. Heme-hemopexin complex attenuates neuronal cell death and stroke damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2009**, *29*, 953-964.
- [34] Sherman, D.G.; Dyken, M.L.; Gent, M.; Harrison, J.G.; Hart, R.G.; Mohr, J.P. Antithrombotic therapy for cerebrovascular disorders: an update. *Chest*, **1995**, *108*, 444S-456S.
- [35] Cervera, A.; Justicia, C.; Reverter, J.C.; Planas, A.M.; Chamorro, A. Steady plasma concentration of unfractionated heparin reduces infarct volume and prevents inflammatory damage after transient focal ischemia in the rat. *J. Neurosci Res.*, **2004**, *77*, 565-572.
- [36] Aguilera, P.; Vázquez-Contreras, E.; Gómez-Martínez, C.D.; Cháñez-Cárdenas, M.E. Hypoxia inducible factor-1 as a therapeutic target in cerebral ischemia. *Curr. Signal Transduct. Ther.*, **2009**, *4*, 162-173.
- [37] Demougeot, C.; Van Hoecke, M.; Bertrand, N.; Prigent-Tessier, A.; Mossiat, C.; Beley, A.; Marie, C. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *311*, 1080-1087.
- [38] Deguchi, K.; Hayashi, T.; Nagotani, S.; Sehara, Y.; Zhang, H.; Tsuchiya, A.; Ohta, Y.; Tomiyama, K.; Morimoto, N.; Miyazaki, M.; Huh, N.H.; Nakao, A.; Kamiya, T.; Abe, K. Reduction of cerebral infarction in rats by biliverdin associated with amelioration of oxidative stress. *Brain Res.*, **2008**, *1188*, 1-8.

---

Received: May 23, 2010

Revised: June 28, 2010

Accepted: June 28, 2010