



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA ASPIRINA EN LA POTENCIACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HSF EN CELULAS MONONUCLEARES DE
SANGRE PERIFERICA DE RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALVARO ADRIAN SANDOVAL MONTIEL

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
IIB, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA DEL CARMEN GÓMEZ EICHELMANN
IIB, UNAM
DR ENRIQUE ORTEGA SOTO
IIB, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA ASPIRINA EN LA POTENCIACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HSF EN CELULAS MONONUCLEARES DE
SANGRE PERIFERICA DE RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALVARO ADRIAN SANDOVAL MONTIEL

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
IIB, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA DEL CARMEN GÓMEZ EICHELMANN
IIB, UNAM
DR ENRIQUE ORTEGA SOTO
IIB, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **SANDOVAL MONTIEL ALVARO ADRIAN** con número de cuenta **92577860** con la tesis titulada **"PAPEL DE LA ASPIRINA EN LA POTENCIACION DE LA ACTIVACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION HSF EN CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DE RATA"**, realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA:**

Presidente: DRA. MARIA DEL CARMEN GOMEZ EICHELMANN
Vocal: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
Secretario: DRA. MARIA ELENA IBARRA RUBIO
Suplente: DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA
Suplente: DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de Julio de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo durante el transcurso del Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por la beca (167149) otorgada para el financiamiento de mis estudios.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM por el complemento de beca otorgado durante el transcurso del Doctorado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca otorgada para la escritura de esta Tesis de Doctorado.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por guiarme en todo este proceso, por compartir su conocimiento, experiencia y confianza.

A la Dra. Maria del Carmen Gómez Eichelmann por enriquecer el trabajo con sus valiosos comentarios.

Dr Enrique Ortega Soto por enriquecer el trabajo con sus valiosos comentarios.

Agradecimientos personales

A mis compañeros de la Unidad de Bioquímica del INCM y la Nutrición Salvador Zubirán y del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Cesar, Ambar, Delina, Alma, Adriana, Mario Augusto, etc. A los Doctores-Investigadores que me han aportado mucho con sus comentarios y aportaciones Dr. Sigifredo, Dra Nadia, Dr. Huberman, Dra. Maria de Jesús, al personal administrativo, técnicos y afanadores.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos, por todo el apoyo en la realización de los experimentos.

A mi familia, los cuales han sido pilar en mi desarrollo tanto profesional como personal, a mi Madre Ana María, mi Padre Alvaro, mis hermanos Ricardo, Roxana y Guillermo, mis sobrinos los cuales broma en broma me han dado muchos momentos gratos, Erick, Bryan, Ricardo, Alexis, Jennifer.

A mis compañeros en este viaje temporal de docencia Miriam, Centeno, Hilda, Lety, Rubén, Andrea, Martha, Alma, Karla, Jenny, Víctor, Mario, Jazmin, etc, Lic Maria Sonia por todo su apoyo.

A la Ingeniera Química Miriam Hernández por todo su apoyo, amistad y confianza en este tiempo.

A mi jurado de tesis, Dra. Maria del Carmen Gómez Eichelmann, Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval, Dra. Maria Elena Ibarra Rubio, Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia, Dr. Enrique Piña Garza, por su tiempo en

la revisión a esta tesis, la cual fue enriquecida con sus comentarios y observaciones.

A todos aquellos que he conocido y que me han ayudado de manera directa o indirecta a la realización de este trabajo, les agradezco sus porras y el ánimo que me dieron.

Al MVZ Enrique Moreno, por su inapreciable ayuda en el manejo de los animales, gran parte de mi formación fue gracias a tu asesoría.

Dedicatoria

A Susana Frias y Jessica, gracias por su compañía, por haber formado parte de mi vida, han sido mi inspiración.

“El verdadero amante de la vida es el científico, pues es el único que se ocupa de descubrir sus misterios.”

Indice

Resumen	2
ABSTRACT	3
Introducción.....	4
Familias de HSPs.....	5
Proteínas de choque térmico pequeñas (sHSP) de 8 a 34 kDa.	5
HSP40.....	7
HSP60.....	8
HSP70.....	9
HSP90.....	11
HSP100.....	12
Inducción de la transcripción de la proteína DnaK y DnaJ en <i>E. coli</i> durante el choque térmico	13
Respuesta al choque térmico en levaduras	14
Regulación de la respuesta al choque térmico en eucariontes.....	16
HSF.....	18
Termotolerancia.....	20
Aspirina	22
Historia de la aspirina.....	23
Mecanismo de acción	24
Efectos antiinflamatorios.....	25
Efectos analgésicos.....	26
Efectos antipiréticos	27
Efecto antiagregante plaquetario	28
Antecedentes.....	28
Planteamiento del problema	30
Hipótesis	31
Objetivo	31
Material y Métodos.....	32
Resultados.....	36
Discusión	48
Experimentos <i>in vivo</i>	48
Experimentos <i>in vitro</i>	51
Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	52
Anexos.....	65

Resumen

El factor de transcripción HSF-1 regula la expresión de la proteína de choque térmico 72 (HSP-72). En líneas celulares tumorales, los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos, como el ácido acetil salicílico (ASA), a una concentración supra-farmacológica tal como 60 mM activa a HSF-1 conduciendo a la expresión de HSP-72 y a un estado general de citoprotección. En este trabajo se reporta que en un modelo *in vivo*, la administración de ASA en ratas induce la traslocación de HSF-1 al núcleo en células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs), sin aumento en la transcripción del RNAm para HSP-72 comparadas contra PBMNCs de ratas no administradas con ASA. Sin embargo HSP-72 se expresó rápidamente en estas células cuando se sometieron a un choque térmico *in vitro* cuando se comparan con PBMNCs de ratas control. Este efecto de preacondicionamiento se observa después de 1 h de administración con ASA y desaparece a las 5 h. Al cultivar células PBMNCs de ratas sin tratamiento, e incubarlas con ASA (10 μ M), ésta no indujo la translocación de HSF-1 ni de la expresión de HSP-72. En cambio PBMNCs de ratas sin tratamiento, al co-incubarlas con H₂O₂ (5 μ M) + ASA (10 μ M) si promueve la translocación nuclear de HSF-1, lo que condujo a un rápido incremento en la proteína HSP-72 cuando se someten estas células a un choque térmico, en comparación con PBMNCs de ratas sin co-incubación con ASA+H₂O₂. El hecho de que el H₂O₂ fuera necesario para mimetizar el efecto pre-acondicionador observado por ASA sobre HSF-1 *in vitro* sugiere que algún tipo de estrés oxidante podría estar involucrado en la inducción por la administración de ASA *in vivo*.

ABSTRACT

HSF-1 is required for expression the heat-shock protein 72 (HSP-72). In tumor cell lines non-steroidal anti-inflammatory drugs such as acetyl salicylic acid (ASA) at supra-pharmacological concentration (60 mM) activates HSF-1 leading to HSP-72 expression and a general cytoprotective state. We report that in an *in vivo* rat model ASA challenge lead to HSF-1 presence in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) without expression of HSP-72 mRNA. However, HSP-72 was rapidly expressed in these cells when they were subjected to an *in vitro* heat shock, compared PBMNCs from control rats. This priming effect began to be observed after 1 h of ASA challenge and began to disappear by 5 h. *In vitro*, ASA did not induce HSF-1 translocation nor expression of HSP-72 in PBMNCs from untreated animals. Co-stimulation with H₂O₂ (5 μM) + ASA (10 μM) promoted HSF-1 nuclear translocation and expression of HSP-72 mRNA that lead to a fast increase in protein when subjected to heat shock, compared to control cells. The fact that H₂O₂ was necessary to mimic the *in vivo* priming effect of ASA on HFS-1 suggests that *in vivo* oxidative stress could be induced by ASA.

Introducción

Las proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés), también son llamadas chaperonas, son proteínas citoprotectoras que se encuentran presentes en todos los seres vivos y pueden inducir termotolerancia. Las HSP tienen funciones esenciales en el plegamiento, transporte, translocación, degradación y ensamblaje de proteínas, transducción de señales y en la regulación de la expresión génica, por su función asociada a la estabilización de estructuras proteicas (Hightower 1991; Welch 1992; Minowada and Welch 1995). De hecho, muchos investigadores han sugerido que las chaperonas pueden trabajar en grupo para facilitar el proceso de plegamiento durante la maduración proteica (Morimoto 1993). En algunos tipos de estrés, como el estrés térmico, muchas proteínas sufren cambios parciales en su estructura secundaria, terciaria e inclusive cuaternaria. Las HSPs reconocen estos cambios estructurales, se unen a las proteínas dañadas, las estabilizan y repliegan, así previenen o disuelven agregaciones irreversibles (Smith, Whitesell et al. 1998). Algunas de estas proteínas son constitutivas, mientras que otras son inducibles en respuesta a diversas formas de estrés ambiental y fisiológico, como la elevación de temperatura (choque térmico) o la exposición a metales pesados, entre otros factores. En particular las HSPs asociadas a la respuesta al choque térmico representan un subgrupo de chaperonas altamente conservado desde bacterias hasta eucariontes superiores. (Calabrese, Renis et al. 1996; Morimoto, Kroeger et al. 1996; Wong 1999). Estas proteínas están organizadas en familias de acuerdo a

su masa molecular relativa: las pequeñas entre 8-34 kDa, 40, 60, 70, 90 y 100 kDa (Mager and De Kruijff 1995; Leppa and Sistonen 1997).

Familias de HSPs

Proteínas de choque térmico pequeñas (sHSP) de 8 a 34 kDa.

Las HSPs pequeñas contienen dominios α -cristalinos, denominados así por haber sido identificadas como proteínas, solubles en agua, presentes en el cristalino ocular. La función de estas HSPs es independiente de ATP (Jakob, Gaestel et al. 1993; Buchner 1996). Una característica importante es su oligomerización en grandes agregados intracelulares. La proteína $\alpha\beta$ - cristalina se expresa constitutivamente y además puede ser inducida por estrés calórico, oxidante, etc. (Klemenz, Frohli et al. 1991). Esta proteína es frecuentemente asociada con elementos del citoesqueleto donde favorece su estabilización. La ubiquitina, probablemente la más pequeña de las HSP (8.5 kDa), aumenta su expresión ante una elevación de la temperatura. Esta proteína desempeña un papel importante en la estructura de la cromatina, mientras que en la mono-ubiquitinación altera el funcionamiento o la distribución sub-celular de las proteínas ubiquitinadas, la poli-ubiquitinación forma parte del mecanismo que controla la degradación proteica mediada por el proteasoma (Vissers, Nicassio et al. 2008; Cuervo, Wong et al. 2010).

La HSP-10 sirve como una co-chaperona para la HSP-60 en el plegamiento y ensamblaje de proteínas mitocondriales. Por otro lado, la HSP-27 está presente

en el citosol en condiciones fisiológicas, y se trasloca al núcleo en condiciones de estrés. Esta proteína se expresa a niveles relativamente bajos en condiciones normales, pero exhibe una gran inducción bajo diversos tipos de estrés, tales como: oxidante, calórico, etc. HSP-27 es fosforilada por la cinasa MAP p38 y por la MAPK/AP 2/3-cinasa en respuesta al estrés. Esto estabiliza los microfilamentos de las células (Huot, Houle et al. 1996). La HSP-32 (hemo-oxigenasa-1), es un potente antioxidante y se ha determinado que desempeña un papel crítico en el proceso antiinflamatorio asociado al ejercicio físico (Essig, Borger et al. 1997).

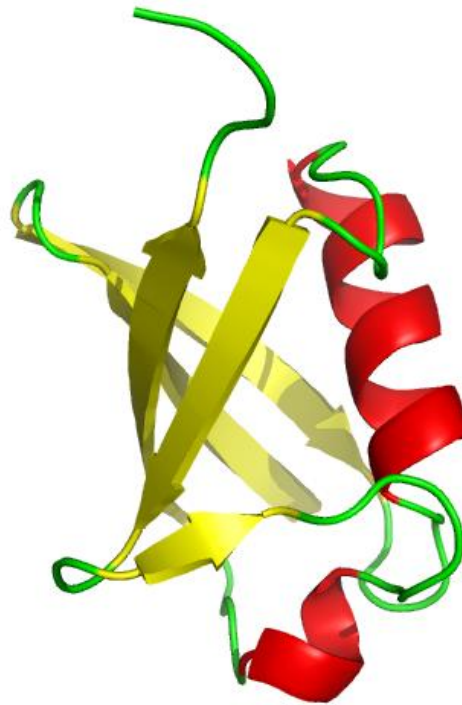


Figura 1 Estructura de ubiquitina

HSP40

Se han identificado 22 diferentes tipos de HSP40, que se han subdividido en 3 isoformas de HSP40 (HSP 40 tipo I, II y III). Las tres isoformas comparten la presencia de un dominio "J", presente en el extremo amino en los tipos I y II mientras que en el tipo III se encuentra en el interior de la secuencia proteica. Los tipos I y II presentan además un dominio de unión a péptido que es análogo al de las HSP70s, que se subdivide en una estructura que forma un surco y un subdominio de unión a lípidos. El tipo I se distingue por poseer tres módulos de un dominio de dedos de zinc en la porción central de la proteína.

La HSP-40 es una co-chaperona de la familia de las HSP-70, la unión entre ambas esta mediada por el dominio "J" de HSP40, que se une al dominio de ATPasa de HSP-70. Desempeña sus funciones llevando sustratos a las HSP-70, para el ensamblaje y traslocación de proteínas a la membrana y degradación de proteínas modificadas (Ma, Li et al. 2009).

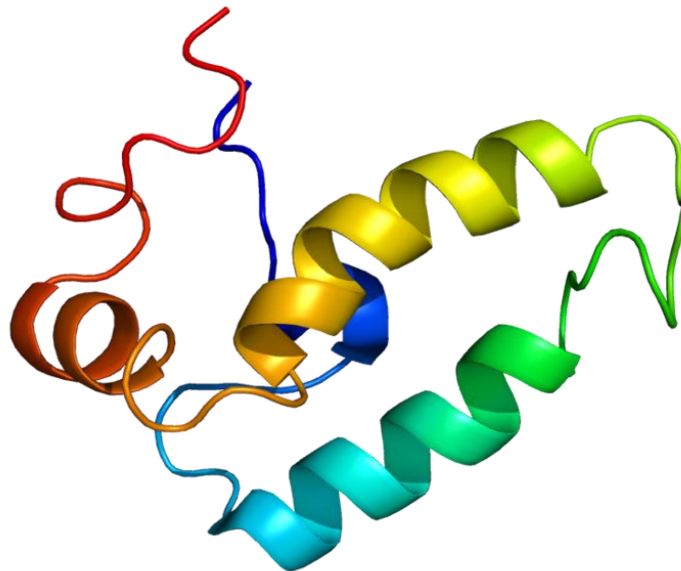


Figura 2 Estructura de HSP40

HSP60

Las proteínas de la familia HSP60 (también llamadas chaperoninas) son predominantemente proteínas mitocondriales (Minowada and Welch 1995; Buchner 1996; Bukau and Horwich 1998), pero también pueden encontrarse en gránulos de zimógenos pancreáticos (Cechetto, Soltys et al. 2000). Las HSP60 están asociadas con ciertas enzimas pancreáticas de la ruta de secreción constitutiva, como la amilasa, la lipasa y el quimotripsinógeno, lo que sugiere un papel importante en la secreción de esas proteínas (Arias, Velez-Granell et al. 1994; Velez-Granell, Arias et al. 1994). La familia de las HSP60 está involucrada en el correcto plegamiento y ensamblaje de proteínas pancreáticas secretoras. Más aún, pueden prevenir la agregación y auto activación prematura de las enzimas. Su estructura está conformada por 2 anillos de siete subunidades, y cada anillo rodea una cavidad central donde se lleva a cabo el plegamiento de proteínas y es un proceso dependiente de ATP (Minowada and Welch 1995).

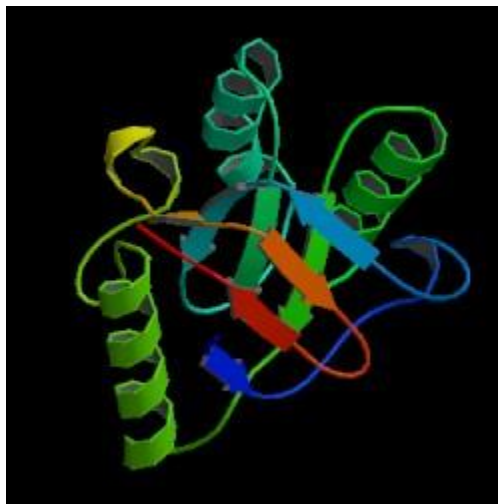


Figura 3 Estructura de HSP60

HSP70

Las HSP70 son la familia más extensamente estudiada, se han identificado ocho miembros de la familia de proteínas Hsp70 se distinguen en base de su composición de aminoácido, tasa de expresión, localización subcelular y su capacidad de respuesta al estrés. Entre ellos, Hsp70 (Hsp70-1a; Hsp70-1b) y Hsp70-6 (Hsp70-B) son proteínas inducibles por estrés, mientras que Hsp70-1t, Hsp70-2, 5-Hsp70 (Bip, GRP78), Hsp70-8 (Hsc70) y Hsp70-9 (Grp75) son proteínas chaperonas que se expresan constitutivamente en tejido de manera específica. (Morimoto 1993; Mosser, Caron et al. 1997; Bukau and Horwich 1998; Yenari, Giffard et al. 1999). Todas constan de dos dominios distintivos: un dominio ATPasa altamente conservado en la región N-terminal y un dominio más divergente hacia la región C-terminal, el cuál une pequeños péptidos hidrofóbicos de los sustratos modificados (Flynn, Pohl et al. 1991). Bajo condiciones normales de crecimiento las Hsp70s funcionan como chaperonas moleculares ayudando al plegamiento de péptidos recién formados ayudando a su maduración en proteínas. Bajo estrés las proteínas Hsp70 deben afrontar el aumento en la concentración de proteínas desnaturalizadas, y evitar agregados tóxicos que pongan en riesgo la supervivencia celular. La mayoría de los estudios publicados sobre estas proteínas se basan principalmente con los dos miembros principales de la familia Hsp70, la chaperona molecular inducible Hsp72 y proteína constitutiva Hsp73. Las proteínas de 75 y 78 kDa no son inducidas específicamente por choque térmico, pero si por falta de glucosa, por consiguiente, a ellas se les llama proteínas reguladas por glucosa (GRPs por sus siglas en inglés). La GRP75 es una proteína mitocondrial y

está involucrada en la traslocación de precursores de las proteínas a través de las membranas mitocondriales y en su subsiguiente estabilización y plegamiento dentro de las mitocondrias. La GRP78 también se le denomina como inmunoglobulina de unión de cadena pesada (BiP por sus siglas en inglés), la cual se expresa constitutivamente en el retículo endoplásmico y desempeña papeles importantes como el ensamblaje de proteínas secretoras, en la supervivencia proteica.

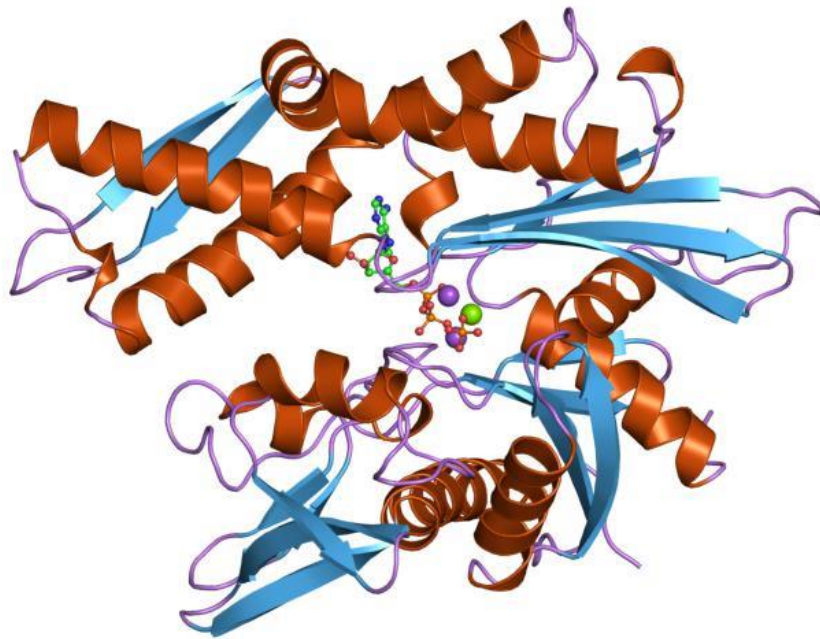


Figura 4 Estructura de HSP73

HSP90

La familia HSP90 consta de tres proteínas: HSP90 α , HSP90 β y GRP94. Las proteínas HSP90 son hidrofóbicas y se han identificado en el citoplasma, el núcleo y el retículo endoplásmico (Sabbah, Radanyi et al. 1996). De hecho HSP90 α , y HSP90 β están entre las proteínas más abundantes en células eucariontes constituyendo entre el 1-2% del total de proteínas citoplásmicas y bajo condiciones fisiológicas, su expresión incrementa en respuesta al estrés. Las HSP90 tienen un papel importante en la función del receptor de estrógenos (Sanchez 2012). En ausencia de la hormona, las HSP90 se unen a los receptores de esteroides, proteínas cinasa y filamentos de actina en asociación con HP56 y HSP70, manteniendo al receptor en una forma inactiva (Stein, Ha et al. 2001).

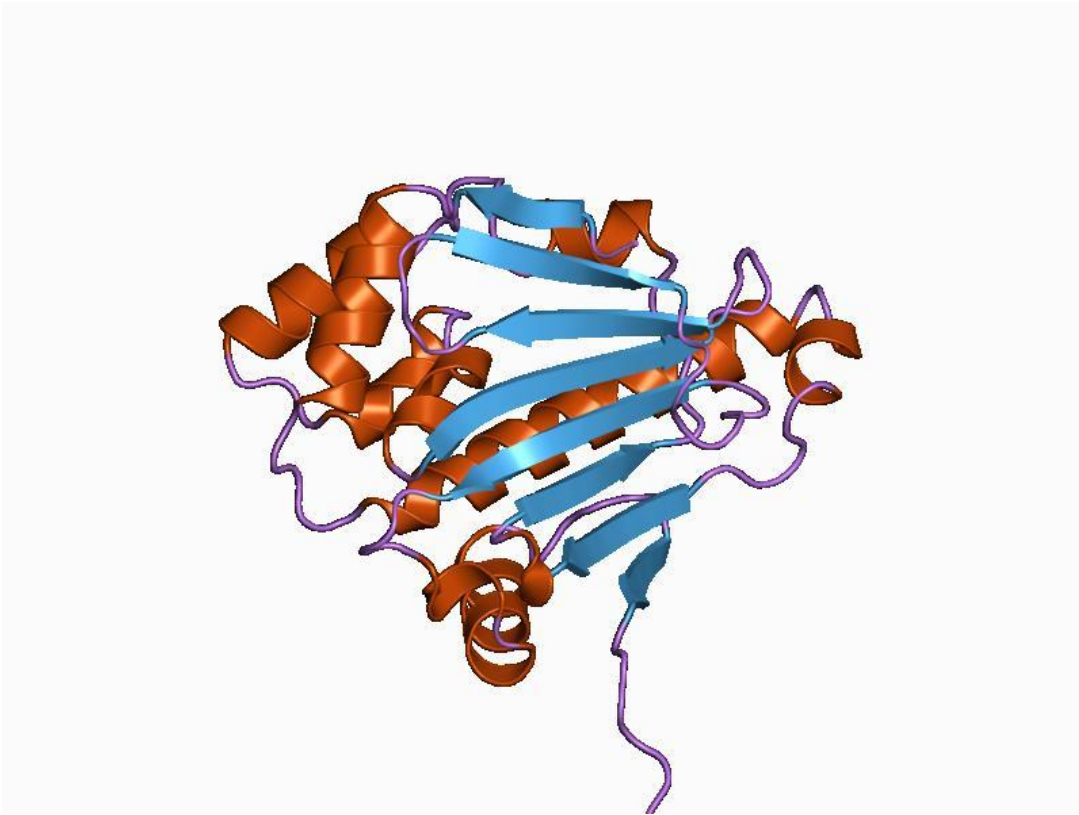


Figura 5 Estructura de HSP90

HSP100

Las HSP100 se localizan en el citoplasma y en el núcleo y están involucradas en disociar agregados y facilitar la proteólisis. Estas proteínas actúan en asociación con HSP73 y Hdj1 como co-chaperona en el plegamiento de proteínas (Mosser, Ho et al. 2004).

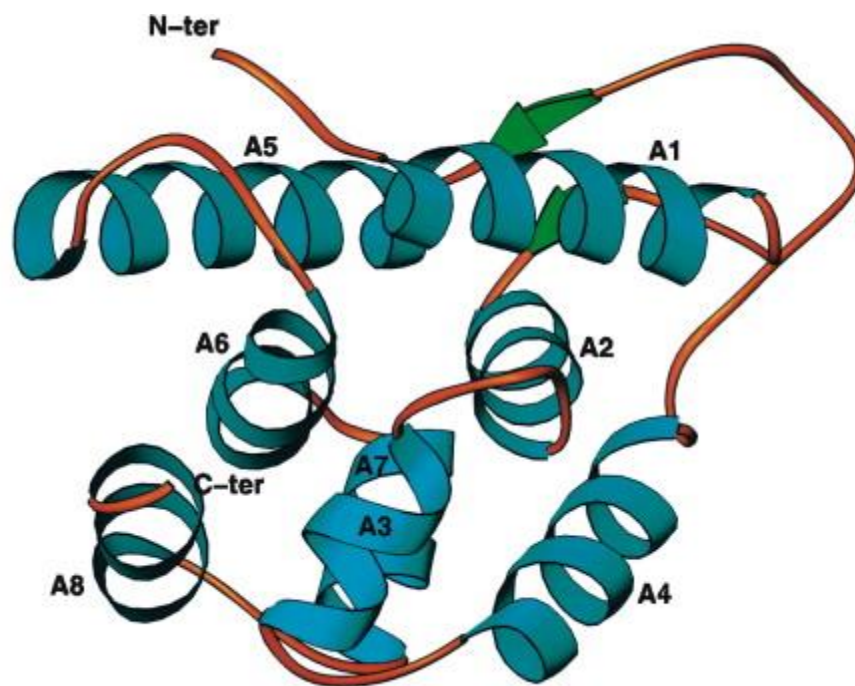


Figura 6 Estructura de HSP100

Inducción de la transcripción de la proteína DnaK y DnaJ en *E. coli* durante el choque térmico

Entre los organismos procariontes, los mecanismos que llevan a cabo la inducción de la síntesis de HSPs han sido ampliamente estudiados en *E. coli*. El Regulón de choque térmico en *E. coli*, consiste de más de 20 genes. Los promotores de estos genes de choque térmico no son reconocidos por la holoenzima RNAP que lleva la subunidad σ^{70} la cuál realiza la mayoría de los procesos de transcripción de la célula a temperatura ambiente, para su crecimiento normal, pero la RNAP si contiene una subunidad sigma específica del promotor de choque térmico, σ^{32} , la cual es el producto de *rpoH*. Este factor fue aislado por primera vez por Grossman (Grossman, Erickson et al. 1984), como un factor σ de 32 kDa que específicamente reconoce los promotores inducibles por calor, localizados corriente arriba en los genes de choque térmico. En *E. coli* los principales genes que tienen promotores para sigma 32 son *groES*, *groEL*, *dnaK* y *dnaJ* (Mager and De Kruijff 1995). El modelo de titulación de DnaK propone que la poza libre de DnaK (así como su homólogo eucarionte HSP73), sirve como un termómetro celular que monitorea los cambios en las concentraciones celulares de proteínas desdobladas o desnaturalizadas y regula la expresión de todas las HSPs en procariontes y eucariontes. En este modelo, la respuesta al choque térmico es inducida, después de que DnaK es secuestrado para unirse a proteínas parcial o completamente desnaturalizadas que se acumularon después del estrés. El secuestro de DnaK puede prevenir esto al interactuar con σ^{32} , que a su vez

permite la activación de la transcripción de los genes de choque térmico. En este modelo, la unión de DnaK a proteínas desnaturalizadas media la reparación o degradación dependientes de DnaK. Esto libera DnaK para interactuar con σ^{32} y para disociarlo de RNAP, haciendo accesible σ^{32} al sistema de proteasas celulares y por lo tanto, disminuyendo la respuesta de choque térmico. Así, la respuesta de choque térmico es auto-limitada, porque el exceso de producción de DnaK, junto con la reparación del daño a las proteínas por la DnaK, restablece la represión. El efecto contrario, es decir, una reducción selectiva de la síntesis de DnaK, se ve cuando la temperatura es disminuida (Craig and Gross 1991).

Respuesta al choque térmico en levaduras

La respuesta a estrés por calor en levadura es una de las mejor estudiadas. Un incremento de 10 a 15° C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento, induce la síntesis de HSPs. La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de las proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Algunas de estas proteínas se encuentran también presentes a temperaturas óptimas, estudios genéticos indican que son proteínas indispensables para mantener el plegamiento correcto de otras proteínas, ensamblar y desensamblar proteínas en estados oligoméricos. La transcripción de genes inducibles por calor depende de dos elementos regulatorios: el STRE Y el

HSE (por sus siglas en inglés Heat Shock Element). Este último elemento consta de por lo menos 3 copias de la secuencia nGAAn (donde n puede ser cualquier nucleótido) arreglados en orientaciones alternadas. Cambios de secuencia y/o distancia entre los elementos son tolerados *in vivo*; pero la afinidad por el factor de transcripción puede verse afectada y por lo tanto disminuir la transcripción de estos promotores mutantes. El factor transcripcional que se une a los HSEs y activa a los genes que están bajo su control se ha denominado HSF (Heat Shock Factor por sus siglas en inglés) y está codificado por un gen único y esencial en la levadura *S. cerevisiae*. Un factor similar se ha encontrado tanto en *Drosophila*, en humano y en otros organismos. Los diferentes dominios de HSF han sido caracterizados en varias especies (Rallu, Loones et al. 1997). Todos ellos comparten 2 motivos: uno de unión a DNA y otro de trimerización que consiste de una α -hélice superenrollada. En eucariontes superiores, la unión a DNA depende de la trimerización de monómeros de HSF al darse el choque térmico. Sin embargo, en *S. cerevisiae* HSF se encuentra trimerizado y unido al DNA aún en ausencia de choque térmico. El hecho de que haya unión al HSE sin inducción de la transcripción, indica que se requiere de un segundo factor para activar HSF. Se ha propuesto que este mecanismo está dado por fosforilación, ya que HSF se fosforila en respuesta a estrés oxidativo o térmico. Sin embargo este mecanismo parece estar relacionado a la desactivación del factor, lo cual permite una respuesta transitoria. El mecanismo por el cual se libera de este control negativo no está claro, aunque se han sugerido varios modelos. Se ha propuesto que la activación podría darse por cambios conformacionales causados por el mismo

incremento de temperatura. Otras observaciones sugieren que HSP73 participa en la regulación negativa de HSF de una manera similar a la descrita por la vía de cAMP-PKA (Boy-Marcotte, Lagniel et al. 1999). En este modelo, HSP73 haría el papel de “termómetro” al regular la actividad de HSF y la expresión de otras HSPs. Se propone que HSP73 interacciona con HSF y lo mantiene inactivo. Al darse el choque térmico, el aumento de los sustratos de HSP73 (proteínas mal plegadas) “secuestraría” HSP73 liberando HSF lo que conduciría a su activación. Al producirse más HSP73, ésta podría interactuar de nuevo con HSF dando lugar a una respuesta transitoria tal como se ha observado. Existen datos que apoyan este modelo; tal es el caso de la HSP73 que en humanos, se une a HSF1 e inhibe su actividad (Kobayashi and McEntee 1990; Kobayashi and McEntee 1993).

Regulación de la respuesta al choque térmico en eucariontes.

La respuesta al choque térmico es una reacción conservada de células y organismos a temperaturas elevadas (choque térmico o estrés calórico) (Morimoto 1993). Mientras que un elevado incremento de calor o choque térmico conlleva a daño celular y/o muerte celular, dosis sub-letales de choque térmico inducen una respuesta celular, la respuesta al choque térmico, el cuál a) protege a las células y organismos de un daño más severo, b) permite la recuperación de las actividades celulares y fisiológicas normales, y c) conlleva a un nivel más alto de termotolerancia (Selvan, Grewal et al. 1996; Newman, Foerster et al. 2003; Klose and Robertson 2004). Esto es crucial para la supervivencia de las células ya que previene la inactivación y desnaturalización por calor de enzimas y otras proteínas.

Sin embargo, existen mecanismos adaptativos que protegen a las células de los efectos proteotóxicos del estrés calórico.

A nivel molecular la respuesta al choque térmico es una reprogramación transitoria de las actividades celulares, destacando por la síntesis de las HSPs, conjuntamente con el cese en la síntesis de proteínas básicas. Las HSPs parece que se acumulan de una manera dosis-dependiente, en cantidades suficientes para proteger las células y favoreciendo un nivel más alto de termotolerancia (Buchner 1996; Gill, Gbur et al. 1998).

La expresión de los genes del choque térmico, que codifican las diferentes HSPs es primariamente se regula principalmente a nivel transcripcional. La señal común generada por varios estímulos estresantes parece ser el daño proteico, pero como el estrés activa el mecanismo que censa en la célula, exactamente cómo opera es desconocido. La respuesta al choque térmico puede también inducir a una señal de muerte que deriva en apoptosis o una rápida necrosis (Feng, Bonni et al. 2006).

La expresión de las HSPs inducibles es regulada por los factores transcripcionales del choque térmico (HSFs) (Horowitz and Robinson 2007). En respuesta a varios inductores tales como la temperaturas elevadas, oxidantes, metales pesados e infecciones virales y bacterianas, muchas HSFs adquieren actividad de unión al DNA a el elemento de choque térmico (HSE), así mediando la transcripción de los genes de choque térmico, lo cual resulta en la acumulación de HSPs (Westerheide and Morimoto 2005). A partir del aislamiento del gen individual de HSF de *Saccharomyces cerevisiae* (Jakobsen and Pelham 1988;

Sorger and Pelham 1988; Pelham 1989; Zimarino, Tsai et al. 1990), y de *Drosophila melanogaster* (Thomas and Elgin 1988; Cunniff, Wagner et al. 1991; Xiao, Perisic et al. 1991), muchos otros miembros de la familia HSF se han encontrado en vertebrados y plantas. La existencia de múltiple HSFs en vertebrados y plantas sugiere que diferentes HSFs median la respuesta a varias formas de estímulos ambientales o fisiológicos.

HSF

En eucariotas, los genes de choque térmico se regulan por la acción del factor transcripcional de choque térmico, el Heat Shock Factor (HSF), que interacciona con una secuencia de DNA conocida como elemento de respuesta al choque térmico (Heat Shock Element, o HSE) (Morimoto 1993) (Figura 8). En *Saccharomyces cerevisiae* o en *Drosophila melanogaster*, hay un único gen que codifica para el HSF, el gen HSF1 (Wiederrecht, Seto et al. 1988; Clos, Westwood et al. 1990), que es esencial. En otros eucariotas superiores, en cambio, se han descrito familias génicas que codifican este factor, compuestas por un número variable de genes (3 en tomate, 4 en humanos, por ejemplo) (Scharf, Rose et al. 1990; Schuetz, Gallo et al. 1991). Los factores de choque térmico de diversas especies no tienen una homología de secuencia demasiado elevada, pero la organización en dominios y el plegamiento tridimensional son bastante similares (Mager y De Kruijff, 1995).

HSF1 el factor encontrado en vertebrados, así mismo es homólogo a HSF encontrado en levaduras y moscas, y es activado por diversas formas de estrés. Mientras que HSF3, un HSF único en aves, se ha mostrado que funciona como un factor de transcripción dependiente de temperatura. En contraste con HSF1 y HSF3, HSF2 no es activo en respuesta a los estímulos de estrés clásicos, pero si bajo condiciones relacionadas con el desarrollo embrionario. En apoyo de estos hallazgos ni HSF2 o algún otro HSF es capaz de sustituir funcionalmente por HSF1 o rescatar la respuesta al choque térmico en ratones Knockout o en células derivadas de estos animales (Sistonen, Sarge et al. 1994). Se ha propuesto que el papel de los diferentes HSFs se sobrelapan dependiendo de las señales estimuladoras. Las actividades diferenciales de los HSF no excluyen la posibilidad de que diferentes miembros de la familia HSF puedan cooperar en orden para regular la expresión de sus genes blanco, como ha sido demostrado para las HSF1 y HSF3 de ave (Nakai and Morimoto 1993; Kawazoe, Nakai et al. 1998; Tanabe, Kawazoe et al. 1998; Kawazoe, Tanabe et al. 1999).

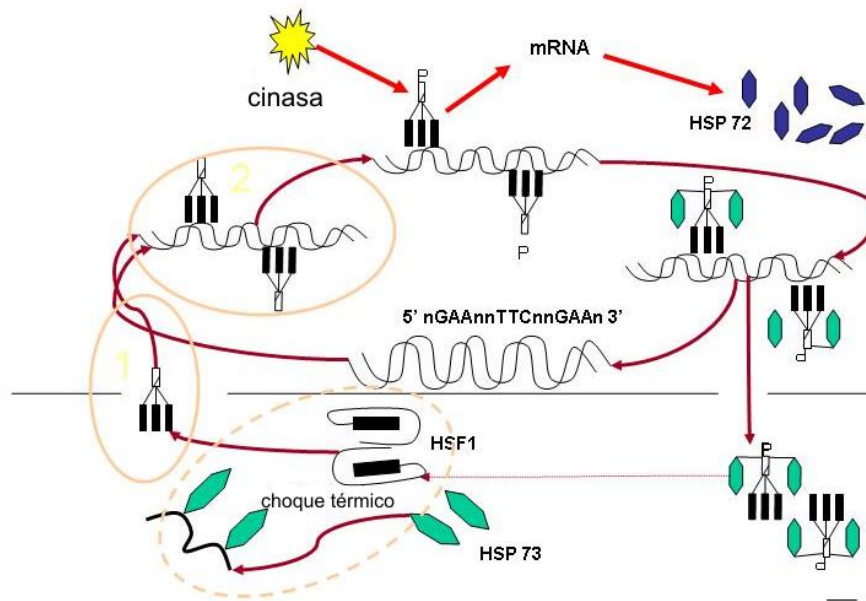


Figura 7 Modelo de la regulación de HSF1. En células sin estrés, HSF1 es mantenido en forma monomérica por medio de la interacción con HSP73 sin capacidad de unión al DNA. Después del choque térmico u otras formas de estrés, el HSF1 se ensambla en un trímero el cuál se une a una secuencia específica de elementos (HSE) en los promotores de los genes de las HSPs (por ejemplo HSP72) y se hiperfosforila. La activación de la transcripción del gen de HSP lleva a un aumento en la aparición de HSP72 y a la formación de un complejo HSF-HSP73. Finalmente, HSF1 se disocia del DNA y es eventualmente convertido a la forma monomérica sin capacidad de unión al DNA Tomado y modificado de (Morimoto 1993).

Termotolerancia

Mientras los organismos poseen mecanismos para adaptarse a los cambios en el medio que afectan su crecimiento y reproducción, cuando estos son demasiado severos pueden llegar a ser letales. Por ejemplo, si un organismo se expone de manera abrupta, a un choque térmico de p. ej. 20 a 25° C por arriba de su temperatura óptima de crecimiento, éste morirá. Sin embargo si antes de exponerlo a una temperatura letal se le expone primero, por un periodo breve a

una temperatura supra óptima no letal (p. ej. 10 a 15° C por arriba de la óptima de crecimiento), éste adquiere la capacidad de sobrevivir si se expone a una temperatura letal. Este fenómeno se conoce como inducción a la tolerancia. Se ha comprobado que si se somete a una célula a estrés, en pocos minutos del 15 al 25% de las proteínas intracelulares son HSPs. Distintos mecanismos causantes de estrés que conducen a la producción de proteínas anormales convergen en una misma vía, que lleva al aumento de los niveles de proteínas citoprotectoras, tendientes a disminuir o neutralizar los efectos deletéreos. Este fenómeno conocido como termotolerancia, también funciona con respecto a la hipoxia o la isquemia (Heads, Yellon et al. 1995). Más aún, un pre-tratamiento calórico produce tolerancia cruzada hacia otros tipos de estrés, como los producidos por distintos agentes tóxicos. Las células transfectadas con el gen para HSP73 con el fin de sobre expresar esta proteína, son más resistentes a los diversos estreses que las células normales. La sobre expresión de HSP73 también confiere protección contra la acción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de oxiradicales generados por drogas anticancerígenas (Borkan, Emami et al. 1993; Minisini, Kantengwa et al. 1994; Gill, Gbur et al. 1998; Valcu, Lalanne et al. 2008; Chen, Wu et al. 2009). . Los antiinflamatorios no esteroideos, entre ellos la aspirina, se han encontrado que potencian la activación de HSF1 y la respuesta al choque térmico (Amici, Rossi et al. 1995; Fawcett, Xu et al. 1997).

Aspirina

El desarrollo de la aspirina fue un hito importante en la historia de la medicina, ya que estimuló el desarrollo de una familia de medicamentos, conocidos colectivamente como anti-inflamatorios no esteroideo (AINEs). AINEs, como el ibuprofeno, el naproxeno y el sulindac que son medicamentos valiosos para el alivio del dolor, la inflamación y la fiebre y comúnmente se recetan para el tratamiento de trastornos reumatoides tales como la artritis. El mercado mundial de los AINEs supera seis mil millones dólares (Vainio and Morgan 1997; Rinsema 1999)

El ácido acetil salicílico o ASA ($C_9H_8O_4$) (conocido popularmente como aspirina), es un fármaco de la familia de los salicilatos, usado frecuentemente como antiinflamatorio, analgésico (para el alivio del dolor leve y moderado), antipirético (reduce la fiebre) y antiagregante plaquetario (indicado para personas con riesgo de formación de trombos sanguíneos) (Figura 8). Principalmente este último uso en individuos que ya han tenido un infarto agudo de miocardio (Ridker, Cushman et al. 1997)

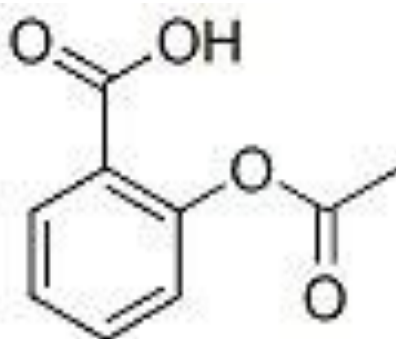


Figura 8. Estructura química de la aspirina.

Historia de la aspirina

La corteza del sauce blanco (*Salix alba*) ha sido usada desde tiempo inmemorial para el alivio de la fiebre y del dolor, incluso por Hipócrates en el siglo V a. C (figura 9). El principio activo de la corteza de sauce fue aislado en 1828 por Johann Buchner, profesor de farmacia en la Universidad de Múnich; se trataba de una sustancia amarga y amarillenta, en forma de agujas cristalinas que llamó *salicina*. El ácido acetilsalicílico fue sintetizado por primera vez por el químico francés Charles Frédéric Gerhardt en 1853 y luego en forma de sal por Hermann Kolbe en 1859. Hubo que esperar hasta 1897 para que el farmacéutico alemán Felix Hoffmann, de la casa Bayer, consiguiera sintetizar al ácido acetyl salicílico con gran pureza. Sus propiedades terapéuticas como analgésico y antiinflamatorio fueron descritas en 1899 por el farmacólogo alemán Heinrich Dreser, lo que permitió su comercialización. (Sneader 2000)



Figura 9. sauce blanco (*Salix alba*).

En 1997, la Biblioteca Nacional de Medicina (EU) enlista más 23.000 documentos sobre el ácido acetil salicílico y se ha estimado que en la actualidad un artículo científico sobre el uso del ácido acetil salicílico, es publicado en promedio cada dos horas. (Elwood 2001)

Aspirina fue el nombre comercial acuñado por los laboratorios Bayer para esta sustancia, convirtiéndose en el primer fármaco del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, AINEs. Posteriormente, en 1971, el farmacólogo británico John Robert Vane, entonces empleado del *Royal College of Surgeons* de Londres, pudo demostrar que la aspirina suprime la producción de prostaglandinas y tromboxanos, lo que abrió la posibilidad de su uso en bajas dosis como antiagregante plaquetario, ampliando enormemente su campo comercial y compensando el hecho de que, en la actualidad, su uso como antiinflamatorio de elección haya sido desplazado por otros AINEs más eficaces y seguros.

Mecanismo de acción

Los mecanismos biológicos para la inducción de la inflamación, dolor o fiebre son muy similares. En ellos intervienen una serie de sustancias que tienen un final común. En la zona de la lesión se generan unas sustancias conocidas con el nombre de prostaglandinas. Se las podría llamar también "mensajeros del dolor". Estas sustancias informan al sistema nervioso central de la agresión y se ponen en marcha los mecanismos biológicos de la inflamación, el dolor o la fiebre. En 1971 el farmacólogo británico John Robert Vane demostró que el ácido acetil salicílico actúa interrumpiendo estos mecanismos de producción de las

prostaglandinas y tromboxanos (Vane 1971; Vane and Botting 2003). Así, gracias a la utilización de la aspirina, se restablece la temperatura normal del organismo y se alivia el dolor. La capacidad de la aspirina de suprimir la producción de prostaglandinas y tromboxanos se debe a la inactivación irreversible de la ciclooxigenasa (COX), enzima necesaria para la síntesis de esas moléculas proinflamatorias (Figura 11). La acción de la aspirina produce una acetilación (es decir, añade un grupo acetilo) en un residuo de serina del sitio activo de la COX inactivándola así (Vane and Botting 2003).

Efectos antiinflamatorios

La aspirina es un inhibidor no selectivo de ambas isoformas de la ciclooxigenasa, pero el salicilato, el producto metabólico normal de la aspirina en el cuerpo, es menos eficaz en la inhibición de ambas isoformas. Los salicilatos que no son acetilados pueden tener funciones en la eliminación de radicales del oxígeno. La aspirina inhibe irreversiblemente a la COX-1, modifica la actividad enzimática de la COX-2 e inhibe la agregación plaquetaria, no así las especies no acetiladas del salicilato. Por lo general, la COX-2 produce los prostanoides, la mayoría de los cuales son pro-inflamatorios. Al ser modificada por la aspirina, la COX-2 produce en cambio lipoxinas, que tienden a ser antiinflamatorias (figura 10). Los AINEs más recientes se han desarrollado para inhibir la COX-2 solamente y así reducir los efectos secundarios gastrointestinales de la inhibición de la COX-1 (Warner and Mitchell 2002)

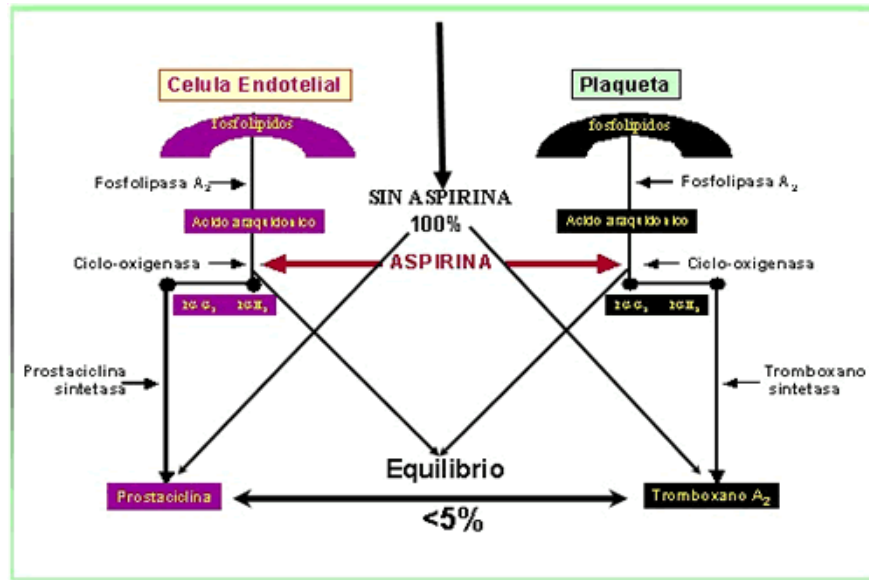


Figura 10. Mecanismo de acción de la aspirina.

La aspirina también interfiere con los mediadores químicos del sistema calicreína-kinina, por lo que inhibe la adherencia de los granulocitos sobre la vasculatura que ha sido dañada, estabiliza los lisosomas evitando así la liberación de mediadores de la inflamación e inhibe la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.(Panerai, Locatelli et al. 1993)

Efectos analgésicos

La aspirina es más eficaz reduciendo el dolor leve o de moderada intensidad por medio de sus efectos sobre la inflamación y porque es probable que pueda inhibir los estímulos del dolor a nivel cerebral subcortical. (Elwood 2001)

Efectos antipiréticos

La aspirina reduce la fiebre, mientras que su administración sólo afecta ligeramente a la temperatura normal del cuerpo. Los efectos antipiréticos de la aspirina probablemente están mediados tanto por la inhibición de la COX en el sistema nervioso central como por la inhibición de la interleucina-1, liberada por los macrófagos durante los episodios de inflamación.(Rinsema 1999; Elwood 2001)

Se ha demostrado que la aspirina interrumpe la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de los cartílagos y del hígado al difundir al espacio que está entre las dos membranas de la mitocondria y actuar como transportador de los protones requeridos en los procesos de la respiración celular (Somasundaram, Sigthorsson et al. 2000). Con la administración de dosis elevadas de aspirina se observa la aparición de fiebre debido al calor liberado por la cadena de transporte de electrones que se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias, contrariamente a la acción antipirética de la aspirina a dosis terapéuticas. Además, la aspirina induce la formación de radicales de óxido nítrico (NO) en el cuerpo, lo cual reduce la adhesión de los leucocitos, uno de los pasos importantes en la respuesta inmune a infecciones, aunque aún no hay evidencias concluyentes de que la aspirina sea capaz de combatir una infección (Paul-Clark, Van Cao et al. 2004). Existe evidencia que sugieren que el ácido salicílico y otros derivados de la aspirina modulan sus acciones de señalización celular por medio de NF- κ B (McCarty and Block 2006), un complejo de factores de transcripción que juegan un papel importante en muchos procesos biológicos, incluida la inflamación.

Efecto antiagregante plaquetario

Las dosis bajas de aspirina de 81 mg diarios, producen una leve prolongación en el tiempo de sangrado, que se duplica si la administración de la aspirina continúa durante una semana. El cambio se debe a la inhibición irreversible de la COX de las plaquetas, por lo que se mantiene durante toda la vida en las mismas (entre 8 y 10 días) (Vainio and Morgan 1997). Esa propiedad anticoagulante hace que la aspirina sea útil en la reducción de la incidencia de infartos en algunos pacientes (Vainio and Morgan 1997). 40 mg de aspirina al día son suficientes para inhibir una proporción adecuada de tromboxano A₂, sin que tenga efecto inhibitorio sobre la síntesis de prostaglandina I₂, por lo que se requerirán mayores dosis para surtir efectos antiinflamatorios (Tohgi, Konno et al. 1992).

En el año 2008 un ensayo clínico demostró que la aspirina no reduce el riesgo de aparición de un primer ataque cardíaco o accidente cerebrovascular, sino que reduce el riesgo de un segundo evento para quienes ya han sufrido un ataque cardíaco o un accidente cerebrovascular. En mujeres que toman dosis bajas de aspirina cada dos días se disminuye el riesgo de un accidente cerebrovascular, pero no es un tratamiento que pueda alterar sustancialmente el riesgo de un infarto o muerte cardiovascular (Ridker, Cook et al. 2005).

Antecedentes

Ha sido ampliamente reconocido que el tratamiento con calor o el estresar químicamente células o tejidos, genera en ellas una tolerancia a otros insultos

estresantes posteriores. Este acondicionamiento resulta en gran parte por la inducción de las HSPs aumentan el ambiente celular para el plegamiento y estabilidad proteica. Una respuesta al choque térmico es observada en muchos tejidos después de una elevación de la temperatura corporal de unos pocos grados y la fiebre puede, en parte, ser una adaptación para naturalmente incrementar la actividad chaperona intracelular. Recientemente ha habido un considerable interés en la posibilidad de que la inducción profiláctica de la actividad de las chaperonas pueda ser altamente benéfica en muchas situaciones clínicas.

Hay muchas formas por las que las chaperonas pueden ser inducidas terapéuticamente. La más obvia es un aumento moderado de la temperatura en tejidos, pero su localización y control de la magnitud en la temperatura parece estar en un estrecho rango terapéutico. Recientemente, muchos compuestos farmacológicos, que pueden inducir o incrementar la inducción de la síntesis de HSP han sido identificados. Dentro de los agentes inductores que inducen la expresión o incrementan la inducción de la HSP70, la aspirina presenta muchas ventajas, ya que es el agente analgésico-antipirético y antiinflamatorio más prescrito y es el estándar para la comparación y evaluación de otros. Entre otros trabajos se ha encontrado que la aspirina y otros AINEs inducen la expresión de HSP72 en monocitos humanos (Housby, Cahill et al. 1999), y se ha demostrado que los AINEs activan el factor transcripcional HSF1 en monocitos humanos (Soncin and Calderwood 1996). Existe evidencia de que algunos AINEs pueden provocar estrés oxidativo como es el caso del naproxeno (Boelsterli, Redinbo et al.

2013). Así mismo se ha observado que la aspirina puede generar H_2O_2 , al agregársele a un cultivo de adipocitos, alcanzando una concentración de $1 \mu M$ (comunicación personal de Zentella de Piña). También se ha reportado que la administración de la aspirina, vía orogástrica, brinda citoprotección a los linfocitos de rata contra agentes oxidantes (Zentella de Pina, Sandoval-Montiel et al. 2007) revertiendo algunos indicadores de estrés oxidativo como TBARs y carbonilación de proteínas (Sandoval-Montiel 2004).

Planteamiento del problema

Recientemente, se han identificado varios compuestos farmacológicos que pueden inducir o aumentar la inducción de la síntesis de HSP. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se han encontrado que pueden potenciar la activación de HSF1 a una respuesta de choque térmico (Jurivich, Sistonen et al. 1992; Amici, Rossi et al. 1995; Fawcett, Xu et al. 1997). En informes anteriores de nuestro grupo se ha encontrado que el tratamiento con aspirina *in vivo* puede revertir algunos de los marcadores bioquímicos del daño oxidativo (Zentella de Pina, Sandoval-Montiel et al. 2007), lo que sugiere la activación de un mecanismo citoprotector general.

La aspirina confiere protección contra agentes oxidantes; al administrarse *in vivo*, y la citoprotección correlaciona con un incremento en la expresión de la proteína HSP72, por lo tanto, la expresión de esta proteína refleja de manera directa o indirecta el efecto brindado por la aspirina.

Asi mismo, existen pruebas de que otros AINEs como el naproxeno pueden causar estrés oxidativo (Yokoyama, Horie et al. 1995). Además, se ha demostrado que la aspirina (10 μ M) puede generar H_2O_2 en tejido adiposo de ratas alcanzando una concentración final de 1 μ M.

El estudio del mecanismo por el que se sobre expresa la HSP72 puede ayudarnos a entender el mecanismo protector de la aspirina.

Hipótesis

La aspirina hace más eficiente la activación del factor HSF1 debido a la presencia de H_2O_2 .

Objetivo

Evaluar la activación del factor de transcripción HSF1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs) aisladas de rata tratadas con aspirina en un modelo *in vivo*, sometidas a choque térmico.

Evaluar la activación del factor de transcripción HSF1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs) aisladas de rata en un modelo *in vitro* con aspirina y el H_2O_2 sometidas a choque térmico.

Material y Métodos

Reactivos químicos: albúmina de suero bovino, Histopaque™, ácido acetil-salicílico (aspirina) y salicilato de sodio (NaSal) se obtuvieron de la Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Todos los reactivos restantes eran de la mayor pureza disponible. El reactivo de Bradford se compró de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.)

Animales: Ratas Wistar macho (200 g \pm 20 g), fueron alimentados con una dieta comercial (Nutricubos, Purina-Nestlé, México DF, México), recibieron agua *ad libitum* y se mantuvieron en ayuno durante 16 horas antes del tratamiento. Los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos y se trataron de la siguiente manera: El grupo control no recibió ningún tratamiento. El grupo experimental recibió aspirina a través de un tubo gástrico (40 mg/Kg de peso corporal) ajustando las dosis farmacológicas a fin de reproducir las empleadas en los seres humanos. Todos los animales se sacrificaron y se tomaron las muestras de sangre en tubos con heparina. Dado que el manejo de animales se desarrolló en la Facultad de Medicina, el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) aprobó el protocolo experimental, de conformidad con el cuidado de los animales y el uso del Comité Internacional.

Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs): Las PBMNCs fueron aisladas de la sangre a través de un gradiente de

Histopaque™ de acuerdo a las indicaciones del fabricante. En resumen, 5 ml de sangre se diluyeron con solución isotónica salina buffer fosfato (PBS) (1:3). 9 ml de la sangre diluida se agregaron a un tubo cónico de 15 ml que contiene 3 ml de Histopaque™, la sangre diluida se añadió cuidadosamente para evitar la mezcla. Después de la centrifugación a 1,800 xg durante 30 min, la fracción que contiene las PBMNCs fue cuidadosamente absorbida y se lavó con PBS (2 veces).

Determinación de la concentración de proteínas: La concentración de proteína se determinó como se describe por Bradford (Bradford 1976), utilizando una solución comercial (Bio-rad). Se utilizaron concentraciones crecientes de la albúmina de suero bovino como patrón.

Extracción de RNA total y ensayos de RT-PCR: El RNA total se preparó a partir de las PBMNCs utilizando una solución comercial (Trizol™, Invitrogen). Los niveles de RNAm de HSP72 en la PBMNCs fueron cuantificados por la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) como se describió anteriormente (Nakahara, Hunter et al. 2006). La amplificación de la señal de HSP72 se normalizó con el producto de amplificación del RNAm de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizado como patrón interno endógeno. La transcripción inversa se realizó en 1 µg de RNA total por 90 min a 42° C en 5 µL en un mezcla de reacción contiendo 25 µmol / L Tris-HCl (pH 8.3), 50 µmol / L mol KCl, 5 µmol / L MgCl₂, 2 µmol / L ditioneitol, 1 µmol / L de deoxinucleótidos 10 U de la transcriptasa inversa del virus aviar de la

mieloblastosis (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), 10 U inhibidor de la ribonucleasa (Roche Molecular Biochemicals), y 0,8 µg oligo (dT) 15 Primer (Roche Molecular Biochemicals). La transcripción reversa se detuvo calentando la muestra a 95 ° C durante 2 min.

El PCR multiplex se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 20 µL conteniendo 10 µmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 µmol/L KCl, 1.5 µmol/L MgCl₂, 2% dimetil sulfóxido, 0.2 µmol/L de cada desoxinucleótido, 0.1 µmol /L de cada uno de los primers específicos 5' y 3' para GAPDH y 1 µmol /L para cada uno de los primers específicos 5' y 3' para HSP 72. Se utilizaron 25 ng de cDNA y 0.5 U de la Taq DNA polimerasa (Roche Molecular Biochemicals). El Primer sentido para HSP72: 5'GAGTCCTACGCCTTCAATATGAAG3'; primer antisentido para HSP72: 5'CATCAAGAGTCTGTCTCTAGCCAA3'. La amplificación por PCR se realizó por 30 ciclos (HSP 72), que consistió en desnaturalización (94° C, 45 segundos), la alineación (60° C, 45 segundos) y la extensión (72° C, 75 segundos). Después de 8 ciclos (HSP 72), 0.1 µmol/L de cada uno de los primers para GAPDH, fueron añadidos a la mezcla de reacción y los ciclos de PCR continuaron. Primer sentido para GAPDH: 5'CAGCAATGCATCCTGCAC3'; primer antisentido para GAPDH: 5'GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG3' de acuerdo a protocolos previos (Nakahara, Hunter et al. 2006). Los productos de PCR fueron analizados en un gel de archilamida al 10% (w/v), teñido con bromuro de etidio, visualizados con transiluminación ultravioleta, fotografiado y sometidos a análisis de imagen.

Ensayo de retardo en la movilidad electroforética EMSA: Los ensayos de cambio de la movilidad de DNA se realizaron mediante el uso de una sonda de

auto-alineación de oligonucleótidos HSE (5'CTAGAAGCTTCTAGAAGCTTCTAG3') como se describe previamente (Morimoto, Sarge et al. 1992), con 10µg de extracto de proteínas nucleares y buffer de reacción para la reacción de unión al DNA. Los volúmenes para ajustar la concentración de proteínas nucleares se ajustaron con agua bi-destilada, de manera que la misma cantidad de proteínas, se añada a cada mezcla de reacción vinculante (concentración final 10mg de proteína nuclear en un volumen en final de 13 µL). Las reacciones de unión se realizaron con 1 µg de poli(dI-dC), 10 µM Tris (pH 7.8), 50 µM NaCl, 1 µM EDTA, glicerol 5% ditiotretitol 0.5 µM en un volumen final de 20 µL. Las mezclas de reacción se incubaron en hielo durante 20 minutos e inmediatamente se cargaron en un gel no desnaturizante de acrilamida al 7.5% conteniendo 6.7 µM Tris-HCl (pH 7.5), 1 µM EDTA y 3,3 µM de acetato sodio. Los geles fueron sometidos a electroforesis durante 2,5 horas a 150 V, se secaron y fueron expuestos y almacenados en pantallas de fósforo (GE) durante la noche y se visualizados en un Typhoon 9400 (GE).

Western Blot: Los extractos de proteínas fueron fraccionadas en geles de poli-acrilamida desnaturizantes con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (10% de acrilamida) y electro-fijados en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente en TBST (20 µM Tris-HCl [pH 7.6], 137 µM NaCl, 0,1% [vol/vol] de Tween 20) suplementada con 5% de leche en polvo. Los anticuerpos (Abs) se diluyeron en TBST (1:250 para anti-HSP72 Ab), las membranas se incubaron el anticuerpo primario (Santa Cruz sc-66048) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron en

TBST y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano anti-ratón; Bio-Rad) diluido 1:10.000 en TBST y el 2,5% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron y las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia (Pierce). La señal luminiscente fue grabada en una película de autorradiografía (XAR; Kodak).

Resultados

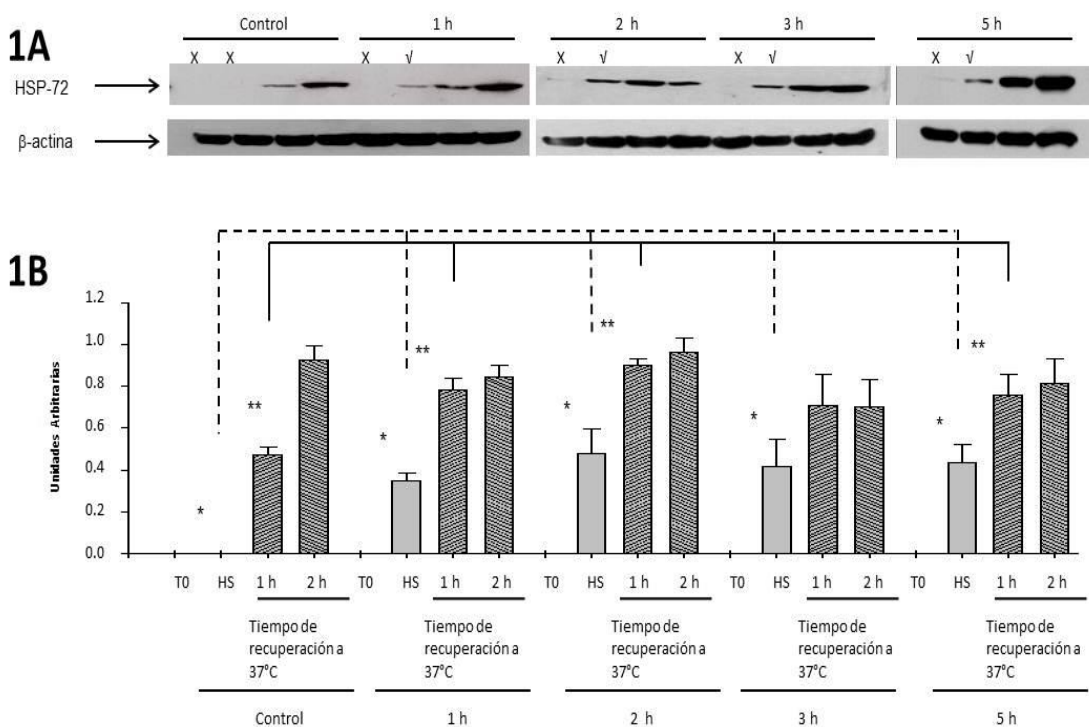


Fig. 11. Cinética de inducción de la proteína HSP72 en PBMNCs de rata en respuesta al choque térmico, con o sin tratamiento con aspirina. El tratamiento de los animales y el aislamiento de PBMNCs se llevaron a cabo como se describe en Materiales y métodos. Las células fueron aisladas en diferentes momentos: 1, 2, 3 o 5 horas después de la administración de aspirina y fueron sometidas al protocolo de choque térmico se describe en Materiales y métodos. Las células de ratas no tratadas sirvieron como control. 100 μ g de proteína total de las células fueron colocados por carril en geles de acrilamida para su separación. Como control de carga, la membrana se reveló con un anticuerpo contra la β -actina.

Resultados previos sugieren que la aspirina puede ser un citoprotector cuando es administrada *in vivo*, la cual podría estar asociada a la expresión de un mecanismo de citoprotección (Zentella de Pina, Sandoval-Montiel et al. 2007). Las chaperonas y en particular las HSPs están reconocidas como parte de estos mecanismos. Para evaluar esta hipótesis analizamos el contenido de la proteína HSP72 en células mononucleares de sangre periférica de ratas (PBMNCs) que recibieron aspirina (40 mg/Kg de peso corporal). Sin embargo no detectamos la expresión de la proteína HSP72 en células derivadas de animales con o sin tratamiento de aspirina (datos no mostrados), decidimos someter a las PBMNCs a un protocolo de choque térmico *in vitro*. sometimos a las PBMNCs a 42° C por 45 min determinando el contenido de HSP72 al final del choque térmico y 1 o 2 horas posteriores (1h y 2h a 37°C como periodo de recuperación) (diseño experimental en la figura 12). En las células de ratas control no se detectó HSP72, mientras que en células de ratas tratadas con aspirina durante 1 h se detectó una cantidad mayor de HSP72, (78% más de expresión al cabo de 1 h después del choque térmico en PBMNCs de ratas con tratamiento con aspirina versus el control figura 11).

Al final del protocolo de choque térmico en las PBMNCs de animales tratados con aspirina durante 1, 2, 3 o 5 h, la proteína HSP72 siempre estuvo presente (0,78, 1,17, 1,08 y 0,84 veces mayor, respectivamente), en comparación con las células de ratas sin tratamiento, donde la presencia de la HSP72 no fue detectada.

También analizamos la expresión de HSP72 a las 2 h después de choque térmico *in vitro*. En PBMNCs de ratas tratadas con aspirina durante 1 h, la expresión de HSP72 fue mayor en comparación con las células de control. Cuando las PBMNCs se obtuvieron 5 h tras la administración de aspirina, el contenido de HSP72 después de 2 h del choque térmico se redujo aún.

Estos resultados indican que la administración de aspirina *in vivo* lleva a una acelerada síntesis de HSP72 en respuesta a un choque térmico *in vitro*. Además, el tratamiento con aspirina *in vivo* conduce a un contenido mayor final de HSP72 tras un choque térmico. Estos efectos parecen notablemente disminuir a las 5 h.

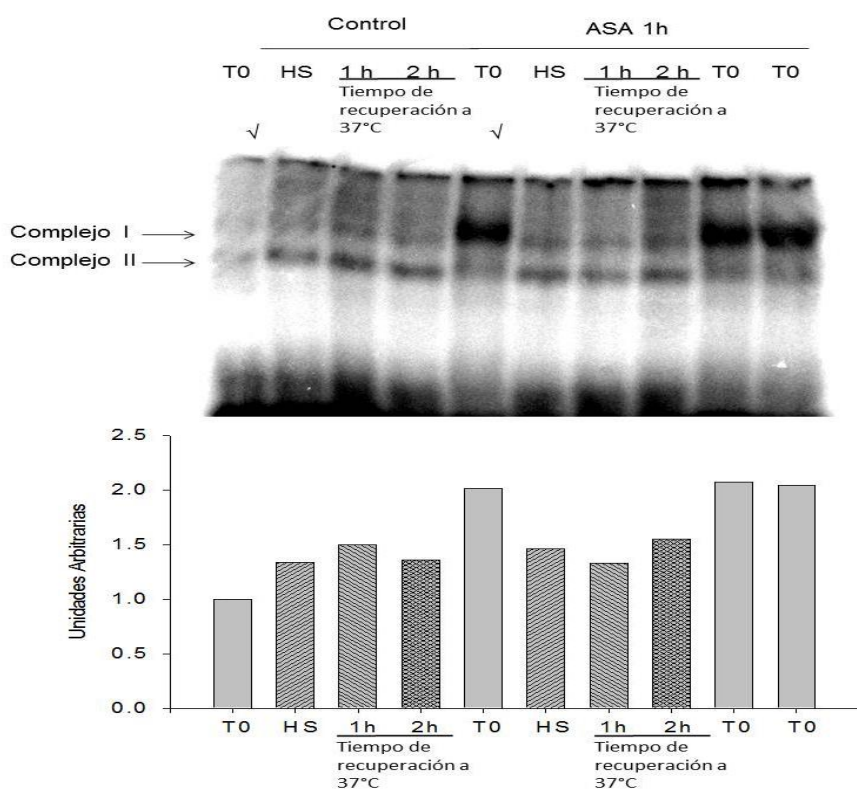


Fig. 12. EMSA del factor HSF1 de PBMNCs de rata con o sin tratamiento de aspirina. Se utilizó un extracto de proteínas nucleares de PBMNCs (30 µg) para determinar la presencia de HSF1 capaz de unirse a una secuencia de consenso entre el elemento de respuesta HSE, como se describe en Materiales y Métodos.

Una posible explicación para el rápido aumento de la expresión de HSP72 en respuesta a la administración de aspirina *in vivo* es que habría una transcripción más eficiente. Dado que el factor de transcripción HSF1 es el responsable de promover la activación de la transcripción del gen de la Hsp72, se decidió evaluar la presencia de este factor de transcripción en el núcleo de PBMNCs de rata con o sin tratamiento con aspirina *in vivo*. Para realizar esto, se obtuvieron extractos de proteínas nucleares de PBMNCs, los cuales son ricos en factores de transcripción. La presencia de HSF1 en los extractos nucleares fue evaluada por EMSA, utilizando una sonda con la secuencia de consenso del elemento de respuesta HSE. En la figura 12, se observa un complejo DNA/proteína con la movilidad retardada en los extractos nucleares de PBMNCs de ratas tratadas con aspirina (1 h), en comparación con el control. Este resultado nos permite concluir que la aspirina promueve la movilización de HSF1 hacia el núcleo donde se une a la cromatina, y por lo tanto, podría acelerar la transcripción en respuesta a un choque térmico *in vitro*.

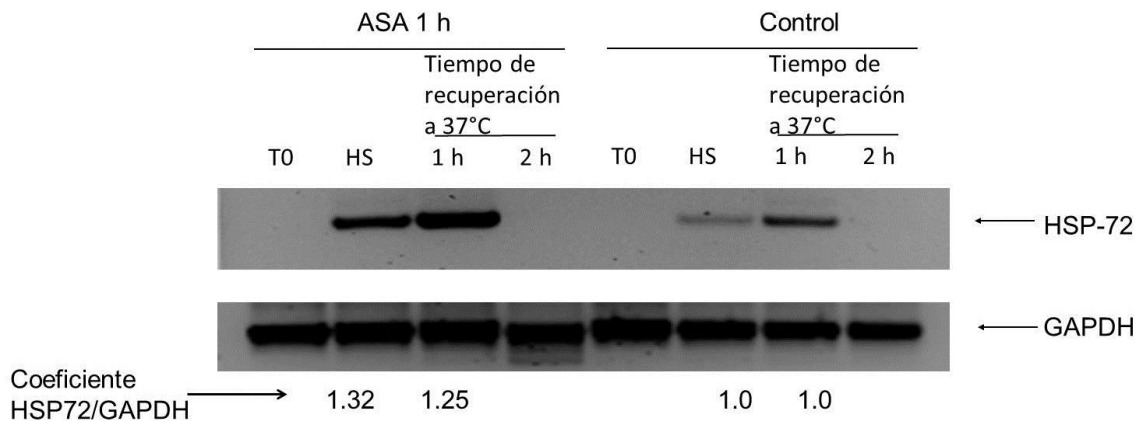


Fig.13. RT-PCR de UNAM de HSP72 en PBMNCs de rata con o sin tratamiento de aspirina. Las PBMNCs se extrajeron a 1 h después del tratamiento con aspirina, y el RNA total fue extraído antes y después del choque térmico (42 ° C durante 45 min). La PCR se realizó como se describe en Materiales y métodos.

Habiendo determinado que la aspirina promueve una rápida expresión de HSP72 y translocación de HSF1 al núcleo de PBMNCs de rata, se decidió evaluar un posible aumento de RNAm en estas células. Como se describe en Materiales y Métodos RNA total se obtuvo y fue sometido a una transcripción inversa. cDNA generado a partir de una secuencia de HSP72 fue amplificado. RT-PCR para los resultados de HSP72 se muestran en la Figura 13, indicando que no hay transcripción en PBMNCs de los animales de control, ni en los animales tratados con aspirina. Los productos de la amplificación de HSP72 sólo se detectaron a partir de células sometidas a un choque térmico, tanto en las células de los animales control y los tratados con aspirina. En PBMNCs tratados con aspirina la cantidad de los productos de PCR correspondiente a la transcripción HSP72 fueron superiores a los que se encuentran en las células de control, con una relación de HSP72/GAPDH de 1.0 vs 1.32 en el HS y 1.0 vs 1.25 en el tiempo de 1h en el tiempo de recuperación. Se observa a su vez que tanto las PBMNCs de ratas con tratamiento de aspirina como de las ratas control a las 2 h de recuperación no hay presencia de productos del RT-PCR.

Estos resultados sugieren que no hay ninguna actividad transcripcional en PBMNCs de ratas tratadas con aspirina, a pesar de la presencia de HSF1 en el núcleo. Sin embargo, en respuesta a un estímulo adecuado, tal como un choque térmico, la transcripción de es más eficiente en células donde HSF1 estaba presente en el núcleo.

El tratamiento *in vivo* con aspirina mostró que en PBMNCs, el factor HSF1 es traslocado al núcleo y existe un el aumento acelerado en el contenido de RNAm y proteínas de HSP72 cuando se someten a un choque térmico *in vitro*. Para probar si la aspirina por si sola puede desempeñar un papel en este evento de pre-acondicionamiento, las PBMNCs de ratas sin tratamiento, se incubaron *in vitro* con aspirina.

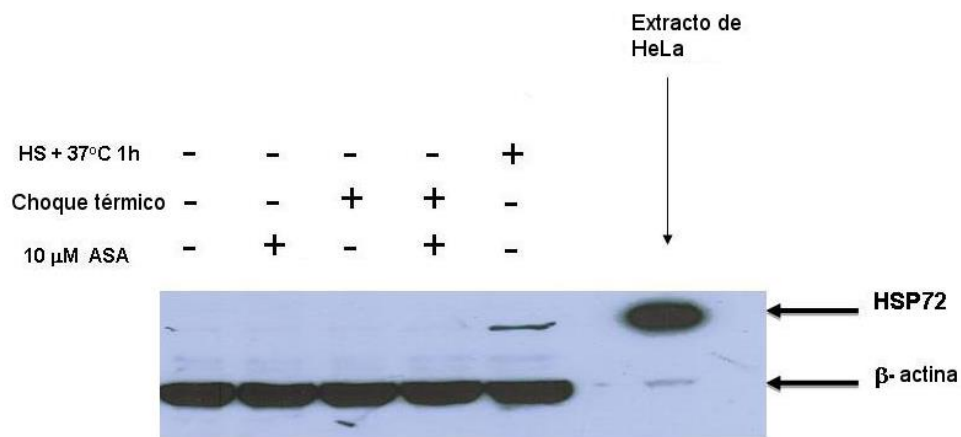


Fig. 14. Western Blot de HSP72 en PBMNCs de ratas incubadas con aspirina *in vitro*. Las PBMNCs fueron tratados *in vitro* con o sin aspirina o salicilato de sodio durante 1 hora y/o un choque térmico (42 ° C durante 45 min) como se indica (+), antes de obtener el extracto proteico total. 100 μg de proteína total fueron colocados por carril. Como control positivo se colocaron 5 μl de extracto de células HeLa. Como el control de carga la membrana se reveló con un anticuerpo contra β-actina.

Un grupo de estas células se sometieron a un choque térmico al final de la incubación. La figura 14 muestra que la aspirina por si sólo no conduce a la expresión de HSP72, y no se observó expresión acelerada incluso después de un choque térmico. La comparación entre los resultados de la Figura 12 sugiere que la aspirina *in vivo* provoca señales implicadas en el pre-acondicionamiento observado *in vivo*, que no puede ser generado *in vitro*.

Es difícil establecer la naturaleza de las señales generadas *in vivo* en respuesta al tratamiento con aspirina. Los estudios preliminares analizando los efectos *in vitro*, provocados por la aspirina en el tejido adiposo, reveló un aumento en la producción de H₂O₂ (de Pina, Vazquez-Meza et al. 2008). Para evaluar si el tratamiento con H₂O₂ puede sustituir el efecto causado por la aspirina en el pre acondicionamiento de PBMNCs, se pre-trataron las células con H₂O₂ y se evaluó la expresión HSP72 en respuesta a un choque térmico.

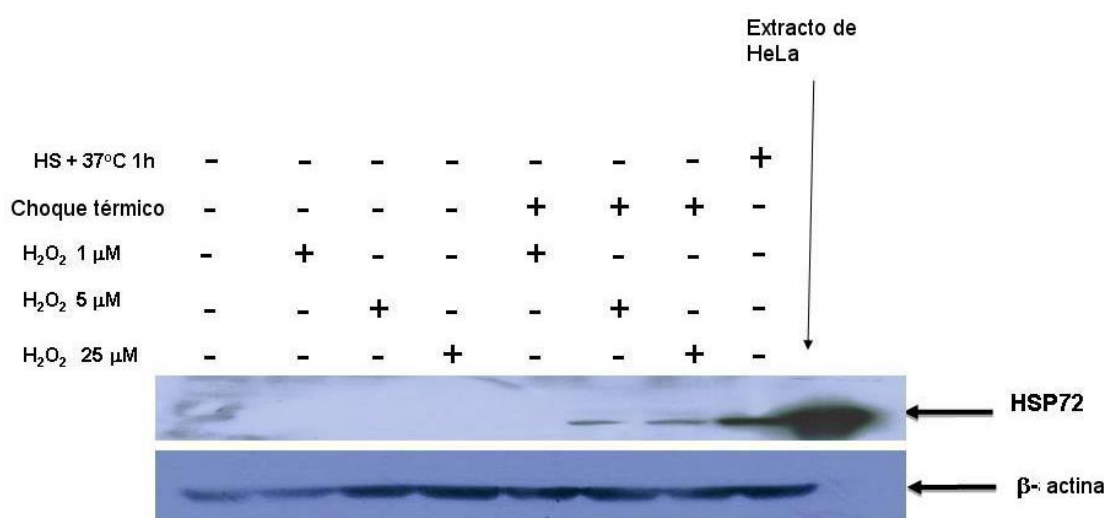


Fig. 15. Western Blot de HSP72 en PBMNCs tratadas con H₂O₂ *in vitro*. Las PBMNCs fueron tratadas *in vitro* con H₂O₂ a 1, 5, 25 μM por 1 h. Algunas de las células incubadas fueron sometidas a un choque térmico (42 ° C durante 45 min), además del tratamiento con H₂O₂. 100 μg de proteína total fueron colocados por carril. 5 μL de extracto proteico de HeLa fueron colocados como control positivo. Como control de carga la membrana se reveló con un anticuerpo contra la β-actina.

Como se muestra en la Figura 15, la incubación de H₂O₂ no promueve la expresión rápida de HSP72 a menos que se someta a un choque térmico. Sólo en las concentraciones más altas empleadas de H₂O₂ (5 y 25 μM) y la sobre exposición de la película, pudimos ver una débil expresión de HSP72. Este resultado sugiere que es probable que elementos adicionales presentes *in vivo*, sean requeridos, además de H₂O₂ para promover estas respuestas.

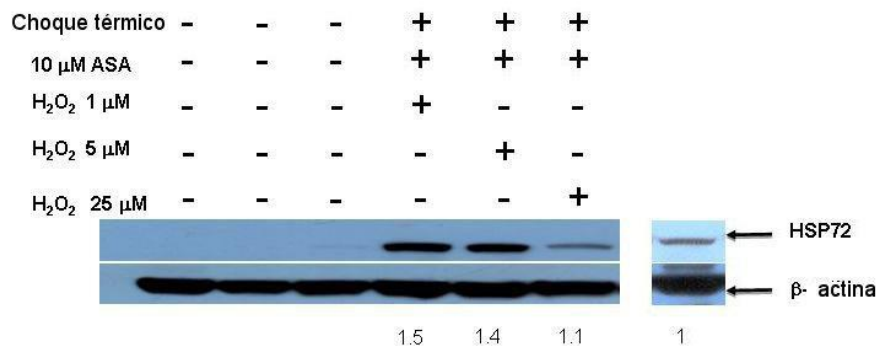


Fig. 16. Western Blot de HSP72 en PBMNCs de ratas tratadas con aspirina o salicilato de sodio, además del tratamiento H₂O₂ *in vitro*. Las PBMNCs fueron tratadas *in vitro* con aspirina o salicilato de sodio (10 μ M) y H₂O₂ al 1, 5, 25 μ M por 1 h. Algunas de las células incubadas fueron sometidas a un choque térmico (42 ° C durante 45 min). 100 μ g de extracto de proteínas totales se colocaron por carril. 5 μ L de extracto proteico de HeLa fueron colocados como control positivo. La membrana se reveló con un anticuerpo contra β -actina como control de carga.

Debido a la débil respuesta generada por H₂O₂, una co-incubación de H₂O₂ más aspirina fue probada, con las concentraciones de H₂O₂ empleadas anteriormente (1, 5 y 25 μ M). Al final de la co-incubación, algunas células fueron sometidas a un choque térmico (42°C durante 45 min) *in vitro*. La figura 16 muestra que la incubación *in vitro* de PBMNCs con aspirina y sometido a un choque de calor favorece la inducción de la proteína HSP72 en función de la concentración de H₂O₂ presente en el medio. Con la mayor concentración de H₂O₂ se observó una disminución en la expresión de HSP72 después del choque térmico. La expresión observada inducida por la combinación que incluye H₂O₂ en PBMNCs lleva a una mayor expresión de HSP72 en comparación con la observada en las células de ratas tratadas con aspirina sometidas a un choque térmico *in vitro*. Este resultado sugiere un probable papel de los radicales libres en el evento pre-activante de la transcripción de HSP72.

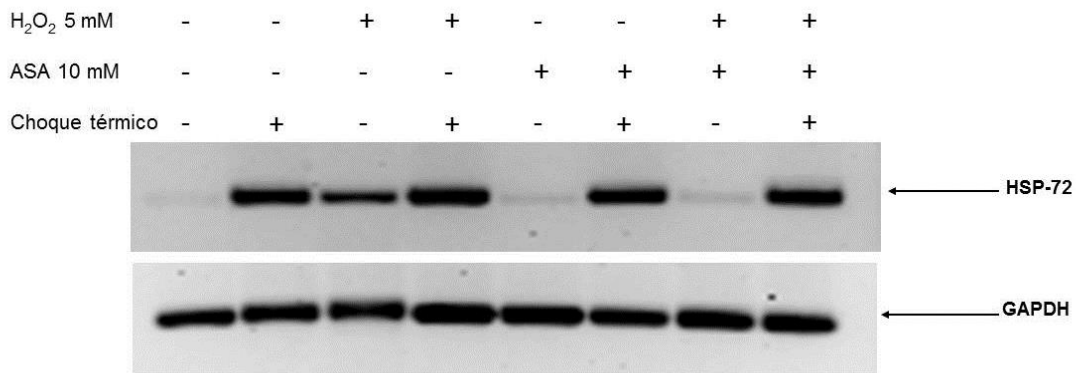


Fig. 17. RT-PCR de RNAm de HSP72 PBMNCs de rata, pre-incubadas con aspirina o salicilato de sodio y H₂O₂. Las PBMNCs se incubaron con la aspirina y de H₂O₂ por 1 h. El RNA total fue extraído antes y después choque térmico (42 ° C durante 45 min). La PCR se realizó como se describe en Materiales y métodos.

Evaluamos un posible aumento en el RNAm para HSP72 en PBMNCs tratadas *in vitro* con combinaciones de aspirina o salicilato de sodio y / o H₂O₂ sin choque térmico. El cDNA se generó a partir de RNA total y se sometió a PCR con iniciadores específicos para el HSP72 RNAm como se describe en Figura 17. La figura 9 no muestra transcripciones detectables de HSP72, a menos que las células se sometieron a un choque térmico. Este efecto es muy similar al observado en los experimentos *in vivo* en los que el tratamiento con aspirina sola no provoca la actividad transcripcional.

A continuación se comparó el efecto del pre-acondicionamiento inducido por la combinación de ASA + H₂O₂ aplicada *in vitro* (Figura 18), a la observada con el efecto de pre-acondicionamiento inducido *in vivo* en PBMNCs, de animales administrados con ASA (45 mg / kg). El efecto más significativo fue la expresión acelerada de la proteína HSP-72 seguido por un choque térmico *in vitro* cuando

las células fueron pre-tratadas con la combinación de ASA + H₂O₂ (carril 6 en comparación con el carril 2 en la figura). Esta expresión acelerada de la proteína HSP-72 continuó siendo observada después de 1 h durante el tiempo de recuperación después del choque térmico y desaparece después de 2 h.

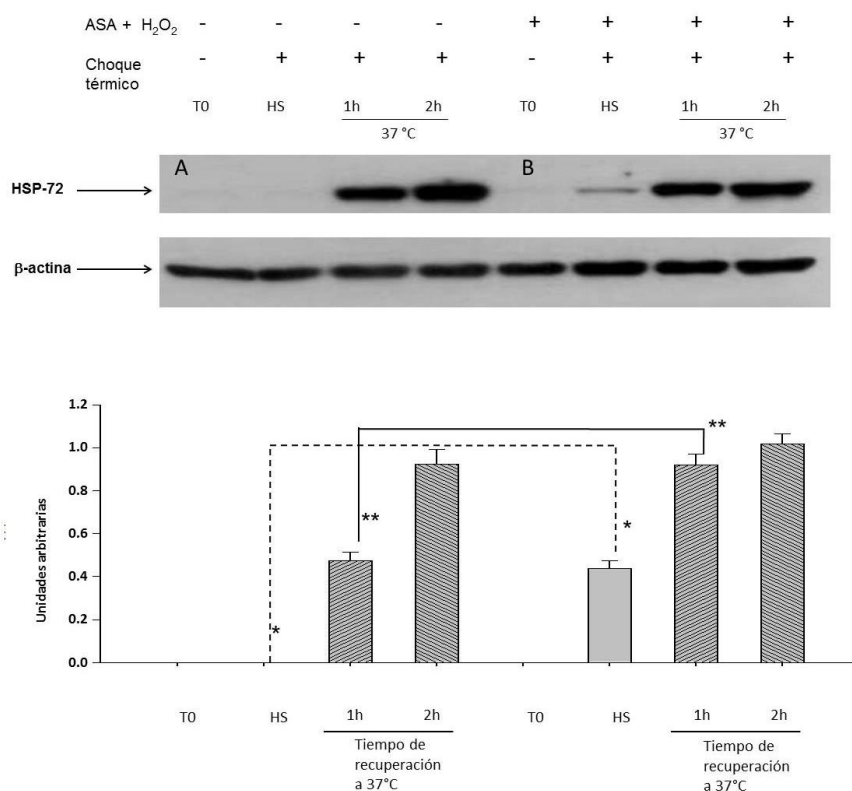


Fig. 18. RT-PCR de RNAm de HSP72 PBMNCs de rata, pre-incubadas con aspirina o salicilato de sodio y H₂O₂. Las PBMNCs se incubaron con la aspirina y el salicilato de sodio y de H₂O₂ por 1 h. El RNA total fue extraído antes y después choque térmico (42 ° C durante 45 min). La PCR se realizó como se describe en Materiales y métodos. La imagen muestra geles de acrilamida

Dado que la combinación ASA + H₂O₂ condujo a una expresión mayor de la HSP-72 *in vitro* en respuesta al choque térmico, se evaluó el efecto de esta combinación, en la actividad de unión HSF-1/DNA (Figura 19). Como se esperaba después del choque térmico (HS) se observó un pequeño aumento en la señal de los complejos I y II (carriles 1 y 2). El H₂O₂ provocó la disminución de la señal de

ambos complejos en condiciones no estimuladas y también disminuyó la señal siguiente de choque térmico (carriles 3 y 4). ASA solo condujo a una disminución de la señal del complejo I, pero no afectó complejo II (carril 5) y no tuvo efecto significativo sobre el aumento de la señal del complejo I seguido del choque térmico (carril 6). Mientras que la combinación de ASA + H₂O₂ produjo un pequeño aumento en la señal del complejo I (carril 7), la mayor señal de este complejo se observó con la combinación de choque térmico + ASA + H₂O₂ que corresponde a un aumento del 20% con respecto al control sin tratar (carril 8). Por lo tanto, este resultado nos lleva a concluir que la combinación de ASA + H₂O₂ *in vitro* promueve una actividad débil de unión al DNA por parte de HSF-1. Cabe señalar que los cambios en el complejo II no siempre reflejan el comportamiento de complejo I.

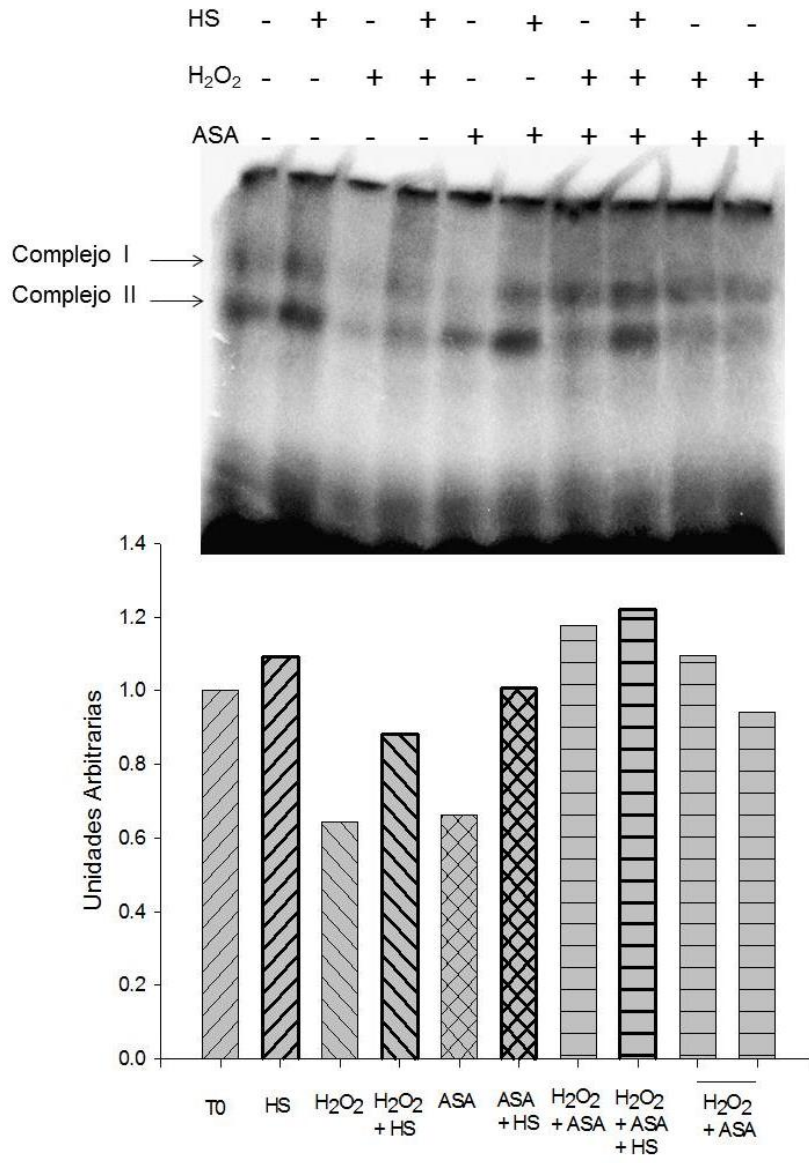


Fig. 19. RT-PCR de RNAm de HSP72 PBMNCs de rata, pre-incubadas con aspirina o salicilato de sodio y H₂O₂. Las PBMNCs se incubaron con la aspirina y el salicilato de sodio y de H₂O₂ por 1 h. El RNA total fue extraído antes y después choque térmico (42 ° C durante 45 min). La PCR se realizó como se describe en Materiales y métodos. La imagen muestra gels de acrilamida (7,5%).

Discusión

La utilidad clínica de la aspirina, interfiriendo con la inflamación y proporcionando efectos analgésicos ha sido ampliada a la prevención de las enfermedades cardiovasculares, evitar la preclamsia y la reducción en el riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y el cáncer de colon. Además de la interferencia con ciclooxygenasas I y II, por parte de la aspirina, así mismo se ha demostrado que modula a la sintasa de NO, la señalización por NF-kB y el metabolismo de la ATP, así como la generación de H_2O_2 , el estrés oxidante e interfiere con la apoptosis (Zandi, Anthony et al. 2002; Schror 2003; Czyz and Watala 2005; Liu, Sakoda et al. 2005; Rodondi, Cornuz et al. 2005). Por otra parte, la sobre expresión de HSP72 tiene un efecto citoprotector en una variedad de sistemas celulares (Mosser, Caron et al. 1997; Yenari, Giffard et al. 1999; Chung, Bae et al. 2003). Aquí se describe una relación entre el tratamiento con aspirina y la eficiencia de expresión de HSP72. La aspirina promueve la translocación de HSF1 en PBMNCs de rata, la cual precede a una expresión de HSP27 acelerada, en respuesta al choque térmico. Este efecto fue transitorio, en nuestro modelo *in vitro* puede ser mimetizado con la co-incubación de aspirina con H_2O_2 seguido de un choque térmico.

Experimentos *in vivo*

La pre activación *in vivo*, en los PBMNCs fue transitoria por la administración de ácido acetil salicílico *in vivo*, con un efecto máximo a 1 hora

después del tratamiento y que desaparece después de 5 h. Este efecto se correlaciona con estudios previos de nuestro grupo donde la administración *in vivo* de ácido acetil salicílico conlleva a una citoprotección evaluado *in vitro* frente a la citotoxicidad del etanol (Zentella de Pina, Sandoval-Montiel et al. 2007). Estos efectos transitorios podrían estar relacionados con la farmacodinámica del ácido acetilsalicílico.

El efecto del ácido acetil salicílico en células en cultivo es una herramienta valiosa, pero no siempre reflejan los efectos en organismos íntegros, el ácido acetil salicílico, por lo tanto, se ha probado en una variedad de modelos animales. En particular, en nuestro estudio el efecto del choque térmico sobre la expresión de HSP72, fue probado sometiendo las PBMNCs control o de ratas tratadas con ácido acetil salicílico, mediante un protocolo de choque térmico *in vitro*. Estos resultados sugieren que el ácido acetilsalicílico produce una activación parcial de la HSR que se hace visible sólo después de una segunda señal de estrés, tales como el choque térmico *in vitro*, un efecto similar se ha descrito con otros AINEs, como indometacina (Westerheide and Morimoto 2005). Este tipo de estudios indican claramente los efectos *in vivo* en los órganos centrales, como los pulmones, el hígado y el riñón. Otros estudios en animales íntegros, con ratas tratadas con ácido acetil salicílico han demostrado efectos metabólicos en el tejido adiposo de rata (de Pina, Vazquez-Meza et al. 2008). Hemos establecido un sistema experimental que podría aplicarse a los seres humanos, analizando los efectos en las PBMNCs, como indicadores de cambios en los órganos centrales. Hasta donde sabemos, en el presente trabajo se reporta por primera vez que la

administración orogástrica de ácido acetil salicílico en ratas promueve la translocación de HSF1 al núcleo de PBMNCs, que en sí mismo podría explicar la expresión de HSP72 durante el pre-acondicionamiento observado en respuesta al choque térmico. La falta de expresión de HSP72 anterior al choque térmico es importante ya que la expresión de HSP72, incluso a niveles bajos, afecta a diversos procesos bioquímicos, tales como la síntesis de proteínas (Silva, Wang et al. 2007). Sin embargo, es importante señalar que se ha reportado que cuando la localización sub-celular de HSF-1 se analizó en el tejido hepático de las ratas que recibieron una dosis intraperitoneal (IP), de ácido acetilsalicílico (100 mg / kg), no se detectó la translocación al núcleo de HSF1 (Fawcett, Xu et al. 1997). En cambio, cuando se administra una dosis de ácido acetilsalicílico de 45 mg / Kg de peso vía orogástrica (OG) a ratas, en PBMNCs aislados a las 2 horas posteriores, encontramos que HSF-1 es trasladado al núcleo. Esta diferencia podría estar relacionada con el modo de administración (IP vs. OG), el vehículo empleado (100% de etanol en el primer caso y el agua en el segundo), el momento de la evaluación (1 hora frente a 2 horas) y el tipo de células analizadas (hepatocitos frente PBMNCs). A pesar de esta diferencia de la translocación de HSF1 en ambos estudios, sometiendo a todo el animal o PBMNCs, al momento de un choque térmico se revela una potenciación de la expresión de HSP72 tanto en el tejido hepático como en las PBMNCs aisladas, lo que sugiere la contribución de otras señales en la pre-activación de la HSR.

Experimentos *in vitro*

La translocación de HSF1 al núcleo y la expresión de HSP72 en respuesta al choque térmico implica una condición de pre-activación que otros han atribuido a co-activadores de la respuesta al choque térmico (HSR por sus siglas en inglés) (Westerheide and Morimoto 2005). Nuestros intentos para inducir la pre-activación de la HSR con la incubación de PBMNCs con ácido acetil salicílico (10 μ M) *in vitro*, no reprodujo el efecto de pre-activación instalado *in vivo*, lo que ratifica la idea de que la co-activación con ácido acetil salicílico evoca otras señales en el animal íntegro. Un intento por explicar la pre-activación del HSR, se basa en el hecho de que el ácido acetil salicílico y los salicilatos han sido reportados, por otros autores como inductores de estrés oxidante (Yokoyama, Horie et al. 1995; Chung, Bae et al. 2003), por lo que se probó el efecto de la combinación de ácido acetil salicílico con H₂O₂. El ácido acetil salicílico adicionado a las PBMNCs incubadas *in vitro*, no promueve una más rápida expresión de HSP72 al someter a estas células a un choque térmico, a menos que las PBMNCs fueran sometidas a un segundo inductor como H₂O₂ (Figura 6). La adición de H₂O₂ seguido de un choque térmico, mostró una débil expresión de HSP72, lo que indica que el efecto del ácido acetil salicílico podría estar mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS) como H₂O₂ o alguna otra. La idea de que los ROS y H₂O₂ en particular, podrían servir como mediadores o segundos mensajeros de los efectos del ácido acetil salicílico ha sido postulado por otros autores (Scandalios 2005). Posiblemente la administración de ácido acetil salicílico *in vivo*, podría promover la generación de

H₂O₂ o algunos otros precursores de radicales libres o especies reactivas del nitrógeno (NOS).

Conclusiones

- La administración de ácido acetil salicílico a ratas altera el mecanismo de expresión de HSP72 de tal manera que este es más eficiente en respuesta a un choque térmico *in vitro*.
- El hecho de que el ácido acetil salicílico *in vitro* por sí solo no induce este efecto de pre activación implica que *in vivo* otras señales son requeridas.
- La pre activación puede ser reproducida *in vitro* con la combinación de ácido acetil salicílico más H₂O₂.
- Nuestros resultados apuntan a la idea de que este tipo de compuestos (H₂O₂, ROS, NOS, etc...) se producen *in vivo* en respuesta al ácido acetil salicílico y que estas pueden desempeñar un papel importante en la antes mencionada activación de los mecanismos de citoprotectoras como la HSR.

Bibliografía

Amici, C., A. Rossi, et al. (1995). "Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the heat shock response." Cancer Res **55**(19): 4452-4457.

- Arias, A. E., C. S. Velez-Granell, et al. (1994). "Involvement of molecular chaperones in the aberrant aggregation of secretory proteins in pancreatic acinar cells." Exp Cell Res **215**(1): 1-8.
- Boelsterli, U. A., M. R. Redinbo, et al. (2013). "Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: underlying mechanisms and novel strategies." Toxicol Sci **131**(2): 654-667.
- Borkan, S. C., A. Emami, et al. (1993). "Heat stress protein-associated cytoprotection of inner medullary collecting duct cells from rat kidney." Am J Physiol **265**(3 Pt 2): F333-341.
- Boy-Marcotte, E., G. Lagniel, et al. (1999). "The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons." Mol Microbiol **33**(2): 274-283.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Buchner, J. (1996). "Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones." FASEB J **10**(1): 10-19.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3): 351-366.
- Calabrese, V., M. Renis, et al. (1996). "Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat." Free Radic Biol Med **20**(3): 391-397.

- Cechetto, J. D., B. J. Soltys, et al. (2000). "Localization of mitochondrial 60-kD heat shock chaperonin protein (Hsp60) in pituitary growth hormone secretory granules and pancreatic zymogen granules." J Histochem Cytochem **48**(1): 45-56.
- Clos, J., J. T. Westwood, et al. (1990). "Molecular cloning and expression of a hexameric Drosophila heat shock factor subject to negative regulation." Cell **63**(5): 1085-1097.
- Craig, E. A. and C. A. Gross (1991). "Is hsp70 the cellular thermometer?" Trends Biochem Sci **16**(4): 135-140.
- Cuervo, A. M., E. S. Wong, et al. (2010). "Protein degradation, aggregation, and misfolding." Mov Disord **25 Suppl 1**: S49-54.
- Cunniff, N. F., J. Wagner, et al. (1991). "Modular recognition of 5-base-pair DNA sequence motifs by human heat shock transcription factor." Mol Cell Biol **11**(7): 3504-3514.
- Czyz, M. and C. Watala (2005). "[Aspirin--the prodigious panacea? Molecular mechanisms of the action of acetylsalicylic acid in the organism]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **59**: 105-115.
- Chen, Z. C., W. S. Wu, et al. (2009). "Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke." BMC Neurosci **10**: 111.
- Chung, Y. M., Y. S. Bae, et al. (2003). "Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis." Free Radic Biol Med **34**(4): 434-442.

- de Pina, M. Z., H. Vazquez-Meza, et al. (2008). "Signaling the signal, cyclic AMP-dependent protein kinase inhibition by insulin-formed H₂O₂ and reactivation by thioredoxin." J Biol Chem **283**(18): 12373-12386.
- Elwood, P. C. (2001). "Aspirin: past, present and future." Clin Med **1**(2): 132-137.
- Essig, D. A., D. R. Borger, et al. (1997). "Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions." Am J Physiol **272**(1 Pt 1): C59-67.
- Fawcett, T. W., Q. Xu, et al. (1997). "Potentiation of heat stress-induced hsp70 expression in vivo by aspirin." Cell Stress Chaperones **2**(2): 104-109.
- Feng, X., S. Bonni, et al. (2006). "HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha receptor-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **26**(24): 9244-9255.
- Flynn, G. C., J. Pohl, et al. (1991). "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP." Nature **353**(6346): 726-730.
- Gill, R. R., C. J. Gbur, Jr., et al. (1998). "Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **30**(12): 2739-2749.
- Grossman, A. D., J. W. Erickson, et al. (1984). "The htpR gene product of E. coli is a sigma factor for heat-shock promoters." Cell **38**(2): 383-390.
- Heads, R. J., D. M. Yellon, et al. (1995). "Differential cytoprotection against heat stress or hypoxia following expression of specific stress protein genes in myogenic cells." J Mol Cell Cardiol **27**(8): 1669-1678.

- Hightower, L. E. (1991). "Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity." Cell **66**(2): 191-197.
- Horowitz, M. and S. D. Robinson (2007). "Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions." Prog Brain Res **162**: 433-446.
- Housby, J. N., C. M. Cahill, et al. (1999). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes." Cytokine **11**(5): 347-358.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." Cancer Res **56**(2): 273-279.
- Jakob, U., M. Gaestel, et al. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones." J Biol Chem **268**(3): 1517-1520.
- Jakobsen, B. K. and H. R. Pelham (1988). "Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo." Mol Cell Biol **8**(11): 5040-5042.
- Jurivich, D. A., L. Sistonen, et al. (1992). "Effect of sodium salicylate on the human heat shock response." Science **255**(5049): 1243-1245.
- Kawazoe, Y., A. Nakai, et al. (1998). "Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family." Eur J Biochem **255**(2): 356-362.
- Kawazoe, Y., M. Tanabe, et al. (1999). "HSF3 is a major heat shock responsive factor during chicken embryonic development." Eur J Biochem **265**(2): 688-697.

- Klemenz, R., E. Frohli, et al. (1991). "Alpha B-crystallin is a small heat shock protein." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3652-3656.
- Klose, M. K. and R. M. Robertson (2004). "Stress-induced thermoprotection of neuromuscular transmission." Integr Comp Biol **44**(1): 14-20.
- Kobayashi, N. and K. McEntee (1990). "Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6550-6554.
- Kobayashi, N. and K. McEntee (1993). "Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **13**(1): 248-256.
- Leppa, S. and L. Sistonen (1997). "Heat shock response--pathophysiological implications." Ann Med **29**(1): 73-78.
- Liu, E., L. C. Sakoda, et al. (2005). "Aspirin use and risk of biliary tract cancer: a population-based study in Shanghai, China." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(5): 1315-1318.
- Ma, S. M., J. W. Li, et al. (2009). "Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase." Science **326**(5952): 589-592.
- Mager, W. H. and A. J. De Kruijff (1995). "Stress-induced transcriptional activation." Microbiol Rev **59**(3): 506-531.
- McCarty, M. F. and K. I. Block (2006). "Preadministration of high-dose salicylates, suppressors of NF-kappaB activation, may increase the chemosensitivity of many cancers: an example of proapoptotic signal modulation therapy." Integr Cancer Ther **5**(3): 252-268.

- Minisini, M. P., S. Kantengwa, et al. (1994). "DNA damage and stress protein synthesis induced by oxidative stress proceed independently in the human premonocytic line U937." Mutat Res **315**(2): 169-179.
- Minowada, G. and W. J. Welch (1995). "Clinical implications of the stress response." J Clin Invest **95**(1): 3-12.
- Morimoto, R. I. (1993). "Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes." Science **259**(5100): 1409-1410.
- Morimoto, R. I., P. E. Kroeger, et al. (1996). "The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions." EXS **77**: 139-163.
- Morimoto, R. I., K. D. Sarge, et al. (1992). "Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses." J Biol Chem **267**(31): 21987-21990.
- Mosser, D. D., A. W. Caron, et al. (1997). "Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis." Mol Cell Biol **17**(9): 5317-5327.
- Mosser, D. D., S. Ho, et al. (2004). "Saccharomyces cerevisiae Hsp104 enhances the chaperone capacity of human cells and inhibits heat stress-induced proapoptotic signaling." Biochemistry **43**(25): 8107-8115.
- Nakahara, T., R. Hunter, et al. (2006). "Alcohol alters skeletal muscle heat shock protein gene expression in rats: these effects are moderated by sex, raised endogenous acetaldehyde, and starvation." Metabolism **55**(7): 843-851.

- Nakai, A. and R. I. Morimoto (1993). "Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway." Mol Cell Biol **13**(4): 1983-1997.
- Newman, A. E., M. Foerster, et al. (2003). "Stress-induced thermotolerance of ventilatory motor pattern generation in the locust, *Locusta migratoria*." J Insect Physiol **49**(11): 1039-1047.
- Panerai, A. E., L. Locatelli, et al. (1993). "Inhibitory effect of NSAIDs on the chemotaxis induced by substance P on human monocytes and polymorphonuclear cells." Ann Ist Super Sanita **29**(3): 375-377.
- Paul-Clark, M. J., T. Van Cao, et al. (2004). "15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation." J Exp Med **200**(1): 69-78.
- Pelham, H. R. (1989). "Heat shock and the sorting of luminal ER proteins." EMBO J **8**(11): 3171-3176.
- Rallu, M., M. Loones, et al. (1997). "Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2392-2397.
- Ridker, P. M., N. R. Cook, et al. (2005). "A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women." N Engl J Med **352**(13): 1293-1304.
- Ridker, P. M., M. Cushman, et al. (1997). "Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men." N Engl J Med **336**(14): 973-979.
- Rinsema, T. J. (1999). "One hundred years of aspirin." Med Hist **43**(4): 502-507.

- Rodondi, N., J. Cornuz, et al. (2005). "Aspirin for the primary prevention of cardiovascular disease: a comprehensive review." Compr Ther **31**(3): 186-193.
- Sabbah, M., C. Radanyi, et al. (1996). "The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA." Biochem J **314 (Pt 1)**: 205-213.
- Sanchez, E. R. (2012). "Chaperoning steroidal physiology: lessons from mouse genetic models of Hsp90 and its cochaperones." Biochim Biophys Acta **1823**(3): 722-729.
- Sandoval-Montiel, A. A. (2004). Participacion de las proteinas de choque termico HSP70 durante el daño oxidativo inducido con etanol y modificado por antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en linfocitos de rata. Mexico DF, UNAM. **Maestria en Ciencias Biológicas.**
- Scandalios, J. G. (2005). "Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses." Braz J Med Biol Res **38**(7): 995-1014.
- Scharf, K. D., S. Rose, et al. (1990). "Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF." EMBO J **9**(13): 4495-4501.
- Schorr, K. (2003). "Antithrombotic drugs in vascular medicine: a historical perspective." Semin Vasc Med **3**(2): 97-105.

- Schuetz, T. J., G. J. Gallo, et al. (1991). "Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 6911-6915.
- Selvan, S., P. S. Grewal, et al. (1996). "Heat shock enhances thermotolerance of infective juvenile insect-parasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae)." Experientia **52**(7): 727-730.
- Silva, A. M., D. Wang, et al. (2007). "Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner." J Biol Chem **282**(14): 10164-10171.
- Sistonen, L., K. D. Sarge, et al. (1994). "Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription." Mol Cell Biol **14**(3): 2087-2099.
- Smith, D. F., L. Whitesell, et al. (1998). "Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention." Pharmacol Rev **50**(4): 493-514.
- Sneider, W. (2000). "The discovery of aspirin: a reappraisal." BMJ **321**(7276): 1591-1594.
- Somasundaram, S., G. Sigthorsson, et al. (2000). "Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat." Aliment Pharmacol Ther **14**(5): 639-650.
- Soncin, F. and S. K. Calderwood (1996). "Reciprocal effects of pro-inflammatory stimuli and anti-inflammatory drugs on the activity of heat shock factor-1 in human monocytes." Biochem Biophys Res Commun **229**(2): 479-484.

- Sorger, P. K. and H. R. Pelham (1988). "Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation." Cell **54**(6): 855-864.
- Stein, P. C., T. J. Ha, et al. (2001). "Estrogenic regulation of HSP90 kD synthesis in rat urinary bladder." Urol Res **29**(5): 338-344.
- Tanabe, M., Y. Kawazoe, et al. (1998). "Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance." EMBO J **17**(6): 1750-1758.
- Thomas, G. H. and S. C. Elgin (1988). "Protein/DNA architecture of the DNase I hypersensitive region of the Drosophila hsp26 promoter." EMBO J **7**(7): 2191-2201.
- Tohgi, H., S. Konno, et al. (1992). "Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin." Stroke **23**(10): 1400-1403.
- Vainio, H. and G. Morgan (1997). "Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug." Pharmacol Toxicol **81**(4): 151-152.
- Valcu, C. M., C. Lalanne, et al. (2008). "Heat induced changes in protein expression profiles of Norway spruce (*Picea abies*) ecotypes from different elevations." Proteomics **8**(20): 4287-4302.
- Vane, J. R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-235.
- Vane, J. R. and R. M. Botting (2003). "The mechanism of action of aspirin." Thromb Res **110**(5-6): 255-258.

- Velez-Granell, C. S., A. E. Arias, et al. (1994). "Molecular chaperones in pancreatic tissue: the presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells." J Cell Sci **107 (Pt 3)**: 539-549.
- Vissers, J. H., F. Nicassio, et al. (2008). "The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs." Cell Div **3**: 8.
- Warner, T. D. and J. A. Mitchell (2002). "Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum?" Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13371-13373.
- Welch, W. J. (1992). "Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease." Physiol Rev **72**(4): 1063-1081.
- Westerheide, S. D. and R. I. Morimoto (2005). "Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation." J Biol Chem **280**(39): 33097-33100.
- Wiederrecht, G., D. Seto, et al. (1988). "Isolation of the gene encoding the S. cerevisiae heat shock transcription factor." Cell **54**(6): 841-853.
- Wong, H. R. (1999). "Heat shock proteins. Facts, thoughts, and dreams. A. De Maio. Shock 11:1-12, 1999." Shock **12**(4): 323-325.
- Xiao, H., O. Perisic, et al. (1991). "Cooperative binding of Drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit." Cell **64**(3): 585-593.
- Yenari, M. A., R. G. Giffard, et al. (1999). "The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70)." Mol Med Today **5**(12): 525-531.

- Yokoyama, H., T. Horie, et al. (1995). "Oxidative stress in isolated rat hepatocytes during naproxen metabolism." Biochem Pharmacol **49**(7): 991-996.
- Zandi, P. P., J. C. Anthony, et al. (2002). "Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study." Neurology **59**(6): 880-886.
- Zentella de Pina, M., A. Sandoval-Montiel, et al. (2007). "Ethanol-mediated oxidative changes in blood lipids and proteins are reversed by aspirin-like drugs." Arch Med Res **38**(3): 269-275.
- Zimarino, V., C. Tsai, et al. (1990). "Complex modes of heat shock factor activation." Mol Cell Biol **10**(2): 752-759.

Anexos

HSP-72 Accelerated Expression in Mononuclear Cells Induced *In Vivo* by Acetyl Salicylic Acid Can Be Reproduced *In Vitro* when Combined with H₂O₂

Alvaro A. Sandoval-Montiel^{1,2}, Martha Zentella-de-Piña³, José L. Ventura-Gallegos¹, Susana Frías-González¹, Ambar López-Macay⁴, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2*}

1 Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México, **2** Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F., México, **3** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México, **4** Laboratorio de Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación, México D.F., México

Abstract

Background: Among NSAIDs acetyl salicylic acid remains as a valuable tool because of the variety of benefic prophylactic and therapeutic effects. Nevertheless, the molecular bases for these responses have not been complete understood. We explored the effect of acetyl salicylic acid on the heat shock response.

Results: Peripheral blood mononuclear cells from rats challenged with acetyl salicylic acid presented a faster kinetics of expression of HSP-72 messenger RNA and protein in response to *in vitro* heat shock. This effect reaches its maximum 2 h after treatment and disappeared after 5 h. On isolated peripheral blood mononuclear cells from untreated rats, incubation with acetyl salicylic acid was ineffective to produce priming, but this effect was mimicked when the cells were incubated with the combination of H₂O₂+ ASA.

Conclusions: Administration of acetyl salicylic acid to rats alters HSP-72 expression mechanism in a way that it becomes more efficient in response to *in vitro* heat shock. The fact that *in vitro* acetyl salicylic acid alone did not induce this priming effect implies that *in vivo* other signals are required. Priming could be reproduced *in vitro* with the combination of acetyl salicylic acid+H₂O₂.

Citation: Sandoval-Montiel AA, Zentella-de-Piña M, Ventura-Gallegos JL, Frías-González S, López-Macay A, et al. (2013) HSP-72 Accelerated Expression in Mononuclear Cells Induced *In Vivo* by Acetyl Salicylic Acid Can Be Reproduced *In Vitro* when Combined with H₂O₂. PLoS ONE 8(6): e65449. doi:10.1371/journal.pone.0065449

Editor: Vladimir N. Uversky, University of South Florida College of Medicine, United States of America

Received: March 28, 2011; **Accepted:** April 30, 2013; **Published:** June 6, 2013

Copyright: © 2013 Sandoval-Montiel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by DGAPA-UNAM grant IN 229607 and CONACyT-México grants 45519-M and 45003-M. ASM was supported by a doctoral fellowship from CONACyT-México, the Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM and Comecyt. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: azentell@biomedicas.unam.mx

Introduction

The response of all eukaryotic organisms to thermal, environmental, and physiological stress involves the rapid production of a group of proteins denominated Heat shock proteins (HSPs) [1]. At the molecular level, the heat-shock response is a transient reprogramming of cellular activities featuring robust synthesis of HSPs, concomitant with cessation of normal protein synthesis [2]. HSPs are highly conserved Adenosine triphosphate (ATP)ases, which are ubiquitous and abundant in nearly all sub-cellular compartments. They are divided into different families according to their molecular size (i.e., HSP-100, -90, -70, -60, -40, and small HSPs). Among them, HSP-72 is the first to be expressed and consequently serves as an indicator of the speed and the strength of the heat shock response (HSR).

In mammalian cells, HSPs function as molecular chaperones and are essential for correct folding, assembly, and intracellular translocation of proteins, as well as for cell signaling. Some HSPs have constitutive forms, such as HSP-90 or -73, while other forms are inducible, such as HSP-72 [3]. At the transcription level,

expressions of the inducible forms of HSPs in the adult are orchestrated by the Heat shock transcription factor (HSF-1) [4].

The heat shock response has been described as an ordered genetic response to diverse environmental and physiological stressors that results in the immediate induction of genes encoding molecular chaperones, proteases, and other proteins that confer protection and facilitate recovery from cellular damage associated with the expression of misfolded proteins [5].

Recently, several pharmacological compounds that can induce or enhance induction of HSP synthesis have been identified, among them Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been found to potentiate heat shock response [6,7]. These inductive effects of NSAIDs have been associated to the activation of HSF1 [8,9,10,11,12]. Administration of ASA *in vivo* protects against oxidative damage and elicits other physiological benefits; however, the biochemical and molecular mechanisms involved in these effects are not completely understood [13,14,15]. Previous reports from our group have found that *in vivo* ASA treatment reverts some biochemical markers of oxidative damage [13],

suggesting the activation of a general cytoprotective mechanism. Indomethacin treatment followed by heat shock in HeLa cells activates HSF1 and confers cytoprotection against lethal heat shock [7].

There is evidence that other NSAIDs, such as naproxen, can cause oxidative stress [16]. In addition, it has been shown that ASA (10 μ M) can generate H₂O₂ in rat adipose tissue, reaching a final concentration of 1 μ M (unpublished personal communication from Zentella de Piña M, (May 2009)). It has also been reported that orogastric administration of ASA provides cytoprotection of rat lymphocytes against oxidizing agents [13], reversing some indicators of oxidative stress such as thiobarbituric acid reactive substances and protein carbonylation. Here, we have shown that the orogastric administration of ASA (45 mg/kg of body weight) to rats can prime isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for faster kinetics of Heat Shock induced HSP-72. We also describe that *in vitro* incubation of PBMCs with H₂O₂ (5 μ M) in combination with ASA (10 μ M) can reproduce the accelerated expression of HSP-72 observed in PBMCs of ASA-treated rats.

Results

When the content of HSP-72 in PBMCs from rats challenged with ASA (45 mg/kg bw) was evaluated no detectable expression of HSP-72 was observed, lanes marked with the X in Figures 1A and 1B. In all cases, the PBMCs were subjected to a heat shock (42°C for 45 min). HSP-72 content was assessed immediately after heat shock (HS) or 1 or 2 h later at 37°C. Immediately after HS, HSP-72 was detected only in cells from ASA challenged rats (lanes marked with \surd). When we compared HSP-72 expression 1 h after heat shock 70% higher content was observed compared to control cells 1 h after heat shock. This increased remained after 2, 3, and 5 h ASA challenge (83, 52, and 61% respectively). These results indicate that ASA administration *in vivo* primes HSP-72 expression in PBMCs subjected to an *in vitro* heat shock.

HSP-72 mRNA content was studied through RT-PCR in cells from challenged animals following *in vitro* HS. Amplification products, were detected only from heat shock-subjected cells (Figure 1C), both in cells from control animals and those treated with ASA. However, in ASA-treated cells, the amount of HSP-72 PCR product immediately after HS was 65% higher compared with that found in control cells. These results indicated that the priming effect can also be observed at mRNA level.

Next we compared the priming effect of the ASA+H₂O₂ combination applied *in vitro* to that observed with the priming effect induced *in vivo* on PBMCs from ASA-challenged animals (45 mg/kg). The most significant effect was the accelerated expression of HSP-72 following *in vitro* heat shock when cells were pretreated with the ASA+H₂O₂ combination (lane 6 compared with lane 2 in Figure 2A). This accelerated expression of HSP-72 continued to be observed after 1 h following heat shock and disappearance after 2 h (Figure 2B).

We followed HSP-72 mRNA content in PBMCs incubated with the ASA+H₂O₂ combination following *in vitro* heat shock using RT-PCR. HSP-72 amplification products were detected only from cells subjected to heat shock, when cells were pre-incubated with the combination (Figure 2C). These experiments indicates that the priming effect on HSP-72 expression following heat shock can be induced *in vitro* when PBMCs are pre-incubated with ASA+H₂O₂ and requires heat shock for its transcriptional activation.

We evaluate the presence of the transcription factor HSF-1 in the nucleus of ASA-challenged rat PBMCs by EMSA analysis. Figure 3A shows the result of *in vivo* experiments. Cells from control animals that received no ASA treatment (Control) show no

DNA binding activity before heat shock, however, following heat shock a DNA/protein complex (Complex I) of moderate intensity was observed which was sustained for the next 2 h at 37°C. A strong signal for this DNA/protein complex was present in nuclear extracts from PBMCs from rats challenged with ASA for 1 h (lane mark with \surd), compared with control. It is important to note that this increase in HSF-1/DNA-binding activity was induced without the need of heat shock. At the end of heat shock DNA the binding activity fell and remained unchanged for the next 2 hours later at 37°C. We conclude that ASA treatment *in vivo* promotes DNA binding capacity of HSF-1 to DNA.

Since the combination ASA+H₂O₂ led to a faster expression of HSP-72 *in vitro* in response to heat shock, we evaluated the effect of this combination on HSF-1/DNA binding activity (Figure 3B). AS expected following heat shock (HS) we observed a small increase in the signal of complexes I and II (lanes 1 and 2). H₂O₂ led to decrease in the signal of both complexes under unstimulated conditions and also decreased the signal following heat shock (lanes 3 and 4). ASA alone led to a decrease of the signal of complex I but did not affect complex II (lane 5) and had no significant effect on the increased signal of complex I following heat shock (lane 6). While the combination of ASA+H₂O₂ produced a small increase in the signal of complex I (lane 7), the strongest signal of this complex was observed with the combination of heat shock+ASA+H₂O₂ corresponding to a 20% increase with respect to the untreated control (lane 8). Consequently, this result leads us to conclude that the combination of ASA+H₂O₂ *in vitro* promotes a very weak DNA-binding activity of HSF-1. It should be noted that the changes in complex II not always reflect the behavior of complex I.

Discussion

The wide clinical benefit of ASA's interference with inflammation and provision of analgesic effects has been extended to prevention of cardiovascular diseases, sustained pregnancy, and reduction in the risk of development of Alzheimer disease and colon cancer [14,15,16,17,18]. In addition to interference with cyclo-oxygenases I and II, ASA has been shown to modulate Nitric oxide (NO)-synthase, NF- κ B signaling, and ATP metabolism, and to induce generation of H₂O₂, oxidative stress, and apoptosis. On the other hand, overexpression of HSP-72 exerts a cytoprotective effect in a variety of cellular systems [19,20,21]. In this study, we describe a link between ASA treatment and the efficiency of HSP-72 expression following heat shock in PBMCs in an *in vivo* model. This priming effect could be mimicked *in vitro* with the combination of ASA (10 μ M) and H₂O₂ (5 μ M) followed by heat shock.

Previous studies performed *in vitro* have shown that NSAIDs such SS and Indomethacin can activate DNA binding activity of HSF-1 in tumor cell lines such as HeLa cells without an increased in HSF1-dependent transcription of HSP-72 at supra-pharmacological concentrations (SS from 2 to 30 mM and Indomethacin from 100 to 1000 μ M) [6,7,11,12] our results confirm these effects of ASA on HSF-1 activation without transcription activity. We extend the implications of this response by describing it in primary cell (PBMCs) both *in vivo* and *in vitro*, in addition our model responded at pharmacological doses of ASA (10 μ M). Furthermore we were able to mimic this effect *in vitro* on PBMCs by combining heat shock ASA with H₂O₂. Considering that *in vivo*, PBMCs are a primary target of pharmacological doses of ASA administration, our experimental model could serve to further explorer the *in vivo* mechanism linked to cytoprotection and other benefic effects of ASA and NSAIDs in general.

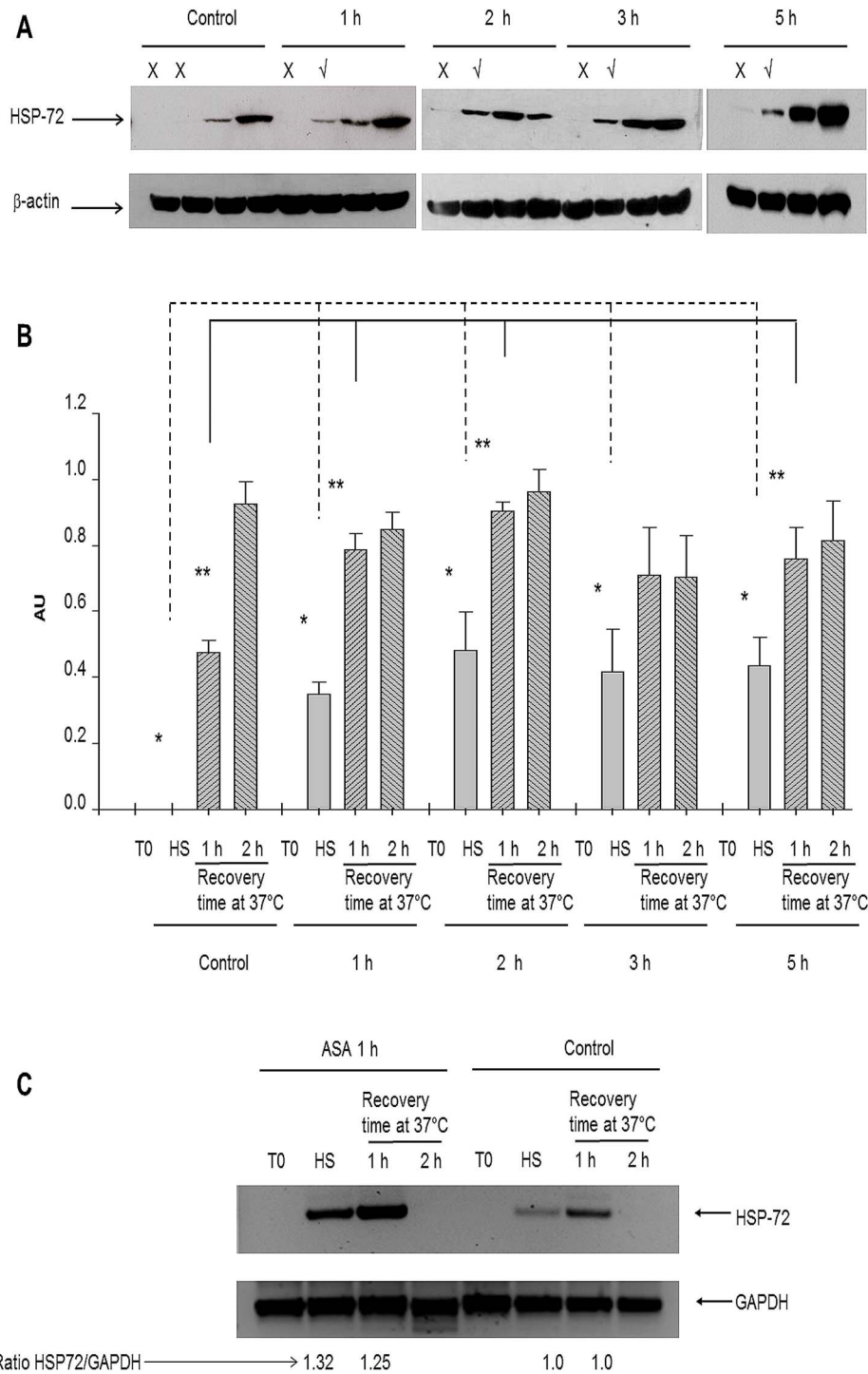
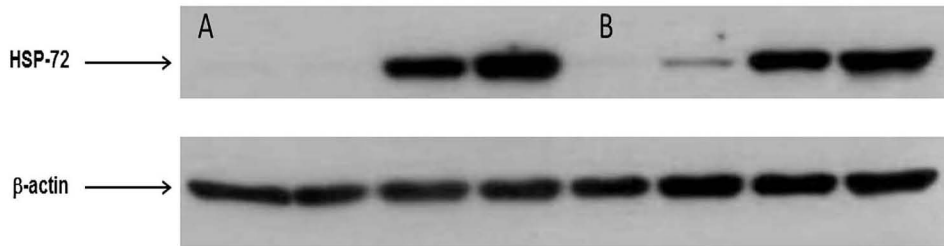


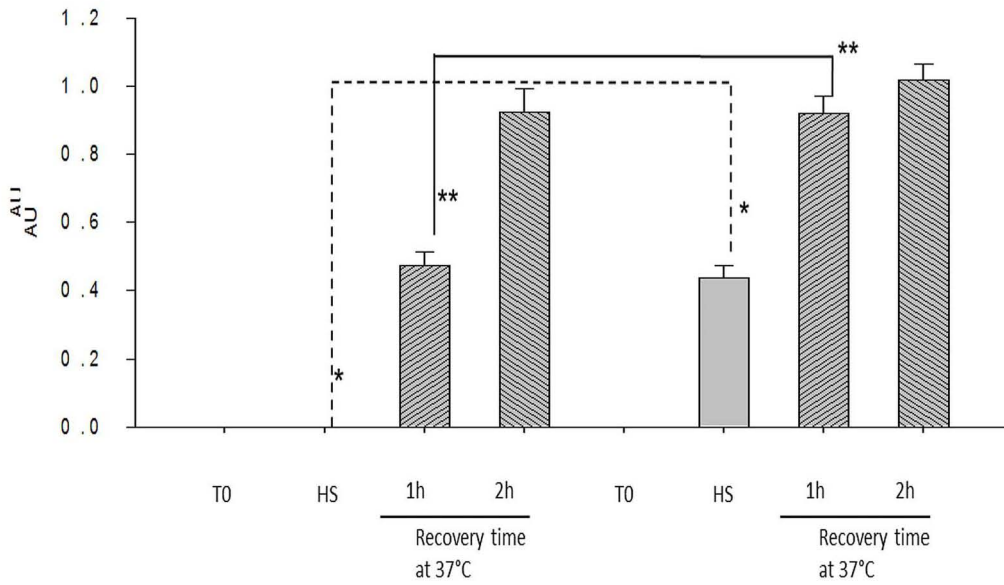
Figure 1. Time course of changes in HSP-72 expression before (T0), immediately after heat shock (HS) and 1 (1 h) and 2 (2 h) hours after recovery at 37°C in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from rats, treated with or without acetylsalicylic acid (ASA 45 mg/kg of body weight). Cells were isolated 1, 2; 3, or 5 h after administration of ASA and subjected to heat shock protocol. Cells from untreated animals served as controls. 100 µg of total protein was placed per lane. A) Representative Western blots corresponding to cells from control animals or from rats challenged with ASA for 1, 2, 3, or 5 h. B) Histogram of the average signals expressed as Arbitrary Units (AU = OD for HSP-72/OD for β-actin) from three independent experiments. *Comparison of HSP-72 content immediately after heat shock between cells from ASA-challenged rats (for 1, 2, 3, or 5 h) or without it (control) ($n = 3$) ($p < 0.05$). **A similar comparison 1 h after heat shock ($n = 3$) ($p < 0.05$). *t*-student test was used. C) RT-PCR for HSP-72 mRNA content in PBMCs from rats with or without ASA treatment. PBMCs were obtained 1 h after ASA challenge and subjected to in vitro to heat shock. Total RNA was obtained immediately after heat shock. Products of RT-PCR were resolve in agarose gels. The numbers indicate the normalized band intensity (HSP-72/GAPDH). doi:10.1371/journal.pone.0065449.g001

A

ASA + H ₂ O ₂	-	-	-	-	+	+	+	+
Heat shock	-	+	+	+	-	+	+	+
	T0	HS	1h	2h	T0	HS	1h	2h
			37°C				37°C	



B



C

H ₂ O ₂ 5 mM	-	-	+	+	-	-	+	+
ASA 10 mM	-	-	-	-	+	+	+	+
Heat shock	-	+	-	+	-	+	-	+

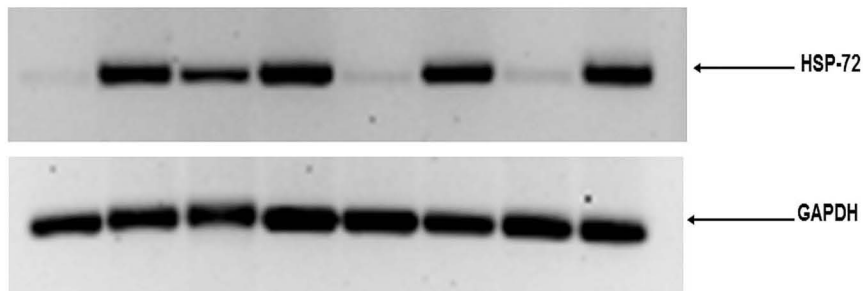


Figure 2. Time course of changes in HSP-72 expression before (T0), immediately after heat shock (HS) and 1 (1 h) and 2 (2 h) hours after recovery at 37°C in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from untreated rats incubated with or without the combination ASA (10 μ M)+H₂O₂ (5 μ M). A) Western blots of HSP-72 from rat PBMCs (100 μ g of total protein) incubated with (+) or without (-) the indicated treatments for 1 h before heat shock, β -actin was used as loading control. Protein extracts were obtained before *in vitro* incubation (T0), or immediately after Heat shock (HS) or 1 (1 h) and 2 (2 h) hours after recovery at 37°C. B) Histogram of the average signals expressed as Arbitrary units (AU) = OD for HSP-72/OD for β -actin from three independent experiments. *Comparison of HSP-72 content immediately after heat shock between cells without any treatment and those incubated with the combination ASA+H₂O₂ ($n=3$) ($p<0.001$). **Comparison of cells incubated 1 h after heat shock without any treatment and those incubated with the combination ASA+H₂O₂ ($n=3$) ($p<0.001$). C) RT-PCR of HSP-72 mRNA from PBMCs treated *in vitro* with the combination ASA+H₂O₂ following heat shock. Total RNA was obtained immediately after heat shock. Products of RT-PCR were resolved in agarose gels.

doi:10.1371/journal.pone.0065449.g002

Experiments *in vivo*

Priming of HSP-72 expression installed *in vivo* on PBMCs by ASA administration reached a maximal effect 2 h after treatment and remained even after 5 h. This priming effect correlates with previous studies where *in vivo* ASA administration led to physiological protection against ethanol cytotoxicity, such as reduction of protein carbonylation in plasma and PBMCs, as well as in TBARS from PBMCs [13]. The kinetics of these transient effects *in vivo* could be related with the pharmacodynamics of acetylsalicylic acid [22]. It's interesting that the priming effect follows a similar kinetic pattern, been highest 2 hours after ASA challenge and disappearing after 5 hours.

In our study the effect of heat shock on expression of HSP-72 was tested by subjecting primary PBMCs from control or ASA-treated rats to an *in vitro* heat shock protocol. Our results suggest that ASA primes the heat shock response, which becomes fully active only after a second signal stress, such as *in vitro* heat shock. This study correlates with *in vivo* effects in central organs such as lung, liver, and kidney in ASA-treated animals [23]. Other studies in whole animals with ASA-treated rats have demonstrated metabolic effects in adipocytes [24]. Our results suggest that analyzing the effects of PBMCs could serve as an indicator of changes in central organs. To our knowledge, we are reporting for the first time that orogastric administration of ASA to rats primes PBMCs for HSP-72 expression. Lack of HSP-72 expression prior to heat shock could be important because, even at low levels, HSP-72 can affect diverse cellular processes, such as protein synthesis [25]. The EMSA of *in vivo* ASA treatment shows a 2 fold increase in the amount of HSF1 DNA-binding activity, suggesting an abundant amount of this transcription factor bound to chromatin in response to ASA. Interestingly, heat shock significantly decreased the amount of HSF1 resembling the levels found in cells from untreated animals (Figure 3A). It is possible that the abundant amount of HSF1 recruited to chromatin in response to ASA under *in vivo* conditions could explain the more efficient HSP72 expression both a mRNA and protein levels.

Experiments *in vitro*

The idea that ROS, and H₂O₂ in particular, could serve as ASA mediators or second messengers has been postulated previously [26,27,28,29]. In vascular endothelial cells, general stressors such as NO can promote translocation of HSF-1 to the nucleus [30]. Whether or not *in vivo* ASA promotes generation of H₂O₂ or some other ROS or NO precursors, our results support the notion that, *in vitro*, H₂O₂ in combination with ASA can mimic the priming effect induced by ASA *in vivo*.

ASA is recognized for mediating a variety of benefic effects *in vivo* that include a cytoprotective state, we have uncovered that ASA primes the efficiency of HSP-72 expression in response to heat shock, which could contribute to cytoprotection.

Materials and Methods

Chemicals

Bovine serum albumin and ASA were obtained from the Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). All remaining reagents were of the highest purity available. Bradford reagent was purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Animals

Male Wistar rats (200 g \pm 20 g, equivalent to 85 days) were fed a commercial diet (Nutricubos, Purina-Nestlé, Mexico City, Mexico), received water *ad libitum*, and were fasted for 16 h prior to treatment. The experimental animals were randomly divided into two groups and treated as follows: the control group received water through an orogastric tube and the experimental group received ASA through an orogastric tube (45 mg/kg Body weight [BW]). All animals were sacrificed 1, 2, 3 or 5 h after receiving ASA, blood samples were collected in heparinized tubes. This work was carried out following the rules under the Official Mexican Standards NOM-062-ZOO-1999 and the protocol was submitted to the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), which approved the experimental protocol (ID 47-2007) under the responsibility of Dr Martha Zentella-de-Piña.

Isolation of PBMCs

Immediately after obtaining the blood samples, PBMCs were isolated through a LymphoprepTM (Axis-Shield, PoC AS, Oslo Norway) gradient according to manufacturer indications. Briefly, 5 ml of blood was diluted with isotonic Phosphate buffer saline solution (PBS) (1:3). Nine ml of the diluted blood were added to a 15-ml conical tube containing 3 ml of LymphoprepTM. Diluted blood was added carefully to avoid mixing. After centrifugation at 1,800 \times g for 30 min, the fraction that contained the PBMCs was carefully absorbed and washed with PBS.

Heat Shock Protocol

The PBMCs were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and incubated at 42°C for 45 minutes. At the end of this heat shock, cells were allowed to recover by incubating them at 37°C for 2 hours. Aliquots were taken at different times, before heat shock (referred to as **T0**) immediately after heat shock (**HS**) or one (**1 h**) or two (**2 h**) hours after terminating heat shock (recovery time at 37°C). These aliquots were used for the extraction of total protein or total RNA for western blot or RT-PCR analysis.

Nuclear Protein Extraction

Protein was obtained according to a previously described protocol [4].

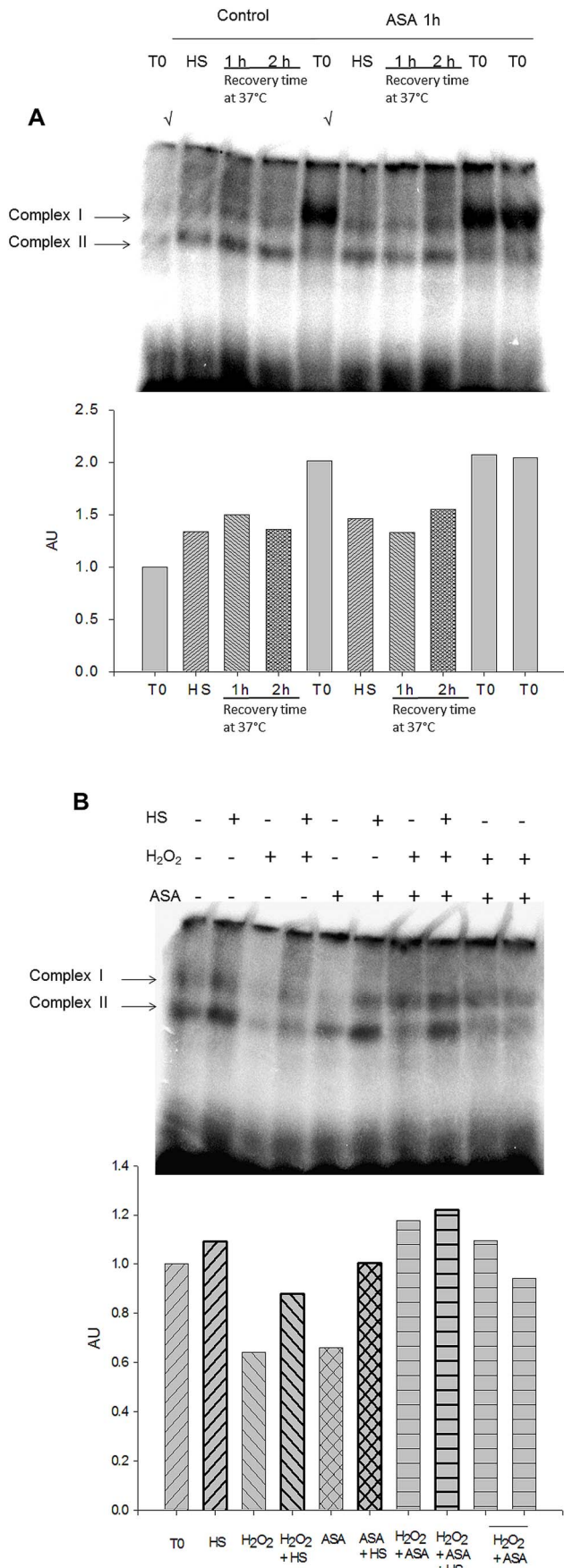


Figure 3. Time course of EMSAs of HSF1 before (T0), immediately after heat shock (HS) and 1 (1 h) and 2 (2 h) hours after recovery at 37°C from PBMCs. Nuclear extract protein was obtained and EMSA was performed with 10 µg of protein as described in the Materials and Methods. A) Nuclear extracts from PBMCs from control (Control) or ASA challenged rats (ASA 1 h) were analyzed at the indicated time points. B) Nuclear extracts from PBMCs from control animals received the indicated treatments *in vitro* 1 h before heat shock. DNA/protein complexes are labeled as: I and II. Histograms represent the relative amount of complex I under the different experimental conditions, normalized against control obtained at T0, both *in vivo* and *in vitro*. doi:10.1371/journal.pone.0065449.g003

Protein Determination

Protein was determined as described by Bradford using a commercial solution (Biorad) [31].

Extraction of Total RNA and RT-PCR RNA Assays

Total RNA was prepared from the PBMCs employing a commercial solution (Trizol™, Invitrogen). HSP-72 mRNA levels in the PBMCs were quantified by RT-PCR as previously described [32]. The amplification signal of HSP-72 was normalized with the amplification product for Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase mRNA (GAPDH), utilized as an endogenous internal standard. RT was performed on 1 µg of total RNA for 90 min at 42°C in a 5-µL reaction mixture containing 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L of the deoxynucleotides, 10 U avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), 10 U ribonuclease inhibitor (Roche Molecular Biochemicals), and 0.8 µg oligo (dT)₁₅ primer (Roche Molecular Biochemicals). RT was terminated by heating the sample at 95°C for 2 min.

Multiplexed PCR was carried out in a 20-µL reaction mixture containing 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 2% dimethyl sulfoxide, 0.2 mmol/L of each deoxynucleotide, 0.1 mmol/L each of 5' and 3' GAPDH-specific primers, 1 mmol/L each of 5' and 3', HSP-72, specific primers, 25 ng of reverse-transcribed total RNA, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals). HSP-72 sense primer: 5'GAGTCCTACGCCTTCAATATGAAG3'; HSP-72 antisense primer: 5'CATCAAGAGTCTGTCTCTAGCCAA3'. PCR amplification for HSP-72 was performed for 30 cycles, consisting of denaturation (94°C, 45 sec), annealing (60°C, 45 sec), and extension (72°C, 75 sec). After eight cycles (HSP-72), 0.1 mmol/L from each GAPDH primer was added to the reaction mixture and PCR cycles were continued. GAPDH sense primer: 5'CAGCAATGCATCCTGCAC3'; GAPDH antisense primer: 5'GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG3'. The PCR products were analyzed on 1% (w/v) agarose gels, stained with ethidium bromide, visualized with Ultraviolet (UV) trans-illumination, photographed, and submitted to image analysis.

Mobility Shift Assay

DNA mobility shift assays were performed by employing a self-annealing HSE oligonucleotide probe (5'CTAGAAGCTTCTA-GAAGCTTCTAG3') as previously described [33]. DNA-binding reaction mixtures contained 10 µg of nuclear protein extract. The relative amount of protein concentration in all samples was determined utilizing commercial Bradford assays. Nuclear protein-extract volumes were adjusted so that equal amounts of protein were added to each binding reaction mixture. Binding reactions were performed with 1 mg of poly (dI-dC), 10 mM Tris (pH 7.8), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 5% glycerol

in a final volume of 20 μ l. Reaction mixtures were incubated at room temperature for 20 min and immediately loaded onto a 7.5% non-denaturing polyacrylamide gels containing 6.7 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 3.3 mM sodium acetate. Gels were subjected to electrophoresis for 2.5 h at 150 V, dried, exposed to storage phosphor screen overnight, and revealed in a Typhoon 9400 (GE).

Western Blot

Total protein extracts were fractionated by Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10% acrylamide) and electro-blotted onto Polyvinylidene difluoride membranes (PVDF); the blots were blocked for 2 h at room temperature in TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 137 mM NaCl, 0.1% [vol/vol] Tween 20) supplemented with 5% milk powder. Antibodies were diluted in TBST (1:250 for anti-HSP-72 Ab). The blots were incubated in primary antibody for 2 h at room temperature. Blots were washed in TBST and incubated with the secondary Ab (horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Bio-Rad), and diluted 1:10,000 in TBST and 2.5% milk for 2 h at room temperature. Blots were washed, and proteins were visualized by chemiluminescence (Pierce). The

luminescent signal was recorded in an autoradiography film (XAR; Kodak).

Statistical Analysis

We used the SigmaStat 3.5 software for statistical analysis, statistical significance was established by applying the *t*-student test and significance was considered when P values were below 0.05.

Acknowledgments

We thank to Dr Enrique Piña for his support and critical reviews, to Enrique Moreno-Hernández, M.V.Z., for handling the experimental animals and to Maggie Brunner for editorial work. ALM is a graduate student of the Programa de Doctorado en Biología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ASM AZD MZP. Performed the experiments: ASM ALM JVG SFG. Analyzed the data: AZD ASM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MZP AZD. Wrote the paper: AZD ASM.

References

- Morimoto RI (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409–1410.
- Schoffl F, Prandl R, Reindl A (1998) Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol* 117: 1135–1141.
- Horowitz M, Robinson SD (2007) Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. *Prog Brain Res* 162: 433–446.
- Morimoto RI, Kroeger PE, Cotto JJ (1996) The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *EXS* 77: 139–163.
- Westerheide SD, Morimoto RI (2005) Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem* 280: 33097–33100.
- Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI (1992) Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 255: 1243–1245.
- Lee BS, Chen J, Angelidis C, Jurivich DA, Morimoto RI (1995) Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stress-induced cellular damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7207–7211.
- Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L (2002) Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 27: 619–627.
- Liu PC, Thiele DJ (1999) Modulation of human heat shock factor trimerization by the linker domain. *J Biol Chem* 274: 17219–17225.
- Soncin F, Zhang X, Chu B, Wang X, Asea A, et al. (2003) Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 700–706.
- Cotto JJ, Kline M, Morimoto RI (1996) Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem* 271: 3355–3358.
- Jurivich DA, Pachetti C, Qiu L, Welk JF (1995) Salicylate triggers heat shock factor differently than heat. *J Biol Chem* 270: 24489–24495.
- Zentella de Pina M, Sandoval-Montiel A, Serrano-Alessandri L, Montalvo-Jave E, Zentella-Dehesa A, et al. (2007) Ethanol-mediated oxidative changes in blood lipids and proteins are reversed by aspirin-like drugs. *Arch Med Res* 38: 269–275.
- Saito T, Rodger IW, Hu F, Robinson R, Huynh T, et al. (2004) Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 37: 71–77.
- Ulcova-Galova Z (2005) Antiphospholipid antibodies and reproductive failure. *Chem Immunol Allergy* 88: 139–149.
- Yokoyama H, Horie T, Awazu S (1995) Oxidative stress in isolated rat hepatocytes during naproxen metabolism. *Biochem Pharmacol* 49: 991–996.
- Liu E, Sakoda LC, Gao YT, Rashid A, Shen MC, et al. (2005) Aspirin use and risk of biliary tract cancer: a population-based study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1315–1318.
- Rodondi N, Cornuz J, Bauer DC (2005) Aspirin for the primary prevention of cardiovascular disease: a comprehensive review. *Compr Ther* 31: 186–193.
- Chong KY, Lai CC, Lille S, Chang C, Su CY (1998) Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol* 30: 599–608.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B (1997) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317–5327.
- Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK (1999) The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today* 5: 525–531.
- Mays DC, Sharp DE, Beach CA, Kershaw RA, Bianchine JR, et al. (1984) Improved method for the determination of aspirin and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography: applications to human and animal studies. *J Chromatogr* 311: 301–309.
- Fawcett TW, Xu Q, Holbrook NJ (1997) Potentiation of heat stress-induced hsp70 expression in vivo by aspirin. *Cell Stress Chaperones* 2: 104–109.
- de Zentella PM, Vazquez-Meza H, Pina-Zentella G, Pimentel L, Pina E (2002) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine- and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Pharm Pharmacol* 54: 577–582.
- Silva AM, Wang D, Komar AA, Castilho BA, Williams BR (2007) Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 282: 10164–10171.
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995–1014.
- Adachi M, Sakamoto H, Kawamura R, Wang W, Imai K, et al. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. *Histol Histopathol* 22: 437–442.
- Seo MS, Oh SY, Park MJ, Kim SM, Kim MY, et al. (2005) Implication of reactive oxygen species, ERK1/2, and p38MAPK in sodium salicylate-induced heat shock protein 72 expression in C6 glioma cells. *Int J Mol Med* 16: 841–849.
- Chung YM, Bae YS, Lee SY (2003) Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 34: 434–442.
- Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G (1997) Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest* 100: 1089–1097.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Nakahara T, Hunter R, Hirano M, Uchimura H, McArdle A, et al. (2006) Alcohol alters skeletal muscle heat shock protein gene expression in rats: these effects are moderated by sex, raised endogenous acetaldehyde, and starvation. *Metabolism* 55: 843–851.
- Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* 267: 21987–21990.