



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LOS
CITOCROMOS P450 2C11 Y 2J3 EN EL CEREBRO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Lic. en Biología y Química Mónica María Loaiza Zuluaga

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gohar Gevorgyan Markosian

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo.

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México, Septiembre 2019



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio C-206 del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Agradecimientos.

A México lindo y querido, por recibirme y aceptarme como extranjera; por hacerme sentir como una hija mexicana.

Al **posgrado de Ciencias Bioquímicas, a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, y a cada uno de los maestros que hicieron parte de mi formación académica.

Al **consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca que me otorgó durante los estudios de maestría (CVU 772921)

Al **programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por el apoyo que me concedieron para asistir al congreso de la SfN (Society for Neuroscience), que se realizó en Washington, DC en Noviembre de 2017.

A la **unidad de Modelos Biológicos del instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM** por proveer los animales, y a **Jorge Omar García Rebollar** por todo su apoyo en la asistencia técnica del manejo de los animales durante el proceso experimental.

Al **Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre** por aceptarme en su grupo de investigación. Por su apoyo, orientación y confianza. Gracias por las historias que me contaba para motivarme y no rendirme, agradezco mucho que me hubiera escuchado en esos momentos difíciles.

A los miembros del comité tutor **Dra. Gohar Gevorgyan Markosian** y el **Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo**, por sus críticas constructivas para mejorar el proyecto y fomentar el desarrollo de mi pensamiento crítico.

A los miembros del comité jurado para la obtención del grado, por la revisión de la tesis y hacer críticas muy constructivas para el desarrollo de ésta, **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dra. Aliesha González Arenas, Dra. Regina Montero Montoya, Dr. Oscar García Prospéro y Dra. Ana María Salazar Martínez.**

A la **Dra. Cynthia María Navarro Mabarak** por todo su apoyo teórico y experimental, por aclarar cada una de las dudas que iba presentando durante éste proceso. Gracias por guiarme y por compartir su conocimiento.

A la **Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda** por la asesoría técnica y el apoyo experimental, durante el desarrollo de éste trabajo. Por su paciencia, orientación y confianza.

A la **Dra. Tzipe Silvia Govezensky Zack** por el apoyo estadístico que me brindó durante la elaboración de éste trabajo.

A mis **compañeros de laboratorio C-206** por el apoyo técnico, por su comprensión, por compartir su conocimiento en los seminarios. Gracias por su confianza.

Dedicatorias.

Esnelia y Rosemberg, ustedes han sido mi fuente de apoyo y de inspiración en todo éste proceso. Gracias por su amor incondicional, por todo su esfuerzo y dedicación para conmigo. Gracias por escucharme y hacerme sentir desde la distancia que no estaba sola y que sus abrazos fraternos me llenaban de fuerza. Gracias por liberarme sonrisas en los momentos más difíciles, por creer en mí, cuando dejé de hacerlo. Por ustedes y para ustedes es éste logro, sin ustedes no estaría contando ésta bonita historia de uno de los capítulos de mi vida, ¡gracias! Los AMO, por siempre papás.

Para **Graciela**. Tía usted me ha enseñado que basta con tener el amor y la fuerza de voluntad para realizar lo que nos propongamos. Usted para mí es un ejemplo de mujer emprendedora y berraca en la vida. Gracias por apoyarme en todo momento, por las llamadas y los abrazos fuertes que me ha regalado cuando estoy de nuevo en la tierrita. Gracias por confiar en mí y apoyar a mis papás.

A **TODA MI FAMILIA** por el apoyo, y mensajes de cariño que me brindaron durante éste proceso. A mis primos **Luz Ángela, Sebastián y Lorena**, muchas gracias, los quiero.

Luz Dary, Don Abelino y Juan José, ustedes han sido un apoyo incondicional, gracias por hacerme sentir tan especial en sus vidas. Gracias también por ser mi familia.

Valen, gracias por su amistad incondicional, por soportar mis historias tristes y alegres en todo éste proceso. Por brindarme su apoyo en cada momento que necesité, gracias por estar siempre ahí gordita, por ser luz. Usted siempre me regañó, animó y felicitó en los momentos precisos, gracias por ser real en mi vida. Sus escalas en México siempre fueron felicidad para mí, gracias por los abrazos desde la distancia, y por animarme a no “tirar la toalla”, gracias por hacerme sentir que es mi hermana de la vida.

Nati, usted es un gran ser humano, gracias por brindarme una amistad de tantos años. Su apoyo ha sido incondicional y lo valoro. Gracias por escucharme en cada momento, por acompañarme a reír y abrazarme desde la distancia cuando

los momentos no fueron fáciles. Gracias por creer en mí y animarme, Dios siempre la bendiga.

Maryury, sus ánimos y video-llamadas me divertían mucho. Gracias por su apoyo, por escucharme y creer en mí. Gracias por su amistad.

Cynthia Maluca, usted ha sido una gran protagonista de ésta historia. Gracias por acompañarme en cada paso que di, por orientarme. Gracias por su infinita paciencia y creer en mí a pesar de cómo inicié éste proceso. El bullying positivo si sirvió! Ya ve? Le tengo gran respeto y admiración, usted merece siempre lo mejor. Siempre hay algo bueno después de un largo y arduo camino, y eso significa para mí que lo bueno no sólo fue éste objetivo, sino ganar una gran amiga. Gracias por las conversaciones acompañadas de un tintico, por su apoyo incondicional, por las bromas y los abrazos. Gracias por confiar en mí, por presentarme su familia y hacerme sentir que no estoy sola. Gracias por ser mi amiga, una amiga de aventuras, de gustos, de academia, una amiga de la vida. La quiero.

Anitla sus ánimos me hacían sentir más tranquila a pesar de las dificultades que tenía, gracias por escucharme y entenderme. **Laurel**, gracias por escucharme, bromear conmigo, y compartir de su cultura mexicana. **Sandy**, gracias por su apoyo, por hacerme sentir fuerte y subirme el ánimo cuando todo fue tan difícil. **Rebe**, gracias por escucharme, reír y bromear conmigo. **Raúl**, usted es una gran persona, gracias por los consejos y por escucharme camino a casa. A todos ustedes muchas gracias por acompañarme en éste proceso de formación académica y de la vida, gracias por su paciencia y por querer compartir gratos momentos con una colombiana maluca, que aprendió a sobrevivir sin las arepas, los quiero.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

I. Abreviaturas.....	9-10
II. Resumen.....	11-12-13
III. Antecedentes.....	13-14-15
IV. Introducción.....	16-30
1. Características generales de las familias de los citocromos P450.	
2. Cantidad de CYPs en el cerebro.	
3. CYPs epoxigenasas 2C y 2J y funciones de sus metabolitos: los EETs.	
4. Participación de CYPs epoxigenasas 2C y 2J en el metabolismo del ácido araquidónico.	
5. Los EETs en funciones anti-inflamatorias y su enzima metabolizadora: la sEH.	
6. Modulación en la expresión de los CYPs bajo el efecto del LPS.	
7. Efecto de LPS en células cerebrales.	
8. Moléculas activadas por el LPS, que desencadenan respuestas inflamatorias en cerebro.	
9. Regulación de CYPs mediante factores nucleares como NF- κ B.	
V. Planteamiento del problema.....	31
VI. Hipótesis.....	31
VII. Objetivo general.....	31
VIII. Objetivos particulares.....	31-32
IX. Estrategia experimental.....	33-34-35
1. Extracción de RNA.....	35
1.1 Homogenización.....	35
1.2 Separación de fases.....	35-36
1.3 Precipitación del RNA.....	36
1.4 Lavado del RNA.....	36-37
1.5 Redisolución del RNA.....	37
1.6 Cuantificación del RNA y medida de su pureza.....	37
1.7 Integridad del RNA.....	38
2. Síntesis de cDNA.....	39-40
3. Realización de las curvas para PCR.....	40-41
4. Obtención de proteína por el método de Trizol.....	41

4.1	Precipitación de proteínas.....	41
4.2	Lavado de proteínas.....	41-42
4.3	Solubilización de la proteína.....	42
4.4	Sonicación.....	42
4.5	Preparación de las muestras.....	42-43
4.6	Preparación de los geles.....	43-46
5	Detección de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β mediante kits de ELISA.....	46-47
6	Método de Análisis estadístico.....	48
X.	Resultados.....	48
1.	Evaluación de marcadores de neuroinflamación por Western Blot.....	48-51
2.	Cuantificación de la expresión transcripcional.....	51
2.1.	Cuantificación del RNA.....	51-52
2.2.	Integridad del RNA.....	53-54
2.3.	Expresión transcripcional de <i>Cyp2j3</i> y <i>Cyp2c11</i> por qRTPCR.....	54-56
3.	Cuantificación de los niveles de proteína de los CYP por Western Blot.....	56-59
4.	Cuantificación de las citocinas pro-inflamatorias.....	59-61
XI.	Análisis de resultados y Discusión.....	62-67
XII.	Conclusiones.....	68
XIII.	Bibliografía.....	69-72
XIV.	Anexo.....	73-76

I. Abreviaturas

AA: ácido araquidónico

AhR: receptor de hidrocarburos de arilo

BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero Bovino)

CAR: receptor constitutivo de androstano

CD14: cluster of differentiation 14

COX: ciclooxigenasas

CVO: órganos circunventriculares

CYP: citocromo P450

Cyp2c11: gen CYP2C11

CYP2C11: proteína CYP2C11

CYP2J: subfamilia de los citocromos P450

Cyp2j3: gen CYP2J3

CYP2J3: proteína CYP2J3

DHET: ácidos dihidroxieicosatrienóicos

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: deoxinucleósidos trifosfatos

EETs: ácidos epoxieicosatrienoicos

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: proteína gliofibrilar ácida

HETEs: ácidos hidroxieicosatetraenóicos

Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizada

IFNs: Interferones

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

LBP: proteína de unión al lipopolisacárido

LOX: lipoxigenasas

LPS: lipopolisacárido

M-MLVRT: transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

PAMP's: patrones moleculares asociados a patógenos

PLA2: fosfolipasa A2

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPAR- γ : receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma

PPAR- α : receptor de peroxisoma-proliferador-activado alfa

PXR: receptor X de pregnano

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RNA: ácido ribonucléico

SDS: dodecilsulfato sódico

EH: epóxido hidrolasa

sEH: epóxido hidrolasa soluble

SNC: sistema nervioso central

TEMED: tetrametiletilendiamina

TLR4: Toll-Like receptor 4

TMB: tetrametilbencidina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

T-TBS: solución salina tamponada con tris con Tween 20

UV: luz ultravioleta

PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LOS CITOCROMOS P450 2C11 Y 2J3 EN EL CEREBRO

II. Resumen

Los citocromos P450 (CYP) son proteínas de membrana que se expresan en el retículo endoplásmico y mitocondria de las plantas, hongos y células animales; contribuyen a la biotransformación de compuestos endógenos y exógenos que incluyen fármacos y carcinógenos. Éstos presentan variedad de isoformas y se ha observado que las isoformas de los CYP 2C y 2J, con actividad epoxigenasa, producen ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) a partir de la oxidación del ácido araquidónico (AA). Los EETs poseen importantes propiedades biológicas, una de ellas es ser antiinflamatorios promoviendo la inhibición de NF- κ B como factor transcripcional, evitando su participación en la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Se ha visto que fenómenos como la inflamación e infección afectan la regulación de los CYPs, inhibiendo su expresión transcripcional, y su contenido proteico en diferentes órganos. Esto también se ha observado para los CYPs epoxigenasas, los cuales se expresan también en cerebro, pero hasta el momento, no se ha estudiado la regulación de estas enzimas por procesos inflamatorios en este órgano. Teniendo en cuenta la importancia que han desarrollado los EETs, y el papel que podrían tener en procesos inflamatorios en el cerebro, se busca evaluar, si existen cambios en la expresión y en los niveles de proteína de los CYP2J3 y CYP2C11 en la corteza de animales expuestos al lipopolisacárido (LPS).

Se desarrolló un modelo *in vivo* con ratas macho Wistar de 250 g de peso, a las cuales se les administró intraperitonealmente (i.p.) 1 mg/Kg de LPS disuelto en solución salina comercial. Se obtuvo toda la corteza cerebral de los animales control y los tratados a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Se corroboró el proceso neuroinflamatorio mediante la determinación de los marcadores neuroinflamatorios GFAP e Iba-1, así como mediante la cuantificación de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Posteriormente, se evaluaron los

niveles de expresión transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11* y los niveles de proteína de CYP2J3 y CYP2C11, para determinar si el proceso neuroinflamatorio tuvo algún efecto en ellos. Los resultados obtenidos muestran que los CYP2J3 y 2C11 fueron regulados a la baja por el proceso neuroinflamatorio, y que esta regulación fue post-transcripcional, ya que no hubo cambios significativos en la cantidad de mRNA, pero si en los niveles de proteína.

II. ABSTRACT

The cytochromes P450 are membrane proteins that are expressed in the endoplasmic reticulum and mitochondria of plants, fungi and animal cells. They contribute to the biotransformation of endogenous and exogenous compounds including drugs and carcinogens. It presents a variety of isoforms and it has been observed that the 2C and 2J isoforms with epoxygenase activity produce epoxyeicosatrienoic acids (EETs) from the oxidation of arachidonic acid (AA). EETs have biological properties as anti-inflammatory activities, promoting inhibiting NF- κ B as a transcriptional factor, avoiding their participation in production of pro-inflammatory cytokines.

It has been seen phenomena such as inflammation and infection affect the regulation of epoxygenases CYPs, inhibiting their transcriptional expression and its protein content in different organs. This has also been observed for CYPs epoxygenases, which are also expressed in brain, but until now, the regulation of these enzymes by inflammatory processes in this organ has not been studied. Taking into account the importance that the EETs have developed, and the role they could play in inflammatory processes in the brain, we seek to evaluate whether there are changes in the expression and protein levels of CYP2J3 and CYP2C11 in the cerebral cortex of animals exposed to lipopolysaccharide (LPS).

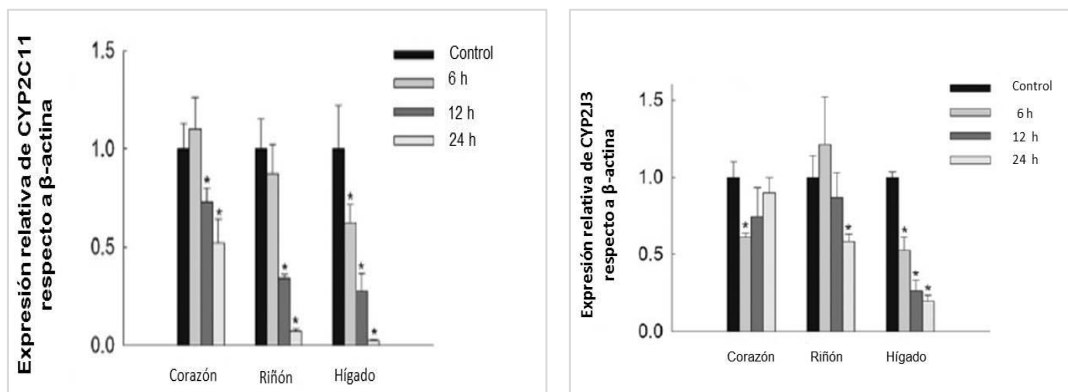
We developed an in vivo model with male Wistar rats weighing 250 g, treated with LPS (1mg / kg) by intraperitoneal administration and as a vehicle, commercial saline solution. The entire cerebral cortex of the control animals was obtained and treated at 6, 12, 24, 48 and 72 hours post-treatment. The neuroinflammatory process was corroborated by the determination of the neuroinflammatory markers GFAP and Iba-1, as well as by the quantification of

the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Subsequently, the levels of transcriptional expression of *Cyp2j3* and *Cyp2c11* and the protein levels of CYP2J3 and CYP2C11 were evaluated to determine if the neuroinflammatory process had any effect on them. The results obtained show that CYP2J3 and 2C11 were regulated downwards by the neuroinflammatory process, and that this regulation was post-transcriptional, since there were no significant changes in the amount of mRNA, but if in the levels of protein.

III. ANTECEDENTES

En estudios previos, se evaluó el efecto de la inflamación en la expresión del mensajero y de proteína de los CYPs epoxigenasas 2C11 y 2J3 en corazón, riñón e hígado de rata a las 6, 12 y 24 horas después de la administración intraperitoneal de LPS a dosis baja de 1mg/Kg, observándose la disminución de su expresión en cada uno de los órganos tratados a los diferentes tiempos con respecto a su control. Los citocromos 2E1 y 4A, también fueron evaluados en microsomas de corazón, donde el nivel de proteína de CYP2E1 disminuyó significativamente a las 24 horas en las ratas tratadas comparadas con las ratas control, mientras que para CYP4A el nivel de proteína incrementó significativamente para las muestras tratadas. También se realizó un estudio sobre el nivel de expresión del gen de interleucinas como: TNF- α e IL-6, generadas por la inflamación que ocasionó la administración de LPS y fueron evaluadas en los tres órganos a estudiar, bajo las mismas horas después del tratamiento con LPS, observándose un incremento significativo de estas proteínas con respecto al control. (Anwar-mohamed et al. 2010)

A.



B.

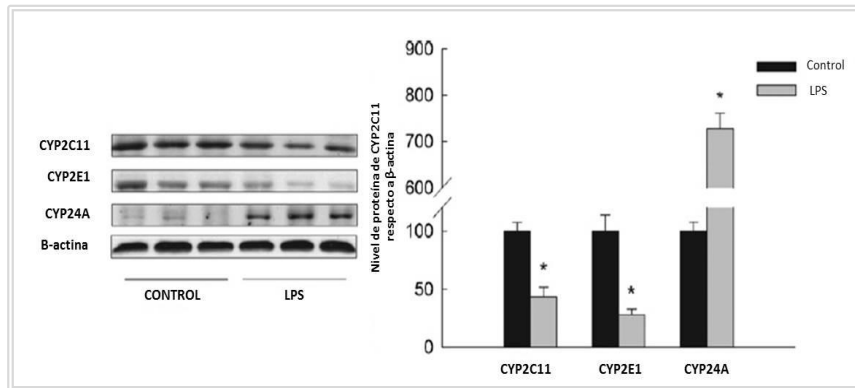


Figura 1. Nivel de expresión del gen para CYP2C11 y CYP2J3 en corazón, riñón e hígado de rata (A) y nivel de proteína para CYP2C11 en corazón (B) durante la inflamación ocasionada por el tratamiento con LPS. Figura modificada de (Anwar-mohamed et al. 2010)

Recientemente, se evaluó la regulación de la expresión transcripcional de proteína de CYP2J3 y CYP2C11, durante un proceso de inflamación en cultivos de astrocitos primarios, generada por la administración de LPS. Tras el tratamiento de 100ng/ml de LPS a diferentes tiempos: 6, 12 y 24 horas, se observó una disminución significativa de la expresión transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, la cual fue prevenida al tratarse con IMD-0354, un inhibidor de NF- κ B que participa en la regulación de estos genes (Fig.2). Para evaluar el nivel de proteína de CYP2J3 y CYP2C11, los astrocitos fueron tratados con concentraciones de LPS de 100ng/ml hasta 800ng/ml durante 24 horas, demostrándose una disminución significativa a partir de los 100ng/ml en adelante con el tratamiento de LPS (Fig.3)

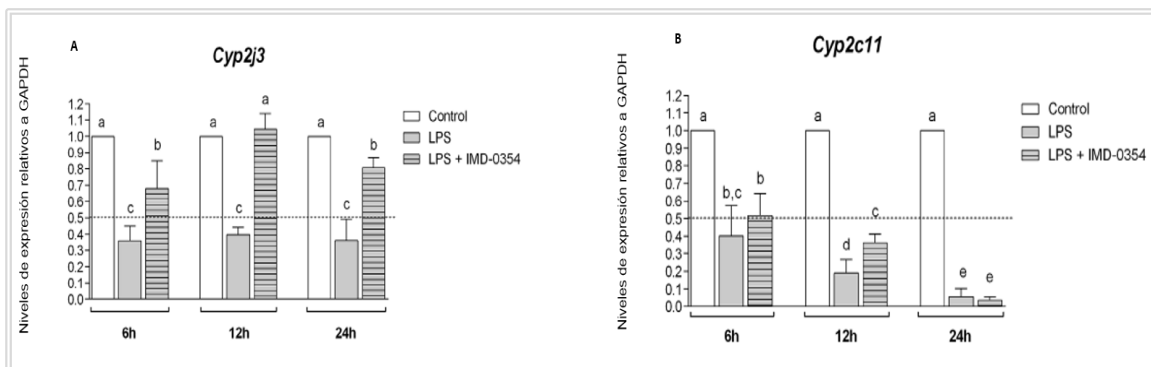


Figura. 2. Niveles relativos de expresión génica de *Cyp2j3* y *Cyp2c11*. Cultivos de astrocitos primarios tratados con 100ng/ml de LPS y LPS (100ng/ml) + 1ng/ml de IMD-

0354 (inhibidor de NF- κ B) a diferentes tiempos: 6, 12 y 24 horas. Los niveles de expresión relativa para *Cyp2j3* (A) y *Cyp2c11* (B), fueron evaluados mediante la técnica qRT-PCR. Modificada de (Navarro-Mabarak et al. 2019)

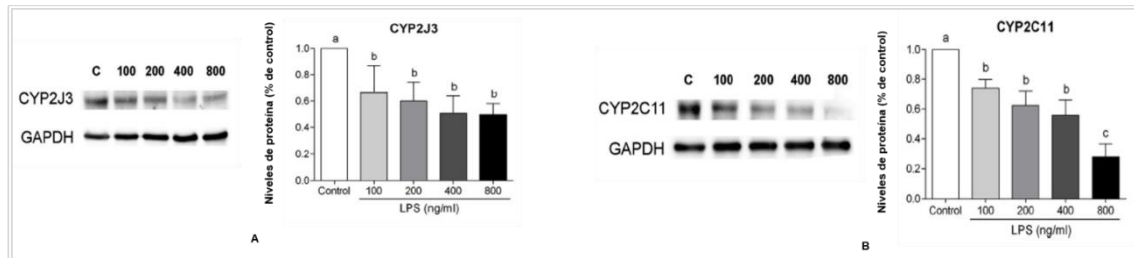


Figura 3. Efecto del tratamiento con LPS en los niveles de proteína de CYP2J3 y CYP2C11 en cultivos de astrocitos primarios. Nivel de proteína para CYP2J3 (A) y CYP2C11 (B), fue determinado mediante Western Blot, Modificada de (Navarro-Mabarak et al. 2019)

IV. Introducción

Los Citocromos P450 (CYP) son una superfamilia de hemoproteínas ubicadas en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias de las células. Estas enzimas se encuentran unidas por hélices hidrofóbicas a la membrana plasmática.

El estudio de estas proteínas inició con las observaciones que realizaron Omura & Sato durante el año de 1964, quienes identificaron la naturaleza hemoprotéica de un pigmento presente en los microsomas hepáticos de mamíferos. Omura y Sato observaron que el grupo hemo de la proteína, se unía con el monóxido de carbono, formándose un complejo de hierro reducido y monóxido de carbono; dicho producto generó un cambio en el máximo de absorbancia del grupo hemo el cual se cuantificó espectrofotométricamente a 450 nm de longitud de onda; por lo tanto a estos citocromos se les nombró con la letra P de pigmento y 450 a la absorbancia con la que se reconocen (citocromos P450) **(Munro, Girvan and McLean 2007)**.

Los CYP se encuentran en varios vertebrados, invertebrados y plantas. Constituyen la principal familia de enzimas con capacidad de catalizar la biotransformación de la mayoría de fármacos y de otros xenobióticos lipofílicos. **(Zanger and Schwab 2013)**. En mamíferos, los citocromos están presentes en altos niveles en hígado, donde juegan un papel importante en reacciones de eliminación, depuración o detoxificación. También están en riñón, intestino delgado, pulmones, corteza suprarrenal, piel, cerebro, testículos, placenta y otros tejidos **(Cederbaum 2015)**. Aunque los procesos de biotransformación se realizan principalmente en el hígado, también se ha visto que en el metabolismo de compuestos de naturaleza endógena han participado otros órganos **(Zanger and Schwab 2013)**.

1. Características generales de las familias de los citocromos P450

En los humanos se encuentran 57 genes funcionales que están distribuidos en la mayoría de los cromosomas autosómicos; estos genes están agrupados de acuerdo a sus secuencias similares en 18 familias y 44 subfamilias, poseen funciones endógenas específicas incluyendo la biosíntesis de hormonas

esteroideas, prostaglandinas, ácidos biliares y otros (**Rushmore and Kong 2002**).

Las familias CYP1, CYP2 y CYP3 en humanos, juegan un papel principal en el metabolismo hepático y extra hepático de fármacos (**Danielson 2002**). Familias como CYP2 de los citocromos están involucradas en la biosíntesis y/o metabolismo de sustancias endógenas tales como el AA, esteroides, vitamina D, y ácido retinoico (**Zordoky, Aboutabl and El-Kadi 2008**).

La **familia 1 de los CYPs** que incluye CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1; CYP1A1 y CYP1B1 se expresa principalmente en tejido extra hepático; mientras que CYP1A2 se expresa principalmente en el hígado (**Schrenk 1998**). El CYP1A1 se responsabiliza del metabolismo de numerosos xenobióticos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos (**Danielson 2002**).

La **familia 2 de los CYPs** se considera la más grande de los CYPs en humanos; dentro de esta familia, se encuentra la subfamilia de las proteínas CYP2C, que representan alrededor del 20% del contenido hepático total de los citocromos en los humanos (**Guengerich 2006**). También hace parte de esta familia el CYP2J, el cual se expresa en tejido extrahepático y está involucrado en el metabolismo del AA en ácidos epoxieicosatrienoicos, los cuales tienen una gran importancia biológica (**Zeldin et al. 1997**).

De la **familia 3 de los CYPs**, la enzima metabolizadora de fármacos más importante es CYP3A4, comprende más del 60% del contenido total de CYP hepático (**Martínez-Jiménez et al. 2007**).

Las función de estas enzimas, dependen de factores intrínsecos y extrínsecos como polimorfismos adicionales en los genes reguladores, y factores no genéticos del huésped como la edad, el sexo, la enfermedad, influencias hormonales y otros (**Zanger and Schwab 2013**).

La clásica reacción llevada a cabo por los P450s es la hidroxilación de sustratos orgánicos, también realizan desmetilación de esteroides, epoxidaciones de

compuestos aromáticos policíclicos y de ácidos grasos insaturados, deshidrogenaciones y desaminaciones **(Munro et al. 2007)**.

2. Cantidad de CYPs en el cerebro

La expresión de los CYP's en el cerebro es heterogénea, y algunos se expresan en una mayor proporción que en el hígado, como lo son CYP46A1, que cumple con la función de eliminar la dopamina y el CYP2D6, que participa en la síntesis de la dopamina y la serotonina **(Navarro-Mabarak, Camacho-Carranza and Espinosa-Aguirre 2018)**.

Los CYPs han sido detectados en el cerebro de diferentes especies, incluyendo ratas, ratones, perros, monos y el hombre **(Miksys, Hoffmann and Tyndale 2000)**. Presentan una gran variedad en su distribución en diferentes regiones del cerebro. Los niveles de los CYPs en neuronas específicas, pueden ser comparables o incluso ser mucho más altos que los encontrados en hepatocitos. **(Dutheil, Beaune and Lorient 2008)**.

El primer estudio sobre el contenido de CYPs en cerebro, fue evaluado en preparaciones microsomales de rata, encontrándose 30 pmol/mg de proteína, que corresponde al 3% del nivel contenido en el hígado. Se sabe que la distribución de estas enzimas no es homogénea y se encuentran en diferentes regiones y células del cerebro **(Dutheil et al. 2008)**. El contenido de CYPs en el cerebro de los humanos es de aproximadamente 100pmol/mg de proteína que corresponde al 10% del nivel de CYPs en el hígado. Para otros autores la cantidad de CYPs en el cerebro representa sólo del 1 al 5% de los CYPs en el hígado. Teniendo en cuenta un estudio realizado para identificar la distribución regional de P450 en diferentes regiones del cerebro, se detectó que su rendimiento estaba entre 50 y 100 pmol/g de tejido, siendo el cerebelo la región con un alto contenido de P450, y la sustancia nigra la de menor contenido **(Warner et al. 1988)**. También se ha evaluado la expresión de múltiples isoformas de citocromos P450 en diferentes regiones de cerebro de

rata, y al evaluarse la corteza cerebral presentaba 100pmol/mg de proteína de P450. **(Tirumalai et al. 1998)**

Es de nuestro interés estudiar ciertas isoformas en el cerebro, especialmente de la familia CYP2C y CYP2J. Estas clases son las más estudiadas por su alta actividad epoxigenasa y por su rol en la síntesis de los EETs, caracterizados por su gran importancia en diferentes funciones fisiológicas. **(Iliff et al. 2010)**.

3. CYPs epoxigenasas 2C y 2J y funciones de sus metabolitos: los EETs

Como se ha mencionado, los (CYPs) presentan diversidad de isoformas que participan en el metabolismo de compuestos xenobióticos y endógenos. En el metabolismo de compuestos endógenos por los citocromos P450, se ha observado que las isoformas **2C** y **2J** son las que están involucradas mayoritariamente en la producción de ácidos grasos de cadena corta, los **EETs** que se obtienen a partir de la oxidación del AA **(Node et al. 1999)**. La monooxigenasa del P450 oxida al AA por una o más reacciones, como son las oxidaciones alílicas, produciendo ácidos hidroxiicosatetraenoicos (HETEs), por epoxidaciones produciendo EETs y por hidroxilaciones del C ω - terminal, produciendo alcoholes del AA (18-, 19-, y 20-HETEs) **(Capdevila and Falck 2002)**.

A nivel de su importancia fisiológica se ha demostrado, que los EETs presentan diversas funciones como mediadores de la vasodilatación neurogénica en vasos cerebrales **(Iliff et al. 2009)**. También se ha visto su participación como cardioprotectores **(Anwar-mohamed et al. 2010)**, angiogénicos, antiapoptóticos y anti-inflamatorios **(Spector et al. 2004)**. Su potente actividad anti-inflamatoria se debe a la inhibición del factor transcripcional NF- κ B, ya sea por la inhibición del complejo IKK o por la activación de receptores nucleares como PPAR- α y PPAR- γ **(Navarro-Mabarak et al. 2018)**.

Las CYPs epoxigenasas se expresan en neuronas, astrocitos y células del endotelio microvascular en regiones de la corteza, hipocampo y en la vasculatura del sistema nervioso central (**Carver et al. 2014**); por lo tanto los EETs se han estudiado como posibles agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas, ya que estas están asociadas con procesos de inflamación y por lo tanto pueden intervenir como metabolitos anti-inflamatorios a nivel del sistema nervioso central (**Wang et al. 2018**).

4. Participación de CYPs epoxigenasas 2C y 2J en el metabolismo del ácido araquidónico

El AA es un ácido graso insaturado, que es almacenado en la membrana de los fosfolípidos a través de la esterificación y es liberado por la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2). Este AA libre se metaboliza en una serie de sustratos biológicamente activos por diferentes mecanismos: ciclooxigenasas (COX), lipoxigenasas (LOX) y por los citocromos P450 epoxigenasas (CYP450) (**Cederbaum 2015**). Las COX catalizan la conversión del AA a prostaglandinas y tromboxanos; las LOX generan leucotrienos y lipoxinas y los CYPs producen ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y ácidos hidroxieicosatrienoicos (HETEs). Las CYP epoxigenasas adicionan un átomo de oxígeno a uno de los dobles enlaces del AA, dando lugar a la formación de cuatro regioisómeros de EETs que se nombran de acuerdo con el número del doble enlace oxidado: 5,6-; 8,9-; 11,12-; y 14, 15- EET (**Zanger and Schwab 2013**). Entre las isoformas CYP2C y CYP2J, se incluyen las humanas como CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2J2, las cuales presentan una actividad epoxigenasa y una capacidad para catalizar la síntesis de EETs en diferentes proporciones, es decir CYP2C8 produce 11,12-EET y 14,15-EET, en una relación de 1:1.25, sin producir 8,9-EET; mientras que CYP2C9 produce 8,9-EET, 11,12-EET y 14,15-EET en una relación de 2.3:1.0:0.5 (**Iliff et al. 2010**).

Tabla 1. Expresión de citocromos P450 en tejido del Sistema Nervioso Central y el porcentaje de EETs como producto del metabolismo del AA por parte de estos CYPs.

Tabla modificada de (Iliff et al. 2010).

Especie	Isoformas	Región cerebro	Ubicación Tipo células	Método detección	Perfil EETs
Humana	CYP-4X1	Cerebro completo, cerebelo	Neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias, músculo liso vascular, endotelio	PCR	8,9: 14,15 – 1:2
Ratón	CYP-2C29	Cerebro completo	ND	PCR	8,9(6%); 11,12(12%); 14,15 (82%)
Ratón	CYP-2C37	Cerebro completo	ND	PCR	8,9-(24%); 11,12-(61%); 14,15-(15%)
Ratón	CYP-2C38	Cerebro completo	ND	PCR	8,9-(9%); 11,12-(65%); 14,15-(26%)
Ratón	CYP-2C40	Cerebro completo	ND	PCR	8,9-(16%); 11,12-(11%); 14,15-(40%)
Ratón	CYP-4X1	Corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, tallo cerebral	Neuronas	WB, Inmunohistoquímica, Northern Blot	
Rata	CYP-2C11	Corteza cerebral, bulbo olfatorio	Astrocitos	WB, Inmunohistoquímica, PCR, Southern Blot, hibridación <i>in situ</i>	8, 9-(25%); 11, 12-(40%); 14, 15-(35%)
Rata	CYP-2C12	Corteza cerebral, bulbo olfatorio	ND	PCR	
Rata	CYP-2C23	bulbo olfatorio	ND	PCR	8, 9-(26%); 11, 12-(51%); 14, 15-(23%)
Rata	CYP-2C26	bulbo olfatorio	ND	PCR	
Rata	CYP-2C7	Cerebro completo	ND	WB, PCR	
Rata	CYP-2D18	Cerebro completo	ND	PCR	8, 9-10%; 11, 12-(59%); 14, 15-(31%)
Rata	CYP-2J3	Ganglios esfenopalatinos, ganglios trigeminales	Neuronas	WB, Inmunohistoquímica, PCR	8, 9-(29%); 11, 12-(28%); 14, 15-(43%)
Rata	CYP-2J4	Ganglios esfenopalatinos, ganglios trigeminales	Neuronas	WB, Inmunohistoquímica, PCR	
Rata	CYP-4X1	Corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, tallo cerebral	Neuronas	Northern Blot, hibridación <i>in situ</i>	

WB: western blot; **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; **ND:** no determinado.

5. Los EETs en funciones anti-inflamatorias y su enzima metabolizadora: la sEH

Se ha demostrado que en el sistema cardiovascular se genera la epoxidación del AA para dar lugar a cuatro ácidos epoxieicosatrienoicos EETs, por medio de las enzimas epoxigenasas: CYP2C y CYP2J. De esta epoxidación se producen 4 regioisómeros (5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15-EET), hidroxilados rápidamente por la epóxido hidrolasa soluble (sEH), a sus correspondientes metabolitos: ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHET), los cuales son mucho menos biológicamente activos que los EETs, y presentan propiedades antiinflamatorias (**Deng, Theken and Lee 2010**).

Las epóxido-hidrolasas (EH) son un grupo de enzimas que están en todos los organismos vivos, y su función es catalizar la adición de moléculas de agua a los epóxidos, para formar dioles. Se han descrito 5 tipos de epóxido hidrolasas en vertebrados: 1) epóxido hidrolasa colesterol (chEH), 2) epóxido hidrolasa hepoxilina (hEH), 3) leucotrieno A₄ hidrolasa (LTA₄), 4) epóxido hidrolasa soluble (sEH) y 5) epóxido hidrolasa microsomal (mEH). LTA₄, chEH, y hEH presentan afinidad por sustratos específicos, mientras que sEH y mEH tienen afinidad por varios sustratos (**Iliff et al. 2010**). Se sabe que la sEH, hidroliza a los EETs a ácidos DHETs, los cuales se consideran menos activos biológicamente (**Deng et al. 2010**); así la hidrólisis de los EETs es considerada una reacción inactivadora y por lo tanto la inhibición de la sEH o la delección de su gen se ha considerado importante para evitar que los EETs pierdan sus funciones biológicas (**Marowsky et al. 2009**). La sEH, se expresa en múltiples regiones del cerebro como corteza y cerebelo, en las células del músculo liso vascular y endotelial y en gran cantidad en astrocitos. A nivel comparativo se expresa más en ratas macho que en hembras (**Iliff et al. 2010**).

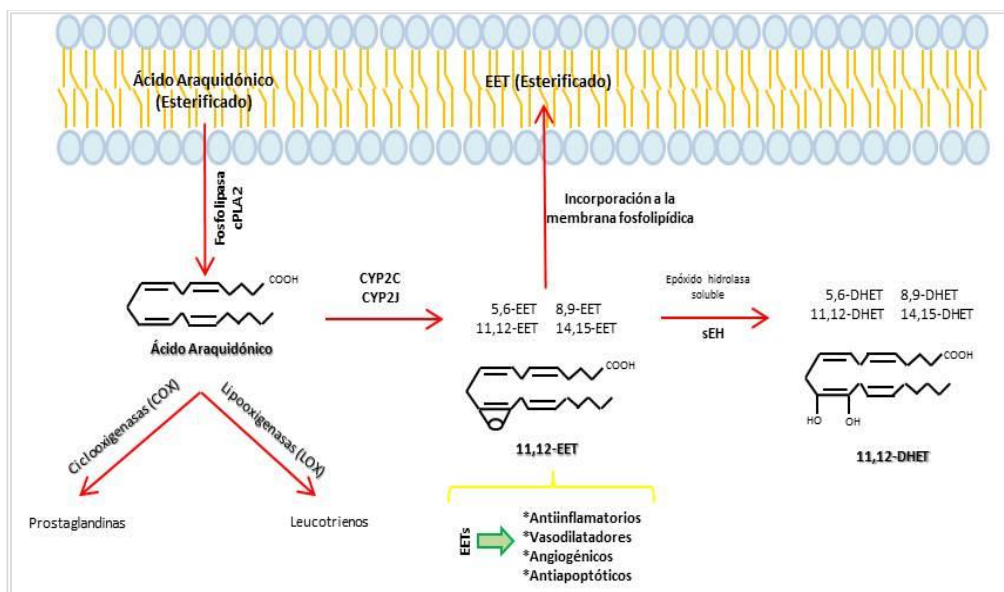


Figura 4. Ruta metabólica de las CYPs epoxigenasas 2J y 2C, modificada de **(Deng et al. 2010)** y **(Spector et al. 2004)**.

Estudios sobre la regulación en la inflamación cardiovascular por medio de las CYP epoxigenasas, han demostrado que los EETs, especialmente los regioisómeros 11,12-EET, actúan de manera significativa en la atenuación endotelial y las interacciones endoteliales y leucocitarias en varios modelos **(Node et al. 1999)**. En general, los EETs derivados de las CYPs epoxigenasas poseen potentes propiedades anti-inflamatorias en la vasculatura, por medio de la inhibición de la actividad de NF- κ B, ya que este factor es un mediador central, para activar a citocinas endoteliales, quimiocinas y a la adhesión de leucocitos en el endotelio, en procesos inflamatorios **(Elbekai and El-Kadi 2006)**.

Los EETs presentan actividades antiinflamatorias, las cuales se combinan con sus efectos cardioprotectores, caracterizándolos como una herramienta para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la hipertrofia cardiaca y los daños en el corazón; por tal razón también son considerados vasodilatadores, pero 5,6 y 8,9-EET pueden ser metabolizados por la ciclooxigenasa (COX), a metabolitos vasoconstrictores **(Zou et al. 1994)**.

Se ha visto que los EETs en cerebro son producidos por el CYP2C11 en astrocitos y en el endotelio del sistema cerebrovascular **(Gebremedhin et al.**

1992). Los metabolitos 5,6-, 8,9-, 11,12- y 14,15-EET probablemente dilatan las arterias cerebrales, aumentando la frecuencia en la apertura de los canales de K⁺ (**Harder et al. 1998**). Los neurotransmisores excitatorios tales como el glutamato, estimulan la producción de EETs para la dilatación de los vasos sanguíneos cerebrales, y el reclutamiento del flujo sanguíneo en regiones excitadas del cerebro, para procesos como la hiperemia reactiva (**Meyer et al. 2007**).

6. Modulación en la expresión de los CYPs bajo el efecto del LPS

La expresión de un CYP específico dentro de un órgano, puede incrementar sustancialmente en respuesta a ciertos agentes químicos conocidos como inductores. Por ejemplo, se ha visto que el LPS genera cambios en la expresión de muchos CYPs como CYP2C11, CYP2J3, CYP2E1 y CYP2B1 (**Aitken and Morgan 2007**). Estudios en la regulación de P450 en hepatocitos humanos tienen confirmado que las citocinas inflamatorias como: IFNs, IL-1, IL-6 y TNF- α , regulan la expresión de P450 (**Ghezzi et al. 1986**).

La respuesta inmune a la infección o la inflamación, se caracteriza por la liberación de citocinas que son necesarias para observar los efectos en los CYPs P450 (**Ghezzi et al. 1986**). La administración de una sustancia inmunogénica tal como el LPS, induce a una respuesta inflamatoria en animales a través de la activación de macrófagos y la subsecuente liberación de citocinas. Estudios *in vitro* e *in vivo*, han mostrado que el LPS, modula los citocromos P450 en hígado, regulando la producción de citocinas pro-inflamatorias, (**Tindberg et al. 1996**).

Algunos reportes han mostrado que la estimulación de una respuesta inmune o una lesión isquémica en el sistema nervioso central, puede alterar los niveles de la expresión de los CYP (**Hauss-Wegrzyniak et al. 1998**). El LPS se une a través de su región de lípido A, a una proteína de unión de suero de alta afinidad denominada: proteína de unión al lipopolisacárido (LBP). La unión de LPS a LBP facilita la activación de la membrana unida a los receptores CD14 en células inmunocompetentes que a su vez estimulan la síntesis y liberación de citocinas

como IL-1, IL-6 y TNF- α . Además de los receptores CD14 unidos a la membrana, el complejo LPS-LBP también se puede unir a receptores solubles CD14 que a su vez pueden estimular células CD14 negativas para sintetizar y liberar citocinas **(Frei et al. 1987)**. Se sabe que las citocinas pro-inflamatorias influyen en la regulación de algunos CYPs, y en respuesta al LPS células de la microglía y astrocitos liberan éstas proteínas **(Nicholson and Renton 1999)**. En estudios donde se ha administrado esta endotoxina, el CYP1A1 se ha regulado teniendo pérdida de su actividad catalítica por la liberación de citocinas como IL-1 y TNF- α desde células microgliales **(Abdel-Razzak et al. 1993)**.

Las subfamilias CYP2C y CYP2J son las enzimas con mayor actividad epoxigenasa, aunque también familias como CYP1A1, CYP2B y CYP2E median reacciones de epoxidación **(Navarro-Mabarak et al. 2018)**.

Las epoxigenasas se encuentran en diversas regiones del cerebro; por ejemplo la familia CYP2C11 se ha localizado en astrocitos de corteza, y ganglios trigeminales de neuronas sensoriales en cerebro de rata **(Liu and Alkayed 2005)**. También la epoxigenasa CYP2J2 de humano se ha encontrado en neuronas de hipocampo y cerebelo y en astrocitos de la corteza, hipocampo y el cerebelo **(Dutheil et al. 2009)**.

7. Efecto de LPS en células cerebrales

El LPS, es una endotoxina de las bacterias gram-negativas, que produce daño en neuronas dopaminérgicas en presencia de la microglía. Además el LPS activa la microglía en ambos modelos *in vitro* e *in vivo* generando una pérdida progresiva y acumulativa de neuronas dopaminérgicas **(Godbout et al. 2005)**. Se ha reportado que, durante la perturbación inmunológica, causada por la administración i.p. de LPS, durante períodos de desarrollo o envejecimiento, la microglía puede activarse, resultando una respuesta pro-inflamatoria exagerada y prolongada aumentando el daño a las neuronas. Por lo tanto, no sólo la microglía puede inducir daño a las neuronas, sino que puede activarse persistentemente para producir una neurotoxicidad continua e incontrolada **(Qin et al. 2007)**.

Además, se ha demostrado el efecto a largo plazo de la inyección i.p. de LPS (5mg/Kg), desde varias horas hasta 10 meses después del tratamiento el cual mostró la pérdida retardada y progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra entre los 7 y 10 meses. Se observó que el TNF- α en suero disminuyó a las 9 horas. En hígado los niveles de proteína TNF- α disminuyeron al 18% de los valores máximos, 9 horas después del tratamiento con el LPS y sorprendentemente, la proteína de TNF- α permaneció elevada en el cerebro. A una semana después del tratamiento con LPS, los niveles de proteína de TNF- α fueron elevados en el cerebro, comparados con los valores control de proteína. La proteína de TNF- α , permaneció elevada a los 14 y 21 días, e incluso 10 meses después del tratamiento con LPS. Además, 3 horas después del tratamiento con el LPS, la tinción de la microglía en la corteza, hipocampo y sustancia nigra mostró microglía con citoplasma y cuerpos celulares agrandados con forma irregular e intensificación de la tinción de Iba-1 consistente con la activación morfológica de la microglía. Estos resultados apoyan una asociación entre la producción temprana (1-9 horas) de TNF- α en el hígado y la sangre, con una activación microglial crónica (10 meses) en el cerebro (Qin et al. 2007).

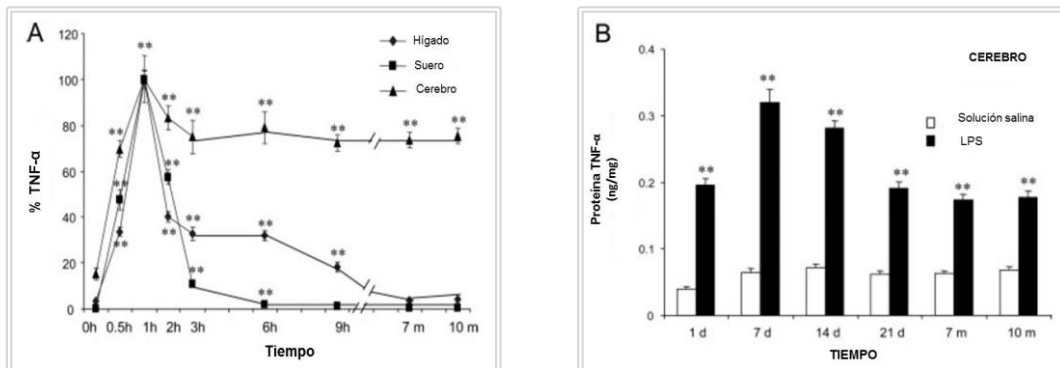


Figura 5. Efecto de la administración i.p. de LPS (5mg/Kg) sobre los niveles de TNF- α , en cerebro de ratón durante un tiempo prolongado, determinación por ELISA. Gráficas modificadas tomadas de (Qin et al. 2007). **A.** Comparación de los cambios en el curso del tiempo de TNF- α en el hígado, suero y cerebro. **B.** El efecto a largo plazo del LPS, medido en niveles de TNF- α . Se puede observar que, a lo largo del tiempo, el LPS induce un incremento de TNF- α en cerebro. Los niveles de TNF- α alcanzaron su punto máximo a la primera hora y se mantuvieron elevados durante 10 meses.

Se ha sugerido que el LPS sistémico actúa induciendo la síntesis de TNF- α en hígado para aumentar el TNF- α en suero, y luego activar la microglía cerebral a través de los receptores de TNF- α , que inician la activación sostenida de la síntesis de citocinas cerebrales y la neuroinflamación **(Kumins et al. 1996)**.

8. Moléculas activadas por el LPS, que desencadenan respuestas inflamatorias en cerebro.

La unión de LPS a su receptor transmembrana CD14 y receptor tipo Toll 4 (TLR4) desencadena la actividad de la vía de transducción de NF- κ B **(Laflamme and Rivest 2001)**.

Los receptores CD14 y TLR4 se expresan constitutivamente en los órganos circunventriculares (CVO), plexo coroideo y leptomeninges. La circulación de LPS también causa un aumento rápido en CD14 en estas regiones del cerebro, y se produce una respuesta retardada en las células ubicadas en los límites de los CVO y en la microglía a través del parénquima cerebral **(Lawson et al. 1990)**. Los receptores CD14 derivados de la microglía, pueden ser un sensor para las PAMP's producidos por las bacterias gram-negativas como lo es el LPS, cuando está presente en el tejido cerebral.

Se debe tener en cuenta que la microglía está presente en grandes cantidades en el cerebro, pero no se distribuye con una densidad o morfología uniforme en todas las principales divisiones del cerebro **(Kim et al. 2000)**. Esta heterogeneidad puede implicar una sensibilidad desigual a la neurotoxicidad mediada por la microglía en diferentes regiones del cerebro. Por ejemplo, se ha observado que existe mayor susceptibilidad al LPS en cultivos mesencefálicos, lo que induce la neurotoxicidad, pero no en cultivos de hipocampo o corticales, y esto puede ser atribuido a la presencia de un gran número de microglía activada en esta región **(Qin et al. 2008)**.

También se ha evaluado la inducción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-1 β en hígado, suero, y cerebro mediante la administración de LPS, observándose que estas citocinas sólo subsisten en suero y en hígado 1

semana, mientras que en el cerebro están presentes durante un mayor tiempo. Las citocinas pro-inflamatorias del cerebro permanecen elevadas después de que las citocinas pro-inflamatorias hepáticas y séricas regresan a sus niveles de control **(Qin et al. 2008)**.

9. Regulación de CYPs mediante factores nucleares como NF- κ B

En estudios de la regulación de los CYPs por NF- κ B, se ha visto que este puede regular mediante la interacción con diferentes receptores nucleares como AhR, CAR, PXR, PPAR entre otros. Además, estos factores pueden regular directamente la transcripción, ya que se unen a sitios en la región promotora de varios CYPs y su regulación tiende a ser negativa para con estas enzimas. También se ha demostrado que existe una regulación postranscripcional donde NF- κ B tiene sitios de unión a la región promotora de la enzima hemo-oxigenasa (HO), la cual degrada el contenido hemo de los CYPs produciendo la pérdida de la actividad catalítica de éstos citocromos **(Zordoky et al. 2008)**.

Como ya se mencionó el (NF- κ B), es un importante factor de transcripción que regula más de 200 genes, los cuales están involucrados en una variedad de procesos celulares **(Zordoky and El-Kadi 2009)**. También está involucrado en la regulación de muchas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, inmunoreceptores, moléculas de adhesión celular, proteínas de respuesta a fase aguda, genes de respuesta al estrés, reguladores de apoptosis, receptores de la superficie celular **(Ghosh, May and Kopp 1998)**. El factor de NF- κ B está formado por homo dímeros o hetero dímeros, cada uno de 5 miembros: p50, P52, P65 (RelA), RelB, y c-Rel **(Silverman and Maniatis 2001)**. Las diferentes combinaciones de estas subunidades tienen efectos diferentes en la función celular. Todas las subunidades de NF- κ B contienen una región amino conservada: dominio Rel-homología, el cual se responsabiliza de la dimerización, localización nuclear, y unión al DNA **(Le Beau et al. 1992)**. Sin embargo la principal forma de NF- κ B es el heterodímero de p50 y las subunidades de RelA, las cuales son codificadas por los genes NF- κ B1 y NF- κ B2 **(Kumar et al. 2004)**. Generalmente el complejo de NF- κ B, es

secuestrado en el citoplasma por la unión con una proteína inhibidora llamada I κ B (**Guijarro and Egido 2001**).

NF- κ B puede activarse por muchos estímulos que incluyen citocinas, virus, estrés oxidativo y agentes químicos (**Perkins and Gilmore 2006**). La activación rápida y la translocación nuclear de NF- κ B citoplasmático, representa un camino clásico de la activación de este factor de transcripción. En esta ruta la cinasa activada I κ B (IKK), fosforila a I κ B α y lo degrada, permitiendo que NF- κ B se transloque al núcleo (**Viatour et al. 2005**). El factor NF- κ B activado, puede inducir a la transcripción del gen de I κ B α y el nuevo I κ B α sintetizado entra al núcleo, se une a NF- κ B y termina la respuesta clásica de NF- κ B (**Bonizzi et al. 2004**).

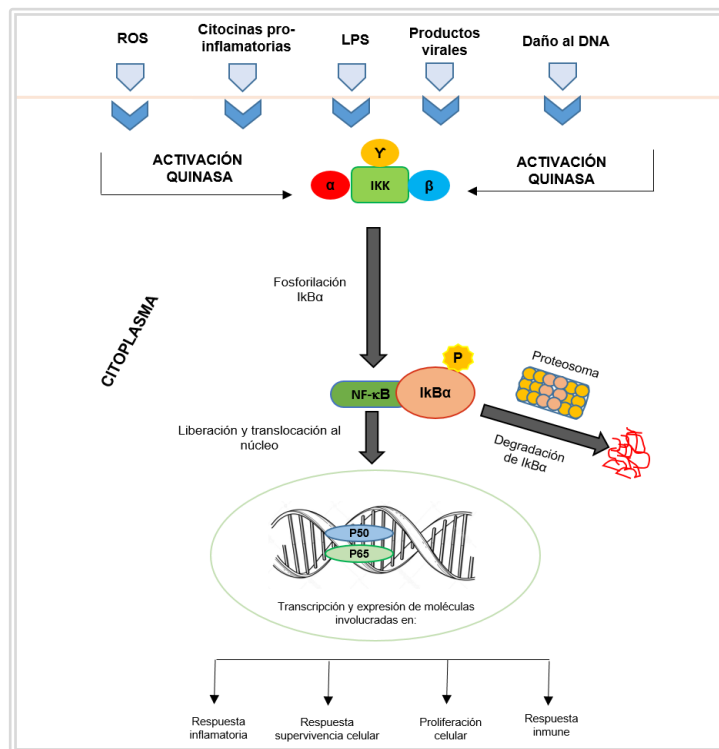


Figura 6. Activación NF- κ B, vía canónica. Modificada de (**Kumar et al. 2004**)

Teniendo en cuenta estos antecedentes, buscamos evaluar si hay cambios en la expresión a nivel de mensajero y de proteína de los CYP2J3 y CYP2C11 en un modelo de inflamación en cerebro, inducido por la administración i.p. de LPS. Como ya se ha mencionado, estos CYPs se han estudiado en tejido de corazón, riñón, e hígado de rata, presentando una disminución en su expresión transcripcional y niveles de proteína, pero este efecto puede variar dependiendo

del tejido de estudio. En este proyecto, se evaluó toda la corteza cerebral de rata, debido a que no se ha estudiado la regulación de estos CYPs en este órgano, además de la asociación que existe entre enfermedades neurodegenerativas con procesos de inflamación sostenida.

En este trabajo se estudió el efecto que tiene la inflamación en la corteza cerebral, causada por la administración i.p. de LPS en la expresión transcripcional y de proteína de los CYP2C11 y CYP2J3, los cuales metabolizan el AA a EETs; estos últimos presentan importantes propiedades biológicas tales como la de ser antiinflamatorios.

V. Planteamiento del problema

Se ha descrito que las citocinas involucradas en los procesos inflamatorios generan cambios en la expresión de diversos CYPs. La regulación de los CYP2C11 y CYP2J3 se ha evaluado durante un proceso inflamatorio sistémico en diferentes órganos como corazón, riñón e hígado de rata, pero no se ha descrito si los procesos inflamatorios causan cambios en la regulación de los CYP-epoxigenasas en el cerebro. Por lo tanto, es de nuestro interés estudiar si existen cambios en la expresión transcripcional y en los niveles de proteína de estos citocromos en un modelo de neuroinflamación *in vivo* generado a través de la administración sistémica de LPS.

VI. Hipótesis

Durante un proceso de neuroinflamación desarrollado *in vivo*, los CYP2J3 y CYP2C11 presentarán una disminución en su expresión transcripcional y niveles de proteína a través de la activación de citocinas pro-inflamatorias.

VII. Objetivo general

Determinar cambios en la expresión transcripcional y niveles de proteína de los CYP2J3 y CYP2C11 en la corteza cerebral de animales expuestos sistémicamente a LPS.

VIII. Objetivos particulares

- Establecer un modelo *in vivo* de neuroinflamación en ratas, mediante la administración i.p. de LPS.
- Evaluar los niveles de marcadores de inflamación como molécula adaptadora de unión a calcio ionizada Iba-1 (Iba-1) y proteína gliofibrilar ácida (GFAP) en la corteza cerebral, a fin de detectar un aumento en microglía y astrocitos.

- Cuantificar las citocinas pro-inflamatorias presentes en la corteza cerebral, con el fin de detectar marcadores de inflamación.
- Cuantificar la expresión transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11* en la corteza cerebral.
- Medir los niveles de proteína de los CYP2J3 y 2C11 en la corteza cerebral.

IX. Estrategia experimental

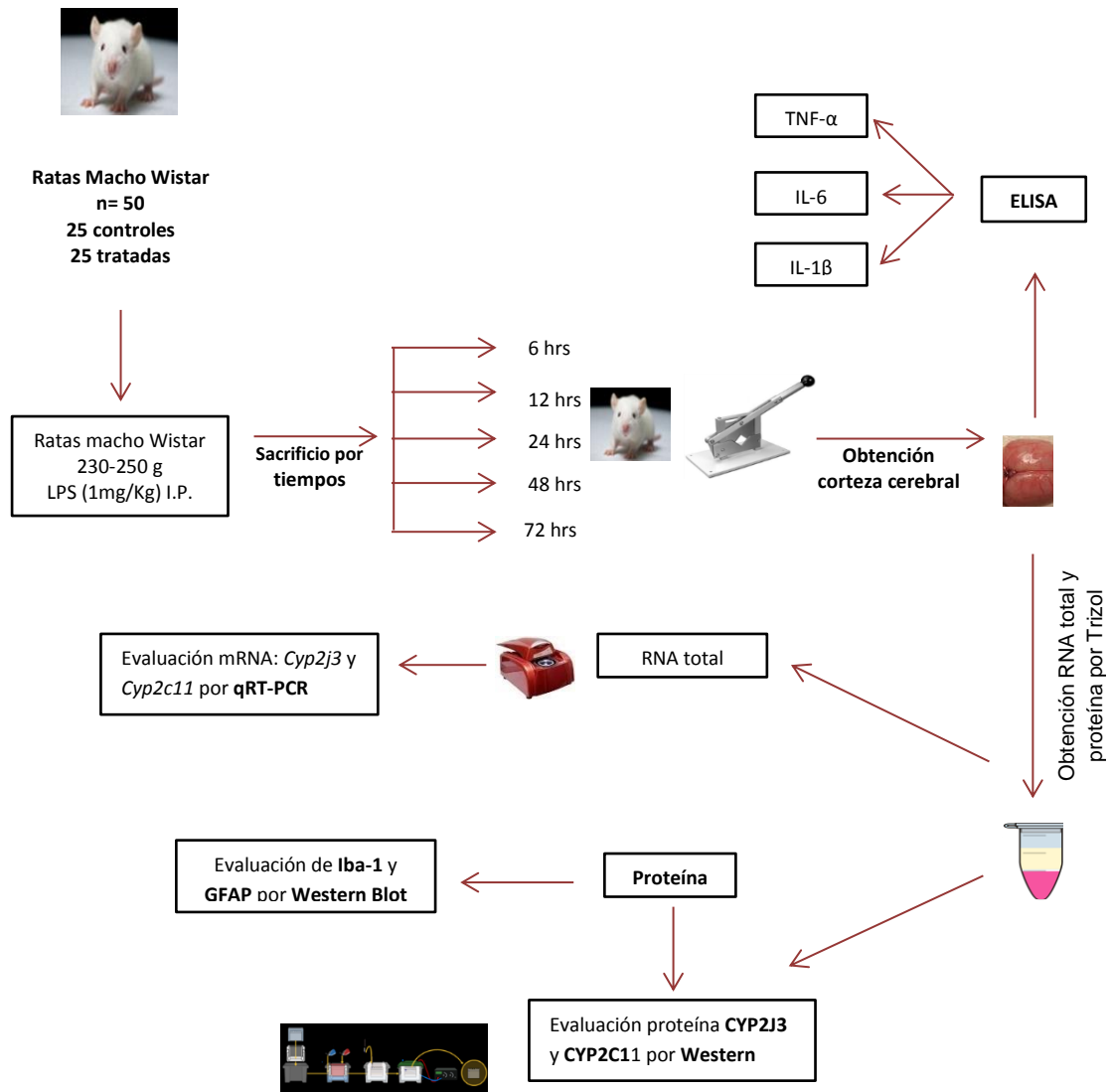


Figura 7. Procedimiento de la estrategia experimental. Administración i.p. de LPS 1mg/Kg a 50 ratas macho Wistar. Se realizaron sacrificios a diferentes tiempos obteniéndose la corteza cerebral para evaluar los niveles de proteína y la expresión transcripcional de los CYP2J3 y CYP2C11. Se evaluaron los marcadores Iba-1 y GFAP como proteínas específicas de neuroinflamación en la corteza cerebral, así como las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Resumen de la estrategia experimental:

Se utilizaron 50 ratas macho Wistar, las cuales fueron pesadas y divididas en dos grupos: 25 ratas controles y 25 tratadas. Las ratas fueron administradas i.p. con solución salina (controles) o con 1 mg/kg de LPS. Se obtuvo toda la corteza cerebral de los animales control y los tratados a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. La corteza fue evaluada, debido a que en estudios anteriores se ha encontrado actividad de éstos CYPs epoxigenasas en astrocitos y neuronas corticales (Iliff et al. 2010) (Alkayed et al. 1996)

Los animales fueron sacrificados de acuerdo al protocolo aprobado por la comisión para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con número de folio ID: 249.

Para corroborar que la dosis y tiempo de administración del LPS que se utilizó indujo un proceso neuroinflamatorio, se determinaron los niveles de proteína de astrocitos, GFAP y de microglía Iba-1 en la corteza cerebral, mediante la técnica de Western Blot. GFAP es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de los astrocitos. Su expresión se incrementa en la activación astrocitaria. Los astrocitos están involucrados en la regulación de la inflamación del SNC. Iba-1 es una proteína que se encuentra en la microglía, y su expresión incrementa cuando se regula al alza de éstas células después de una respuesta inflamatoria en el SNC.

Se determinaron los niveles de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β mediante kits de ELISA. El LPS activa una cascada de genes pro-inflamatorios como éstas citocinas, las cuales inducen reacciones inflamatorias en el cerebro.

1. Para determinar los niveles de expresión transcripcional del *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, se tomó una pequeña parte de corteza cerebral, y por medio de la técnica de trizol, se obtuvo el RNA total. Posteriormente, se sintetizó cDNA a partir del mRNA y se determinaron los niveles de expresión por qRT-PCR.

2. Para cuantificar los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11, se realizó la obtención de la proteína de cada una de las muestras mediante el método de trizol, y se analizaron por medio de la técnica de Western Blot.

Técnicas utilizadas en la estrategia experimental:

1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA fue utilizado el reactivo de Trizol (Life technologies REF 15596018), y la técnica descrita por el proveedor Thermo Fisher:

- a) Las muestras de corteza a trabajar se descongelaron y se mantuvieron en hielo mientras se realizaron los procedimientos pertinentes.
- b) Se agregó 1 mL del reactivo de Trizol a cada muestra que contenía un fragmento de tejido de corteza, y se dejó incubando por 10 minutos aproximadamente, permitiendo así que los complejos nucleoproteicos se dissociaran.

1.1. Homogenización

Con ayuda de un homogenizador (Fisherbrand Cat No 03-392-106) se trituró todo el tejido de la corteza cerebral.

1.2. Separación de fases

- a) Se agregaron 200 μ L de Cloroformo por cada 1 mL de trizol agregado anteriormente a cada fragmento de tejido.
- b) Se agitó vigorosamente con la mano cada muestra, hasta notar un cambio de color: rosa pastel.
- c) Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos.
- d) Luego se centrifugó a 12000 xg (MIKRO 200R- Hettich Zentrifugen) por 15 minutos a 4°C.

- e) Al terminarse la centrifugación se observó la separación de 3 fases: en la parte superior se encontraba el RNA, en la parte media, el DNA y en la parte inferior se encontraba la proteína. Se aisló el RNA para ser usado posteriormente en la técnica de qRT-PCR.
- f) El RNA de cada muestra fue transferido a un tubo estéril, y se marcó respectivamente de acuerdo con la nomenclatura para identificar cada una de las muestras.

1.3. Precipitación del RNA

- a) Se agregaron 500 μ L de alcohol isopropílico por cada 1 mL de trizol y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos.
- b) Posterior a este procedimiento se incubó por toda la noche en alcohol isopropílico a 4°C.
- c) Luego se centrifugó a 12000 xg (MIKRO 200R- Hettich Zentrifugen), 15 minutos a 4°.

NOTA: El precipitado del RNA, el cual es invisible antes de la centrifugación, forma un pellet tipo gel en un lado y en la parte inferior del Eppendorf. Si el pellet no se observa, se debe repetir la centrifugación ya que el RNA debe observarse muy bien.

- d) Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente.

1.4. Lavado del RNA

- a) Se eliminó el sobrenadante por inversión, y el pellet de RNA fue lavado utilizando etanol al 75%. El RNA quedó en forma de una suspensión de color blanco.

NOTA: para diluir el etanol se debe usar H₂O DEPC (Agua libre de RNasas (Life Technologies Cat. No. 10977-015), evitando así que el RNA sea degradado por estas enzimas.

- b)** Las muestras fueron agitadas en un vórtex (Vortex-Genie 2) observándose una pastilla blanca representando al RNA.
- c)** Seguidamente se centrifugó a 7500 xg (MIKRO 200R- Hettich Zentrifugen), durante 5 minutos a una temperatura de 4°C.
- d)** El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente ya que si se hacía vigorosamente, se podría haber desprendido la pastilla blanca y perder el RNA obtenido.
- e)** El pellet obtenido se dejó secando por inversión sobre el papel absorbente y finalmente la pastilla tomó un aspecto transparente.

1.5. Redisolución del RNA.

- a)** El RNA, se disolvió en 60 µL de agua DEPC, para que estuviera libre de RNasas. El RNA luego se resuspendió de 15 a 20 veces y cada muestra fue llevada a un eppendorf más pequeño para su posterior cuantificación y evaluación de su pureza en un espectrofotómetro (NANODROP 2000 Serial Thermo Scientific No. 6443).

1.6. Cuantificación del RNA y medida de su pureza

- a)** Se instaló el programa para realizar las lecturas en el espectrofotómetro (Thermo Scientific NANODROP 2000).
- b)** Inicialmente, se lavó el lector con agua DEPC y posteriormente fue secado para evitar errores en las lecturas del espectrofotómetro.
- c)** 2 µl de la muestra de RNA fueron tomados y llevados al lector para hacer la lectura. **NOTA:** Antes de tomar esta cantidad de RNA, la muestra debe estar bien diluida, por lo tanto, se usa el vórtex para tener solución de RNA muy homogénea.
- d)** Se leyeron las concentraciones y la pureza del RNA obtenido.

1.7. Integridad del RNA

- a) Se preparó un gel de agarosa al 1%: Se pesaron 0.3 g de agarosa tipo I-A en un matraz (SIGMA A - 0169). Se le añadieron 30 ml de buffer TAE 1X.
- b) La agarosa se fundió en el microondas a potencia 4 durante 2 minutos **NOTA:** se debe calentar por 5 segundos el matraz en el microondas, sacarlo, agitarlo y volver a calentar, hasta que la solución se vea totalmente transparente, sin burbujas y sin gránulos de agarosa por las paredes.
- c) Una vez que la temperatura de la agarosa descendió lo suficiente hasta que fuera concebible al tacto, se vació en el molde de la electroforesis con el peine para los pozos, el cual fue colocado previamente.
- d) En un parafilm se colocaron 2.0 μ l de Buffer de carga y 3.0 μ l de la muestra de RNA.
- e) Se mezcló con una pipeta de 10 μ l en el parafilm y fueron agregadas las mezclas en cada pozo.
- f) Las mezclas se corrieron a 100 V durante 25 minutos hasta verse la separación de las bandas.
- g) Luego el gel se expuso 1 minuto en Bromuro de etidio y con mucho cuidado, ya que éste es un compuesto carcinógeno. Este reactivo se intercala en el RNA, el cual va a ser expuesto a la luz ultravioleta (UV).
- h) Se hicieron dos lavados de 10 minutos con agua en una cubeta.
- i) Se reveló en un fotodocumentador y se tomaron las fotografías correspondientes. Se deben observar las subunidades 18S y 28S. Estas deben estar separadas para poder determinar si el RNA está íntegro, de lo contrario las bandas no se visualizarían de la forma correcta ya que no se diferenciarían las bandas respectivas.

2. Síntesis de cDNA

- 2.1.** Las muestras tomadas en la obtención del mRNA fueron descongeladas ya que se encontraban almacenadas a -80°C , como también fueron descongelados el oligo dT más los dNTP's.
- 2.2.** Se partió de $1\mu\text{g}$ de RNA total. La cantidad de mRNA fue indicada para cada muestra de corteza con sus respectivos tratamientos.
- 2.3.** Las diferentes cantidades de muestra de tejido y de agua se mezclaron constantemente.
- 2.4.** Las mezclas de tejido y agua fueron dejadas en el hielo, mientras que en un eppendorf diferente, se realizó la mezcla de oligo dT y de la mezcla de dNTP's calculándose cuánto se necesitaba para el número de muestras a utilizar.
- 2.5.** Se agregaron $2\mu\text{L}$ de la mezcla realizada de oligo dT, y la mezcla de dNTP's a la mezcla ya realizada de tejido y agua correspondiente.
- 2.6.** Después de agregar la mezcla a cada muestra, se agitó constantemente y se calentó durante 5 minutos en el termociclador a una temperatura de 65°C .
- 2.7.** Después de terminados los 5 minutos, las mezclas fueron llevadas al hielo durante 5 minutos y después de terminado este tiempo se hizo una centrifugación de poco tiempo (10 seg) en la microcentrífuga.
- 2.8.** En un eppendorf diferente se realizó una mezcla de $4\mu\text{L}$ de First strand Buffer, $2\mu\text{L}$ de DTT y $1\mu\text{L}$ de RNase Out, para tener un total de $7\mu\text{L}$ de la reacción total. Los cálculos se realizaron para el total de las muestras a trabajar y no hacer una nueva mezcla de reacción cada vez que se iniciaba con una muestra de tejido diferente.
- 2.9.** Se agregaron $7\mu\text{L}$ de la mezcla anterior a cada una de las muestras de tejido que ya contenían el oligo dT y la mezcla de los dNTP's.
- 2.10.** Esta nueva mezcla fue llevada a una temperatura de 37°C por un tiempo de 2 minutos en el termociclador.
- 2.11.** Después de terminada dicha función, se agregó $1\mu\text{L}$ de la enzima transcriptasa reversa: M-MLVRT y fue calentada a 37°C en el termociclador durante 50 minutos.

2.12. Terminados los 50 minutos se inició de nuevo una etapa de calentamiento a 70°C durante 15 minutos.

2.13. Al terminarse dicho proceso, las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se almacenaron a -80°C para un posterior análisis.

3. Realización de las curvas para PCR

Se realizaron las curvas para saber a qué concentración de cDNA se debían hacer las amplificaciones, y poder estudiar el gen de interés en el tejido de la corteza cerebral, que fue evaluado como control y tratamiento.

3.1. Inicialmente se realizó un pool de cDNA a partir de las muestras control de corteza.

3.2. Del pool realizado, se obtuvieron las diluciones respectivas en 8 puntos correspondientes. Para estos 8 puntos de la curva, fueron utilizados 8 tubos Eppendorf los cuales contenían cada uno 11 µL de agua y luego fué agregándose 11 µL desde el pool de la muestra a estudiar, estableciéndose concentraciones de 500ng/µL, 250 ng/µL, 125 ng/µL, 62.5 ng/µL, 31.25 ng/µL, 15.625 ng/µL y el blanco que contenía solo agua.

3.3. Se realizó la mezcla de la reacción que contenía agua, mezcla del Master Mix, el cual contiene la mezcla de dNTP's, Mg⁺, buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados. También dicha mezcla de reacción llevaba la sonda del gen de interés Taqman: *Cyp2j3*, *Cyp2c11* y un gen de control como el GAPDH.

3.4. Las curvas fueron hechas por triplicado en la placa correspondiente y se agregaron 7µL de la mezcla de la reacción y 1µL de cada una de las diluciones de cDNA formadas con sus respectivas concentraciones, en tubos de PCR tiempo real.

3.5. Terminado el procedimiento de las mezclas de reacción se tapó cada uno de los tubos de PCR tiempo real, y se llevaron al Rotor Gene (R corbett Research RG-6000) para iniciar el proceso de las amplificaciones y

observarse a qué cantidad de número de ciclos, se presentaba una mejor curva con su respectiva concentración.

3.6. Este procedimiento se realizó para toda la corteza cerebral que fue tomada como muestra control y tratada.

3.7. Al observarse las curvas se determinó que a una concentración de 250 ng/ μ L, las muestras mostraron un número de ciclo adecuado para su amplificación, y por lo tanto esta concentración fue la utilizada para llevar a cabo los siguientes.

4. Obtención de proteína por el método de Trizol

4.1. Precipitación de proteínas.

Las proteínas se aislaron desde el sobrenadante del fenol-etanol.

- a) Se adicionó 1.0 mL de isopropanol al sobrenadante de fenol-etanol por 1mL de reactivo de trizol usado para la lisis.
- b) Seguido a la lisis se incubó por 15 minutos.
- c) Posterior a este paso, se centrifugó por 15 minutos a 10600 xg a 4°C.
- d) Finalmente se descartó el sobrenadante con una pipeta. Este procedimiento se debe hacer en condiciones de esterilidad.

4.2. Lavado de proteínas.

- a) Se preparó una solución de lavado que contenía 0.3M de hidrocloreuro de guanidina en 95% de etanol.
 - b) Se resuspendió el pellet en 1 mL de la solución de lavado por 1 mL de trizol, agitándose cada muestra en el vórtex.
 - c) Seguido a esto se incubó por 20 minutos.
- NOTA:** Las proteínas pueden ser almacenadas en la solución de lavado por al menos 1 mes a 4 °C o al menos 1 año a -20°C.
- d) Se centrifugó por 5 minutos a 8320 xg a 4 °C.
 - e) El sobrenadante fué descartado con una pipeta.

- f) El paso b se repitió por triplicado (lavado con hidrocloreuro de guanidina).
- g) 1 mL de etanol al 100% fué adicionado, y se mezcló en el vórtex.
- h) Se prosiguió a una incubación por 20 minutos.
- i) Se hizo uso de la centrífuga por 5 minutos a 7500 Xg (MIKRO 200R-Hettich Zentrifugen) a 4°C.
- j) Se descartó el sobrenadante con una pipeta.

4.3. Solubilización de la proteína.

- a) El pellet se resuspendió en 200 μ L de SDS+UREA, bañándose el botón con esta solución.
- b) Al final se agregaron 4 μ L de inhibidores de proteasas (tableta "Complete" de Sigma) y 1 μ L de PMSF, para evitar que se degradara la proteína.

4.4. Sonicación.

- a) Antes de iniciar con las sonicaciones, se homogenizó la muestra con ayuda de los pistilos. Se debe triturar muy bien la muestra para que no queden trazas de proteína sin homogenizar.

Las sonicaciones fueron de a 3 ciclos:

El primero, segundo y tercer ciclo fueron de 30 segundos cada uno haciendo una pausa de 3 minutos.

- b) Finalmente, la proteína está completa para hacer las respectivas cuantificaciones, e iniciar con la técnica del Western Blot.

4.5. Preparación de las muestras

- a) Inicialmente se descongelaron las muestras con las que se van a trabajar, las cuales se encuentran a -80°C. Seguido a esto se realizó la cuantificación de la proteína mediante la técnica de Bradford y luego saber qué cantidad de ésta se iba a cargar al gel. Los cálculos se hicieron para 30 μ g de proteína.

- b)** Se obtuvieron 3 réplicas de cada muestra en tubos Eppendorf, los cuales contenían cada uno 45 μ l de proteína y 45 μ l de Buffer de carga.
- c)** Después de tener la mezcla de la proteína más el buffer de carga, se calentaron durante 5 minutos a baño María.
- d)** Seguido a este calentamiento, las muestras se dejaron a temperatura ambiente. Si de inmediato no se van a trabajar con ellas, se deben guardar a -20°C .

4.6. Preparación de los geles.

- a)** Antes de preparar los geles, se hizo el montaje de toda la maquinaria, y se lavaron los vidrios de 1.5 mm junto con los vidrios planos que cierran el sistema para el gel.
- b)** El gel separador fue preparado al 11%. Se prepararon dos geles
- c)** Al finalizar la preparación de los geles separadores, se agregaron 150 μ l de isopropanol a cada uno para evitar las burbujas y que no se formen de manera adecuada los pozos. Pasados 30 minutos con papel filtro se limpió la cantidad de isopropanol que quedó en el gel.
- d)** Seguido, se preparó el gel concentrador o de carga. Para este gel se tomó un volumen de 6 mL. También se alistaron los moldes de los pozos para colocarlos inmediatamente después de haber agregado el gel concentrador.
- e)** Teniendo en cuenta el cálculo que se hizo para la cuantificación de proteína y saber cuánto se cargó en el gel, se procedió a colocar los geles en la maquinaria para la electroforesis en el gel de poliacrilamida al 11% (SDS-PAGE). Se prepararon 500 mL de buffer de corrida al 10X.
- f)** Continuando con el procedimiento, se cargaron las muestras a estudiar en los pozos respectivos con el volumen adecuado, el cual fué calculado para 30 μ g de proteína. Antes de haber cargado la muestra, se colocó el marcador de peso molecular (5 μ l), y marcador

de peso biotinilado (6 μ l) para saber en qué parte estaría la proteína que se desea ver al cortar y revelar la membrana.

- g)** Al finalizar la carga de las muestras en los pozos, se procedió a colocar los cátodos y ánodos de manera correcta en la cámara de la electroforesis a 60 V y finalmente se subió a 100V.
- h)** Finalizándose la corrida se preparó el Buffer de transferencia 10x en una probeta de 1000mL.
- i)** Al finalizarse la corrida del gel, se desconectó la maquinaria y se desmontaron los vidrios con los geles. Estos se colocaron en una cubeta con el buffer de transferencia que se preparó anteriormente, y con ayuda de un peine fué deslizándose suavemente el vidrio del gel, quedándose en la cubeta con el buffer de transferencia. Con ayuda del peine, se cortaron los lados que sobaban del gel para luego colocarlo en las esponjas en posición adecuada.
- j)** En la misma bandeja donde se encuentra el gel, se hidrataron las esponjas que sirvieron para ensamblar el cassette y hacer la respectiva transferencia de la proteína. El gel que se quedó en el buffer de transferencia, se colocó encima de las esponjas y seguido a esto se agregó una membrana de nitrocelulosa, con el mismo tamaño al gel inicial. Luego se colocaron otras esponjas que permitieron hacer presión para realizarse la transferencia, y al final mediante un tubo de ensayo se eliminaron todas las burbujas posibles, evitando que alguna de ellas quedara justo donde se realizaría la transferencia de la proteína de interés.
- k)** Se cerró el sistema y se llevó a su respectiva base, teniendo en cuenta la posición del ánodo y el cátodo para hacer de manera correcta la transferencia de la proteína.
- l)** Esta transferencia se realizó durante 65 minutos a 250 A y a una temperatura de 4°C.
- m)** Finalizándose los 65 minutos de la transferencia, se abrió el sistema donde estaban las membranas y se aislaron con cuidado. Estas membranas fueron colocadas en una cubeta para colorearlas con el rojo ponceau, se agitaron seguidamente y con este colorante se observó una buena transferencia de la proteína sobre la membrana.

Finalmente se lavó el rojo ponceau con un poco de agua destilada y este fué regresado a su recipiente.

- n)** Teniendo en cuenta los pesos moleculares de las proteínas de interés (55 kDa para CYP2C11 y 58 kDa para CYP2J3), se cortaron las membranas al nivel de su respectiva proteína para luego exponerlas a los anticuerpos primarios y secundarios. Cada membrana fue guardada en su respectiva caja para luego proceder con sus exposiciones a la solución de bloqueo y a sus anticuerpos.
- o)** Al realizarse una buena transferencia de la proteína, se preparó la solución de bloqueo: BSA al 5%, donde se pesó 1 g de BSA en 20 mL de TTBS.
- p)** Las membranas fueron expuestas a la solución de bloqueo durante dos horas, y estuvieron lentamente en constante movimiento.
- q)** Al finalizarse las 2 horas de la solución de bloqueo, esta se guardó en su respectivo recipiente a una temperatura de 4°C. Seguido a esto, se prepararon los anticuerpos primarios con sus respectivas diluciones para la proteína de interés en una solución de BSA al 0.5%.
- r)** Durante toda la noche se dejaron expuestos los anticuerpos primarios con sus respectivas membranas, a una temperatura 4°C.
- s)** Seguido a la finalización de la exposición del anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados de 10 minutos aproximadamente cada uno, con TTBS a cada una de las membranas. Estos lavados se hacen en continua agitación.
- t)** Al finalizar los lavados con TTBS, las membranas se expusieron a su respectivo anticuerpo secundario en las diluciones adecuadas. Estos anticuerpos secundarios también fueron preparados en solución de BSA al 0.5%. El tiempo de exposición al anticuerpo secundario fue de 1 hora aproximadamente y este se dejó en constante agitación.
- u)** Seguido al tiempo de exposición con el anticuerpo secundario, se procedió a lavar las membranas tres veces por 10 minutos con el TTBS nuevamente. Estos lavados se hicieron en continua agitación.
- v)** Terminado el tiempo de los lavados con el TTBS, se preparó el kit de revelado: Luminol y se revelaron las membranas en el fotodocumentador. Cada una de ellas tuvo su respectiva foto la cual

fué guardada en formato tif. Para la preparación del Luminol, se tomaron 600 µl de la solución A y de la solución B, las cuales fueron mezcladas respectivamente en un vial. En una cubeta se colocó la respectiva membrana a revelar con la mezcla de la solución A+B y luego se agregaron 600 µl de agua destilada. Con la pipeta se fué bañando homogéneamente la membrana con su respectivo luminol para finalmente exponerla a la luminiscencia, y tomar las respectivas fotos teniendo en cuenta el número de exposiciones y el tiempo determinado para cada membrana.

La solución **A** está compuesta por Luminol e hidróxido de sodio, la solución **B** está compuesta por ferricianuro potásico y peróxido de hidrógeno. El Luminol y el peróxido de hidrógeno reaccionan y liberan energía fotónica formando quimioluminiscencia con un color azulado y brillante, mientras que el ferricianuro potásico y el H₂O₂ actúan como catalizador en la reacción.

5. Detección de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β mediante kits de ELISA.

- a)** Inicialmente se agregó el volumen requerido para adicionar la curva en las diferentes pruebas para las citocinas. Luego, se agregó la cantidad de las muestras a evaluar y por duplicado.
- b)** Al tener la placa con la curva y las muestras, se agitó con unos suaves y ligeros toques, cubriéndose con una tapa adhesiva e incubándose a temperatura ambiente por 1 ó 2 horas respecto a la ELISA a evaluar en ese momento: TNF- α , IL-6 o IL-1 β .
- c)** Al final del tiempo establecido se quitó la tapa adhesiva y se descartó el contenido de la placa, lavándose varias veces con el buffer de lavado anteriormente preparado.
- d)** Se vertió la placa en una sanita para eliminar las trazas de buffer de lavado que quedaban, seguido a esto se agregó el anticuerpo biotinilado y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. La placa se cubrió con su tapa adhesiva.

- e)** Al finalizar el tiempo requerido, se tiró el anticuerpo biotinilado y se lavó con el buffer de lavados respectivo para cada citocina.
- f)** Se vertió la placa en una sanita para eliminar las trazas de buffer de lavado que quedaban, y se agregó a cada pozo la solución preparada de Streptavidin HRP, dejándose incubar por 30 min a temperatura ambiente con la placa cubierta.
- g)** Se removió el contenido anterior de la placa y se lavó varias veces con el buffer de lavados respectivo para cada citocina a evaluar. También la placa se vertió en una sanita para eliminar las trazas de buffer de lavado y que no interfirieran con las lecturas.
- h)** Se agregó el volumen requerido de TMB en cada pozo, y se dejó incubando en oscuridad por sólo 10 minutos, formándose un producto de color azul soluble en agua. Éste no se descartó, y a continuación fue agregada la solución de STOP; la reacción produjo un color amarillo y la placa fue leída rápidamente a 450 nm y 550 nm.
- i)** Finalmente se obtuvieron las lecturas y se hicieron los respectivos cálculos para detectar la cantidad de estas citocinas, de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

6. Método de Análisis estadístico

Con el fin de verificar los supuestos para determinar si es posible realizar un análisis paramétrico, usamos el coeficiente estandarizado de Fisher-Pearson del tercer momento (sesgo) para probar si podemos considerar que los datos obtenidos en los experimentos provienen de una distribución Normal. Para verificar si existe homogeneidad de varianza utilizamos la prueba de Levene.

Dado que los datos obtenidos en este proyecto si cumplen con los supuestos anteriores, utilizamos un ANOVA con dos variables independientes (conocido también como de dos vías) para poder analizar estadísticamente los resultados en los diferentes tiempos probados, el efecto del LPS comparado vs los controles y así como poder determinar si hay o no hay interacción entre estas dos variables. Como análisis “post-hoc” para comparaciones múltiples usamos la prueba de rango múltiple de Ryan Einot Gabriel y Welsch; seleccionamos ésta prueba ya que además de controlar que el error tipo I (decir que hay diferencia entre tratamientos cuando en realidad no la hay) global sea correcto, tiene un error tipo II (decir que no hay diferencia entre tratamientos cuando en realidad si la hay) menor que otras pruebas para comparaciones múltiples.

X. Resultados

1. Evaluación de marcadores de microglía y astrocitos

Se evaluó el efecto neuroinflamatorio causado por el LPS en la corteza cerebral mediante la detección de la proteína GFAP como marcador de activación astrocítica por inflamación. Mientras que no se observaron cambios en los grupos control inyectados con salina en los grupos con tratamiento de LPS, se observa un incremento significativo a las 12, 24 y 48 horas del tratamiento (**Fig. 8 y 9**). Las bandas de GAPDH se usaron como control endógeno.

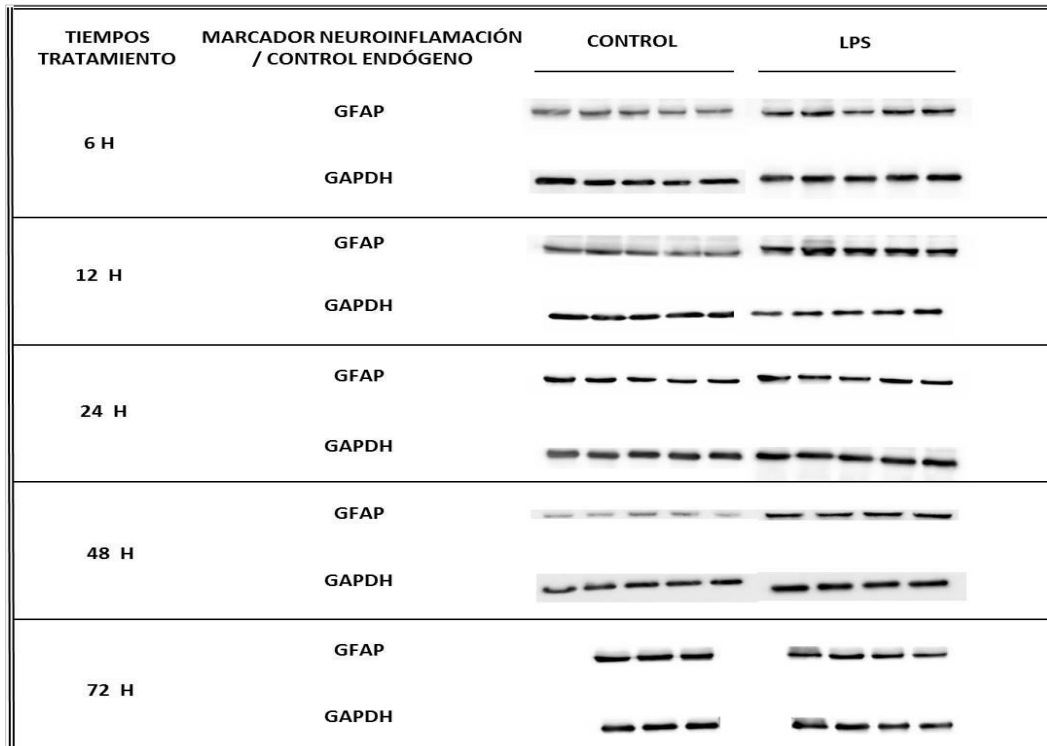


Fig. 8. Inmunodetección por Western Blot de los niveles de proteína GFAP en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg LPS a diferentes tiempos. La imagen muestra las bandas obtenidas a partir de una separación de 30 μ g de proteína total mediante su electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Los resultados se obtuvieron a partir de 3 a 5 animales por cada grupo control y tratados con LPS.

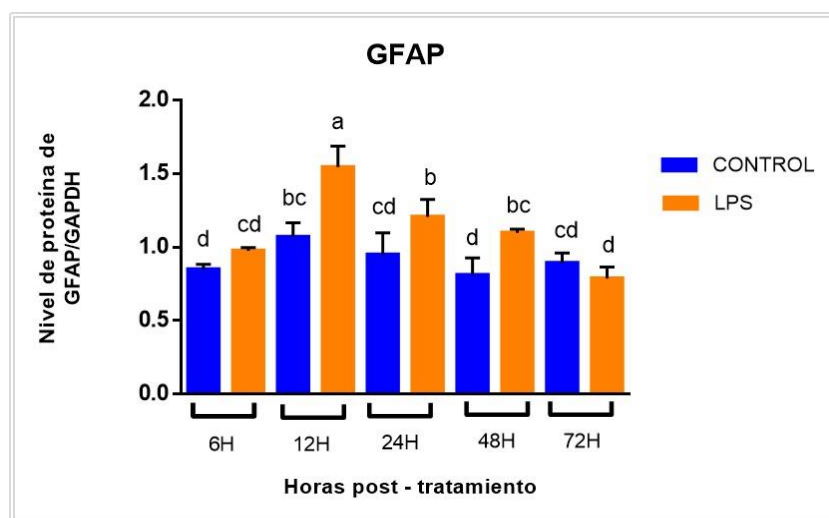


Fig. 9. Densitometría de los niveles de proteína de GFAP en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg LPS a diferentes tiempos. La gráfica muestra

los promedios de las densitometrías que se obtuvieron con el software ImageJ, de las imágenes de Western Blot. Los niveles de expresión de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD (n=3-5). Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ).

Se evaluó el nivel de Iba-1 como marcador de activación de la microglía, en corteza cerebral. Las **Figuras 10 y 11** nos muestran que no hay diferencias significativas con respecto a los tratamientos evaluados a las diferentes horas, sólo se observa un aumento significativo a las 24 horas en las muestras de tejido que fueron tratadas con LPS.

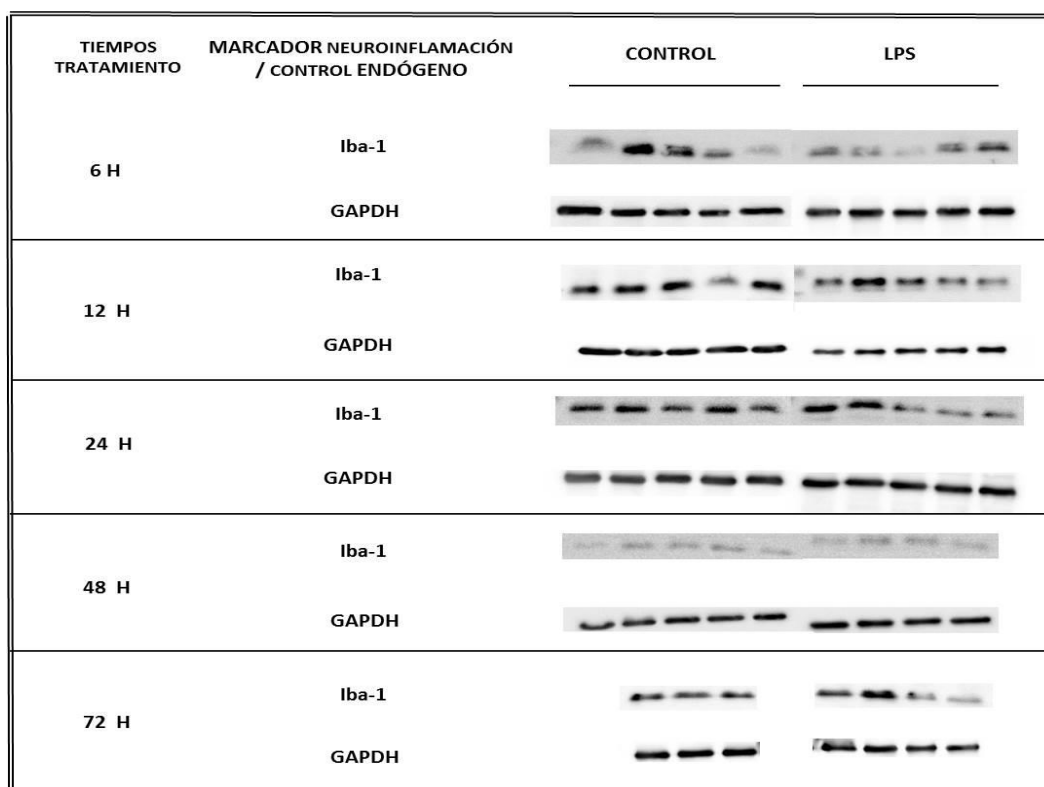


Fig. 10. Inmunodetección por Western Blot de los niveles de proteína de Iba-1 en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg LPS a diferentes tiempos. La imagen muestra las bandas obtenidas a partir de una separación de 30 μ g de proteína total mediante su electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Los resultados se obtuvieron a partir de 3 a 5 animales por cada grupo control y de tratamiento con LPS.

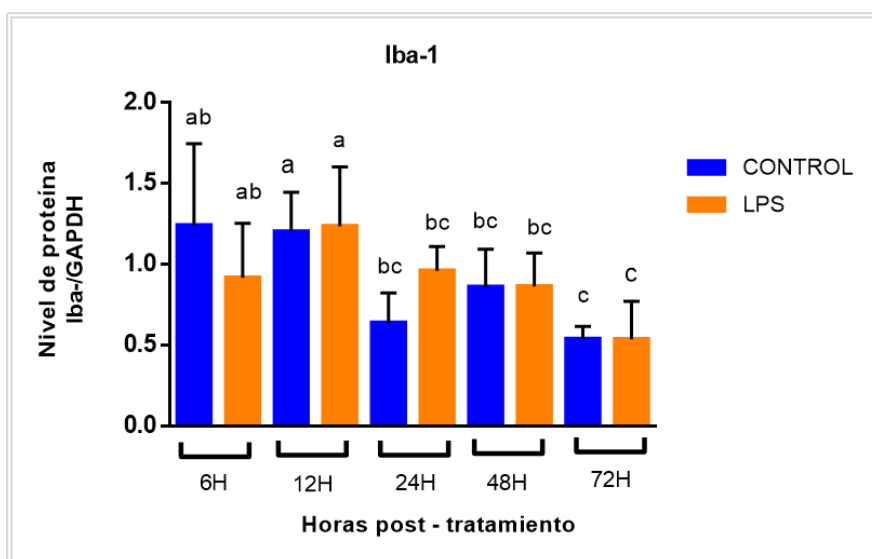


Fig. 11. Densitometría de los niveles de proteína de Iba-1 en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg LPS a diferentes tiempos. La gráfica muestra los promedios de las densitometrías que se obtuvieron con el software ImageJ, obtenidas de las imágenes de Western Blot. Los niveles de expresión de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD (n=3-5). Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ)

Cuantificación de la expresión transcripcional

1.1. Cuantificación del RNA

Para evaluar la cantidad de RNA obtenido en la corteza cerebral de cada uno de los individuos con y sin tratamiento de LPS, se leyó la pureza de 2 μ l de RNA en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NANODROP 2000). Para medir la pureza del RNA (**Tabla 2 y 3**), se separó una alícuota de cada muestra obtenida. Este espectrofotómetro leyó la absorbancia a una longitud de onda entre 260 y 280 nm, llevándose a cabo la relación 260/280, teniendo en cuenta que para obtener un RNA de buena calidad, esta relación debe estar por encima de 1.8 indicando que el RNA está puro. Los valores que se observan en la **Tabla 2 y 3**, indican que el RNA obtenido tanto en las muestras control como en las muestras

tratadas con LPS, está en una relación por encima de 1.8, lo que nos indica que el RNA es de buena calidad.

Muestras control (Solución salina):

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Ty	Factor
1	24 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 04:52:46 p. m.	327.3	ng/μl	818.3	4.411	1.86	2	RNA	40
2	13 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 04:55:59 p. m.	263.5	ng/μl	658.9	3.603	1.83	1.83	RNA	40
3	33 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 04:57:31 p. m.	625.2	ng/μl	156.3	7.908	1.98	2.05	RNA	40
4	17 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:00:35 p. m.	1060.2	ng/μl	265.04	132.83	2	1.85	RNA	40
5	47 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:02:13 p. m.	405.7	ng/μl	101.42	542.3	1.87	1.9	RNA	40
6	44 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:03:27 p. m.	625.1	ng/μl	156.29	778.2	2.01	2.12	RNA	40
7	8 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:07:11 p. m.	1041.6	ng/μl	260.41	131.37	1.98	1.81	RNA	40
8	19 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:08:45 p. m.	844.2	ng/μl	211.05	108.31	1.95	2.02	RNA	40
9	36 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:11:07 p. m.	691.8	ng/μl	172.94	881.1	1.96	2.17	RNA	40
10	11 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:12:44 p. m.	576.4	ng/μl	144.1	793.4	1.82	2.06	RNA	40
11	32 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:17:17 p. m.	992.5	ng/μl	248.13	125.24	1.98	1.96	RNA	40
12	18 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:18:37 p. m.	892.6	ng/μl	223.15	113.48	1.97	1.9	RNA	40
13	26 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:20:22 p. m.	501.2	ng/μl	125.3	666.4	1.88	2.02	RNA	40
14	16 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:21:47 p. m.	695.7	ng/μl	173.92	880.5	1.98	1.88	RNA	40
15	30 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:22:56 p. m.	748	ng/μl	186.99	975.2	1.92	1.94	RNA	40
16	28 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:24:08 p. m.	852.4	ng/μl	213.11	110.13	1.94	1.66	RNA	40
17	14 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:26:01 p. m.	885.8	ng/μl	221.44	113.34	1.95	2.05	RNA	40
18	41 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:27:14 p. m.	717.1	ng/μl	179.27	916.6	1.96	1.64	RNA	40
19	20 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:28:56 p. m.	966.2	ng/μl	241.56	125.67	1.92	1.42	RNA	40
20	38 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:30:19 p. m.	625.9	ng/μl	156.46	806.9	1.94	1.72	RNA	40
21	31 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:31:33 p. m.	521.3	ng/μl	130.33	661.8	1.97	1.34	RNA	40
22	22 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:32:49 p. m.	440	ng/μl	109.99	584.2	1.88	1.77	RNA	40
23	29 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:34:07 p. m.	607.9	ng/μl	151.97	768.2	1.98	1.31	RNA	40
24	7 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:35:43 p. m.	387.1	ng/μl	967.9	516.1	1.88	1.3	RNA	40
25	5 CORT CONT	Usuario	23/01/2017 05:37:29 p. m.	520.7	ng/μl	130.17	685.4	1.9	1.49	RNA	40

Tabla 2. Medida de la pureza de RNA total de la corteza cerebral, mediante programa NANODROP 2000/2000C. Cantidad de ácido nucleico (RNA) obtenido de las muestras de corteza sin tratamiento. Su pureza está bajo la relación de 260/280, mayores a 1.8. Cantidad de RNA analizado: 2μl por cada muestra.

Muestras Tratadas (LPS 1mg/Kg):

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	2 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:00:55 a. m.	485.1	ng/μl	12.128	6.364	1.91	1.95	RNA	40
2	15 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:04:35 a. m.	594.7	ng/μl	14.869	8.491	1.75	1.69	RNA	40
3	6 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:13:50 a. m.	425.3	ng/μl	10.631	5.661	1.88	1.14	RNA	40
4	45 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:10:43 a. m.	1183.3	ng/μl	29.582	15.179	1.95	2.1	RNA	40
5	35 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:16:58 a. m.	497.9	ng/μl	12.448	6.643	1.87	1.81	RNA	40
6	12 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:23:58 a. m.	954.1	ng/μl	23.851	12.324	1.94	2.18	RNA	40
7	1 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:20:33 a. m.	352.3	ng/μl	8.806	4.747	1.86	2.07	RNA	40
8	42 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:38:27 a. m.	468.1	ng/μl	11.703	6.328	1.85	2.14	RNA	40
9	37 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:27:20 a. m.	513.8	ng/μl	12.844	6.771	1.9	2.02	RNA	40
10	34 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:31:10 a. m.	612	ng/μl	15.299	8.1	1.89	1.9	RNA	40
11	40 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:34:55 a. m.	628.6	ng/μl	15.715	8.313	1.89	2.01	RNA	40
12	46 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:41:46 a. m.	2180	ng/μl	5.45	3.006	1.81	2.06	RNA	40
13	50 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:48:54 a. m.	351.8	ng/μl	8.794	4.726	1.86	2.15	RNA	40
14	39 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:45:09 a. m.	491.3	ng/μl	12.283	6.588	1.86	1.96	RNA	40
15	10 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:52:08 a. m.	798	ng/μl	19.95	10.482	1.9	2.19	RNA	40
16	21 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:55:55 a. m.	611.4	ng/μl	15.286	8.04	1.9	2.01	RNA	40
17	25 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 11:59:03 a. m.	412.2	ng/μl	10.305	5.623	1.83	1.86	RNA	40
18	27 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:06:36 p. m.	748.9	ng/μl	18.723	9.803	1.91	1.46	RNA	40
19	23 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:03:18 p. m.	800.5	ng/μl	20.013	10.643	1.88	2.17	RNA	40
20	3 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:10:37 p. m.	730.6	ng/μl	18.264	9.654	1.89	2.22	RNA	40
21	4 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:14:22 p. m.	930.1	ng/μl	23.253	12.273	1.89	1.98	RNA	40
22	9 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:18:28 p. m.	599.3	ng/μl	14.983	8.026	1.87	2.15	RNA	40
23	48 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:21:52 p. m.	881.4	ng/μl	22.036	11.891	1.85	2.25	RNA	40
24	43 CORTEZA TRATADA	Mónica	26/01/2017 12:25:13 p. m.	716.7	ng/μl	17.918	9.489	1.89	2.22	RNA	40

Tabla 3. Medida de la pureza de RNA total de la corteza cerebral, mediante programa NANODROP 2000/2000C. Cantidad de ácido nucleico (RNA) obtenido de las muestras de corteza tratadas con LPS (1mg/Kg). Su pureza está bajo la relación de 260/280, mayores a 1.8. Cantidad de RNA analizado: 2μl por cada muestra.

1.2. Integridad del RNA

Para evaluar la integridad del RNA obtenido de corteza cerebral, se preparó un gel de agarosa al 1% y las muestras de cada control y tratamiento fueron corridas en una cámara de electroforesis. Cada pozo en el gel de agarosa tuvo un volumen de 3.0 μ l. Las bandas 18 s y 28 s que indican las subunidades ribosomales, se observaron mediante el uso de bromuro de etidio como marcador de fluorescencia. En las Figuras 5 y 6 no se observó degradación de ninguna de las bandas evaluadas, concluyéndose así que el RNA que se obtuvo fue de buena calidad.

Muestras controles 6, 12, 24, 48 y 72 hrs.

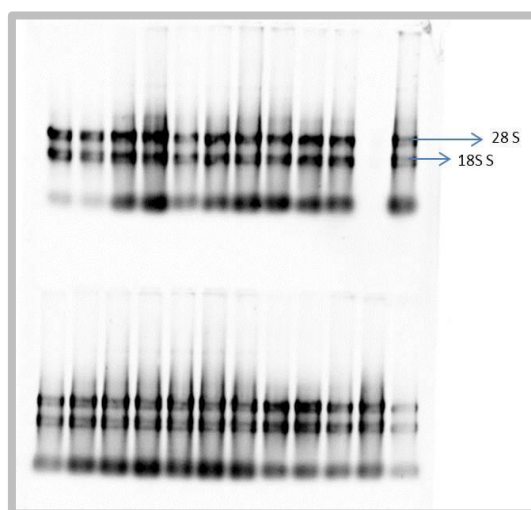


Fig. 12. Integridad de los RNA's totales de la corteza cerebral sin tratamiento. Imagen de la electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Bandas definidas de 28 S y 18 S de los RNA ribosomales. Cada carril contiene 1 μ g de RNA aproximadamente. La muestra 32 no se cargó en su pozo.

Muestra tratadas: 6, 12, 24, 48 y 72 hrs.

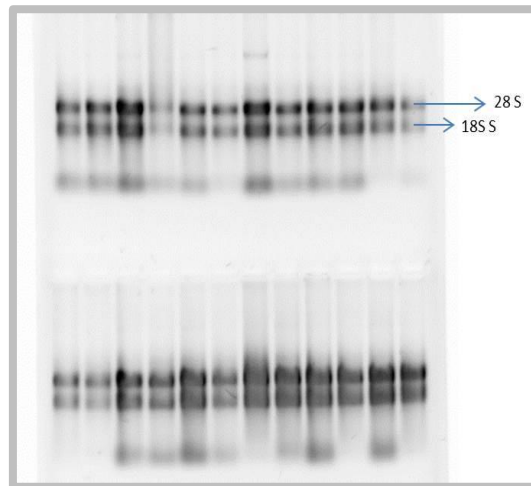


Fig. 13. Integridad de los RNA's totales de la corteza cerebral con tratamiento (LPS). Imagen de la electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Bandas definidas de 28 S y 18 S de los RNA ribosomales. Cada carril contiene 1µg de RNA aproximadamente.

1.3. Expresión transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11* por qRT-PCR

Niveles de expresión de *Cyp2j3*/GAPDH

Para evaluar el efecto del LPS sobre el nivel de expresión del mRNA en corteza cerebral de ***Cyp2j3*** en los grupos control y grupos tratados se realizó qRT-PCR, usándose como control endógeno a GAPDH (**Fig. 14**). Los resultados obtenidos no hay diferencias significativas para *Cyp2j3* con respecto a cada uno de sus controles en los tiempos establecidos para el tratamiento con el LPS.

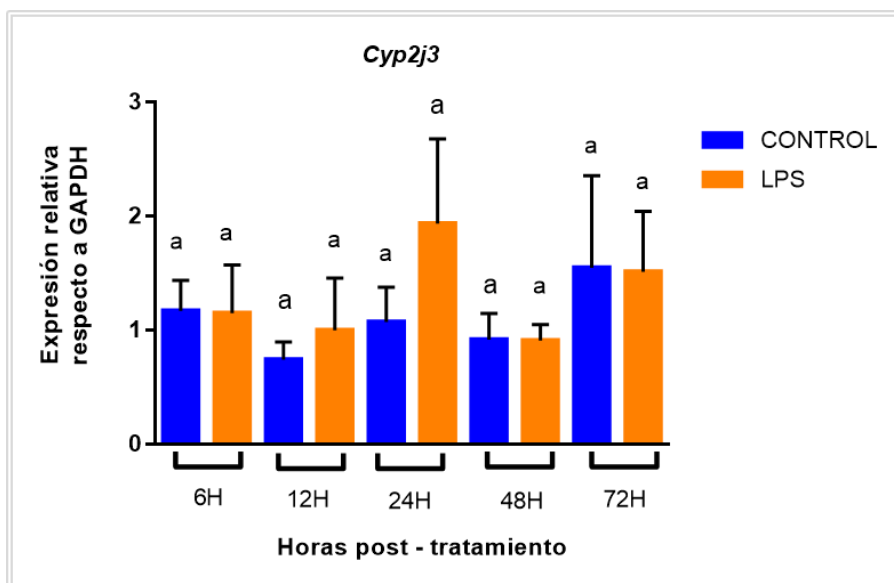


Fig. 14. Nivel de expresión del mensajero de *Cyp2j3* en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg de LPS. El nivel de expresión relativa para *Cyp2j3* fue evaluado por qRT-PCR. Los niveles de expresión del mensajero se muestran en relación con GAPDH \pm SD, en tejido de corteza cerebral durante la inflamación inducida por LPS a diferentes horas del tratamiento. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ)

Niveles de expresión de *Cyp2c11*/GAPDH

Para evaluar el efecto del LPS sobre el nivel de expresión del mRNA en la corteza cerebral de *Cyp2c11* en los grupos control y grupos tratados, se realizó qRT-PCR, usándose como control endógeno a GAPDH (**Fig. 15**). En los resultados obtenidos, se observó que sólo a las 6 horas hubo un incremento significativo para *Cyp2c11* con respecto a su control; mientras que para las otras horas de tratamiento no se encontraron cambios significativos.

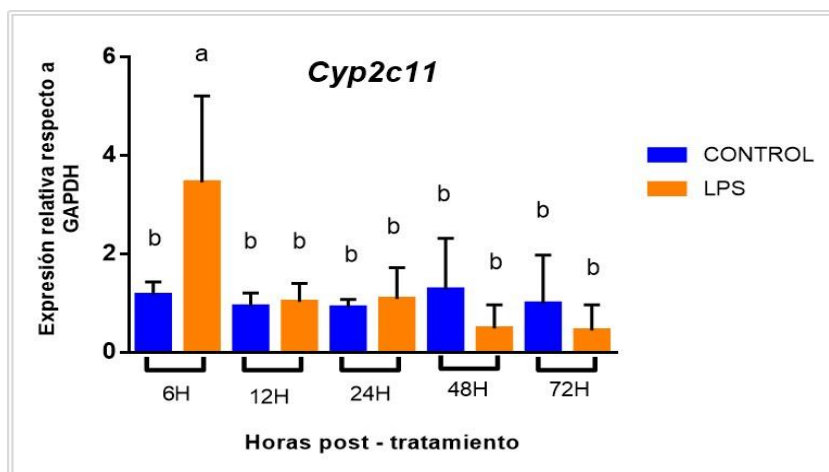


Fig. 15. Nivel de expresión del mensajero de *Cyp2c11* en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg de LPS. El nivel de expresión relativa para *Cyp2c11* fue evaluado por qRT-PCR. Los niveles de expresión del mensajero se muestran en relación con GAPDH \pm SD, en tejido de corteza cerebral durante la inflamación inducida por LPS a diferentes horas del tratamiento. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ)

2. Cuantificación de los niveles de proteína de los CYP por Western Blot

Proteína CYP2J3.

Para evaluar el efecto producido por LPS en el nivel de proteína para CYP2J3, se usó la técnica de Western Blot. Se observa (**Fig. 16**) una menor intensidad de las bandas en los grupos tratados a los diferentes tiempos con respecto a su control de manera significativa (**Fig. 17**). Las bandas de GAPDH fueron usadas como control endógeno.

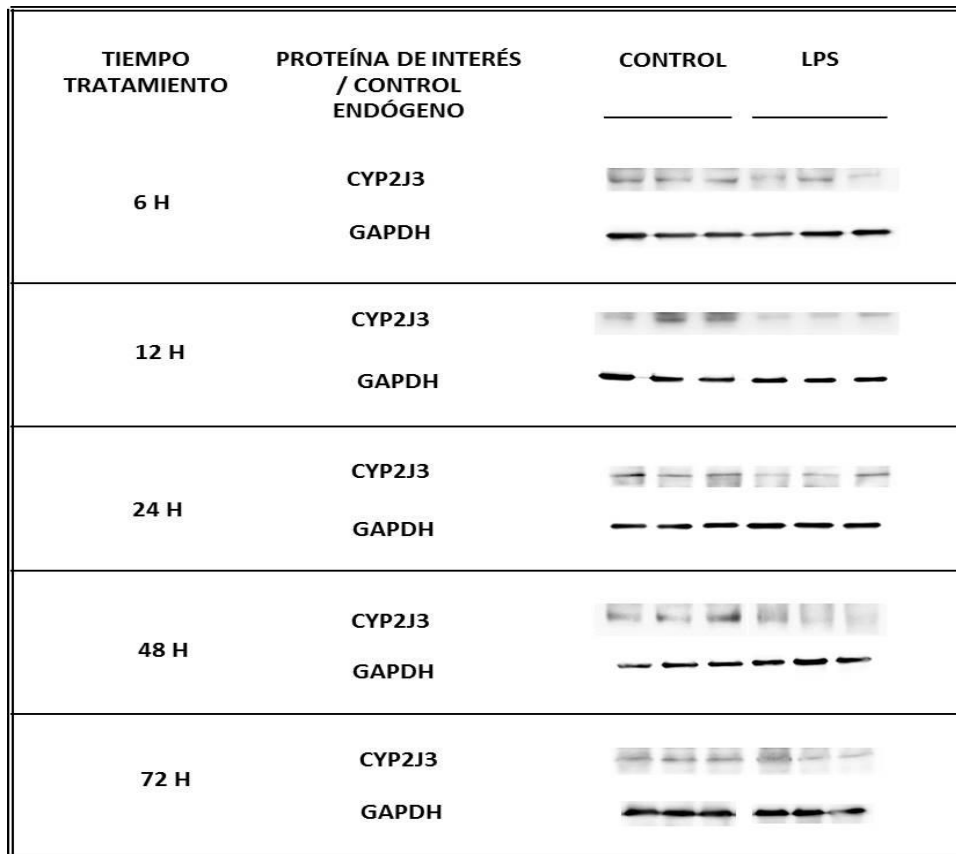


Fig. 16. Inmunodetección por Western Blot de los niveles de proteína del CYP2J3 en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg de LPS a diferentes tiempos. La imagen muestra las bandas obtenidas a partir de una separación de 30 μ g de proteína total mediante su electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Los resultados se obtuvieron a partir de 3 a 5 animales por cada grupo control y tratados con LPS.

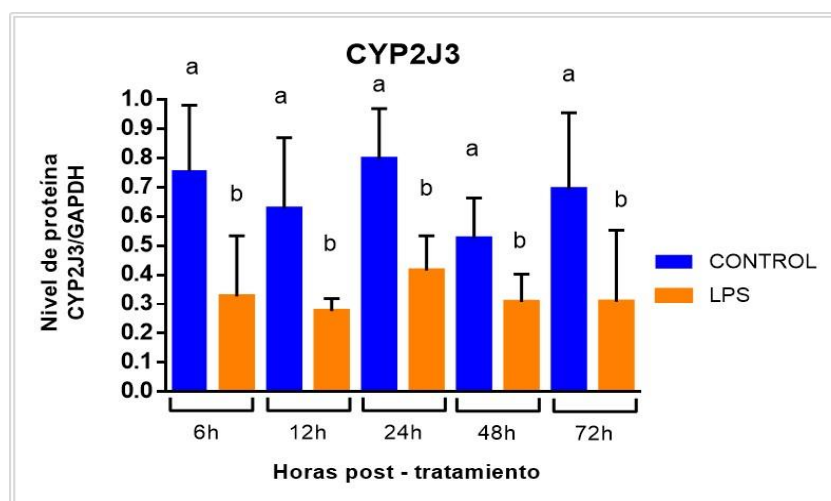


Fig. 17. Densitometría de los niveles de proteína del CYP2J3 en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg de LPS a diferentes tiempos La gráfica muestra los promedios de las densitometrías que se obtuvieron con el software ImageJ, obtenidas de las imágenes de Western Blot. Los niveles de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD (n=4 - 5) .Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ)

Proteína CYP2C11.

Para evaluar el efecto producido por LPS en el nivel de proteína para CYP2C11, se usó la técnica de Western Blot. Se observa una menor intensidad de las bandas en los grupos tratados a los diferentes tiempos con respecto a su control (**Fig. 18**), obteniéndose una disminución de manera significativa para los diferentes tiempos evaluados (**Fig. 19**). Las bandas de GAPDH fueron usadas como control endógeno.

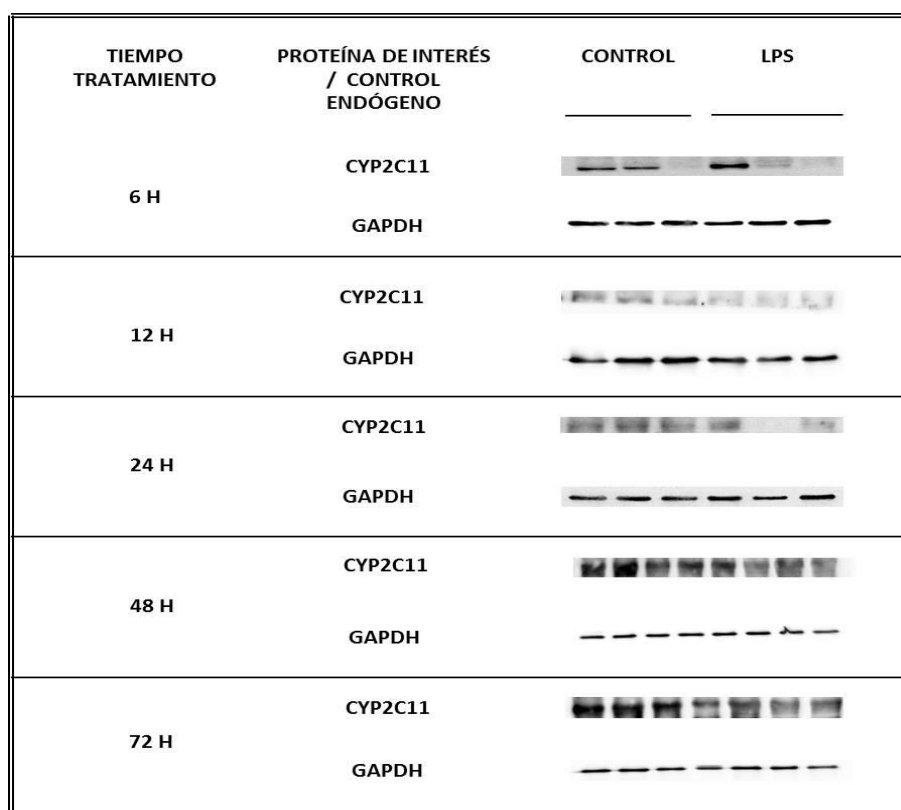


Fig. 18. Inmunodetección por Western Blot de los niveles de proteína del CYP2C11 en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg de LPS a diferentes tiempos. La imagen muestra las bandas obtenidas a partir de una separación de 30 μ g

de proteína total mediante su electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Los resultados se obtuvieron a partir de 3 a 5 animales por cada grupo control y tratados con LPS.

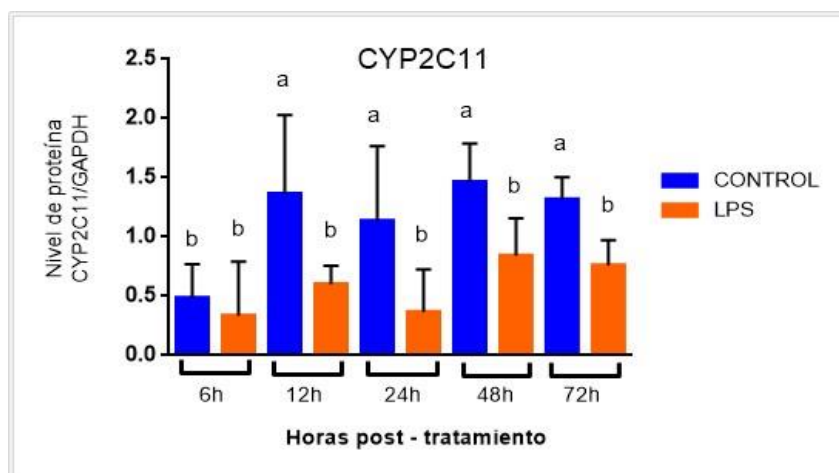


Fig. 19. Densitometría de los niveles de proteína del CYP2C11 en la corteza cerebral de ratas tratadas y sin tratar con 1 mg/kg de LPS a diferentes tiempos. La gráfica muestra los promedios de las densitometrías que se obtuvieron con el software ImageJ, obtenidas de las imágenes de Western Blot. Los niveles de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD (n=4 - 5). Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ)

Cuantificación de las citocinas pro-inflamatorias

Para evaluar también la actividad inflamatoria inducida por el LPS en la corteza cerebral, se evaluó el contenido de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Su detección fue realizada bajo un kit de ELISA para cada proteína.

TNF- α (Factor de necrosis tumoral)

Para evaluar la actividad inflamatoria inducida por el LPS en la corteza cerebral, se cuantificó el nivel de TNF- α mediante un kit de ELISA. En la (**Fig. 20**) se observa un incremento significativo de esta citocina en los tiempos evaluados para los grupos tratados comparados con sus grupos control, especialmente a las 48 y 72 horas del tratamiento.

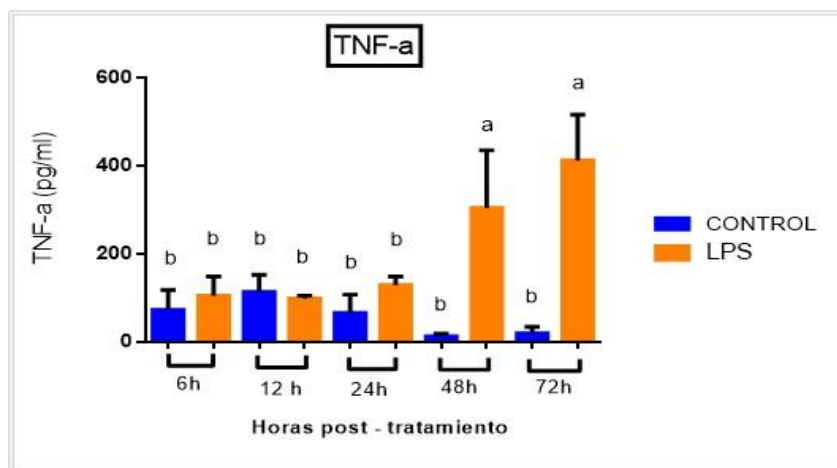


Fig. 20. Cuantificación de los niveles de TNF- α en la corteza cerebral a diferentes tiempos post-tratamiento con LPS. La imagen muestra el efecto del LPS a una dosis de 1mg/Kg, en los niveles de la proteína de **TNF- α** , determinados por un kit de ELISA a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Los niveles de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ).

IL-6 (Interleucina-6)

Para evaluar la actividad inflamatoria inducida por el LPS en la corteza cerebral, se cuantificó el nivel de IL-6. El incremento de ésta citocina pro-inflamatoria sólo se diferenció a las 6 horas del tratamiento, mientras que para los demás tiempos no hubo cambios significativos, con respecto a su control.

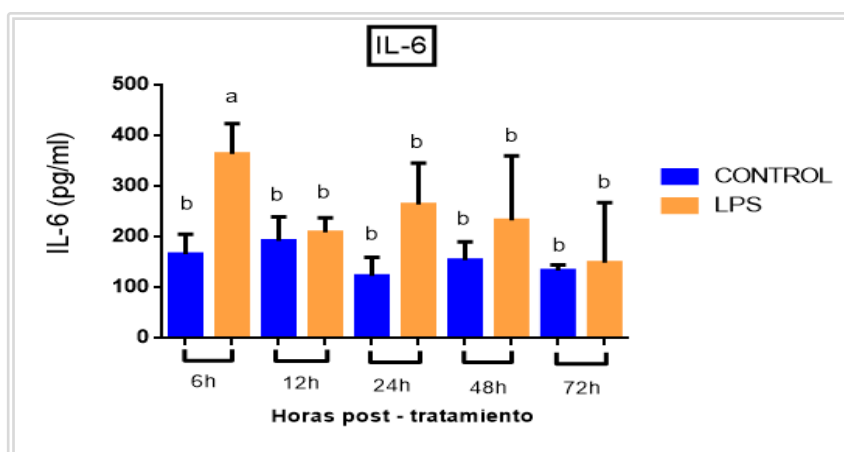


Fig. 21. Cuantificación de los niveles de IL-6 en la corteza cerebral a diferentes tiempos post-tratamiento con LPS. La imagen muestra el efecto del LPS a una dosis de 1mg/Kg, en los niveles de la proteína de **IL-6**, determinados por un kit de ELISA a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Los niveles de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ).

IL-1 β (Interleucina 1 β)

Para evaluar la actividad inflamatoria inducida por el LPS en la corteza cerebral, se cuantificó el nivel de IL-1 β . No se observaron cambios significativos de ésta proteína con respecto a cada uno de sus controles en los tiempos evaluados.

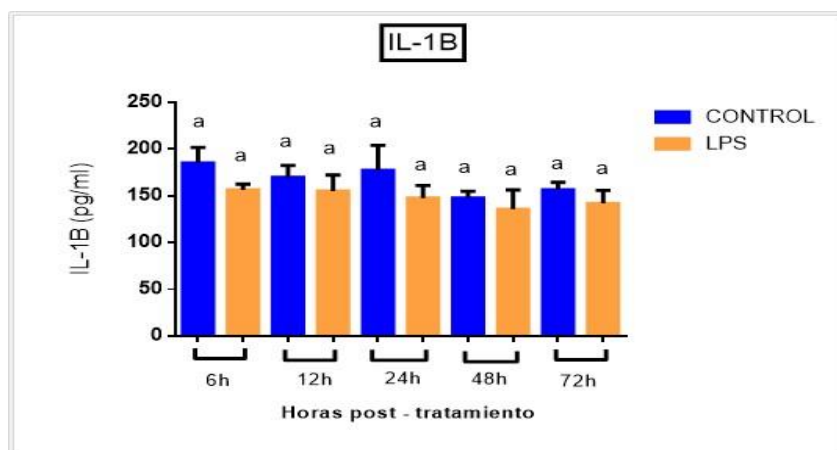


Fig. 22. Cuantificación de los niveles de IL-1 β en la corteza cerebral a diferentes tiempos post-tratamiento con LPS. La imagen muestra el efecto del LPS a una dosis de 1mg/Kg, en los niveles de la proteína de **IL-1 β** , determinados por un kit de ELISA a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Los niveles de expresión de proteína, se muestran en relación con GAPDH \pm SD. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras corresponden a la prueba de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ).

XI. Análisis de resultados y Discusión

Las subfamilias 2C y 2J de los CYPs son enzimas que se han caracterizado por tener la mayor actividad epoxigenasa, las cuales al metabolizar el AA generan metabolitos de gran importancia biológica, con diversas funciones como: vasodilatadores, angiogénicos, anti-apoptóticos, anti-epilépticos, anti-nociceptivos y anti-inflamatorios (**Kozak et al. 2000, Iliff et al. 2010**). Al mismo tiempo, se sabe que procesos de inflamación e infección inducen cambios en los niveles de expresión de los CYPs (**Anwar-mohamed et al. 2010, Nicholson and Renton 1999, Zordoky and El-Kadi 2009**)(**Navarro-Mabarak et al. 2019**) Por lo tanto, en este trabajo, se generó un modelo de neuroinflamación y se evaluó la expresión transcripcional y los niveles de proteína del CYP2C11 y CYP2J3 en la corteza cerebral.

Como primer paso, se evaluaron algunos parámetros de la respuesta neuroinflamatoria en el cerebro de ratas tratadas con LPS i.p. (1mg/Kg). Para esto, se determinó el aumento de la expresión de astrocitos y microglía mediante GFAP e Iba-1. En los resultados se puede observar que el nivel de proteína de GFAP en las ratas tratadas, incrementa significativamente con respecto al control a las 12, 24 y 48 horas del tratamiento, sugiriendo la presencia de astrocitos activados, característica de los procesos neuroinflamatorios (**Fig. 8 y 9**). Sin embargo no se detectaron cambios en el contenido del marcador de microglía Iba-, excepto un ligero incremento a las 24 horas. (**Fig. 10 y 11**). Se esperaba que como resultado del proceso neuroinflamatorio, hubiera un incremento significativo en los niveles de Iba-1, marcador de la activación microglial, Sin embargo la respuesta fue muy heterogénea entre los animales expuestos al LPS. Esto puede ser atribuido a las diferencias en el número de la microglía presente en el sistema evaluado, en este caso, la corteza cerebral. Así mismo, la susceptibilidad diferencial al LPS puede deberse al mismo motivo, ya que dependiendo de la cantidad de microglía presente en la muestra, la respuesta puede ser exacerbada o disminuida, como se ha visto en cultivos de neuronas mesencefálicas, donde hay mayor cantidad de microglía que en cultivos de neuronas de hipocampo y corteza cerebral. (**Kim et al.**

2000)(Lawson et al. 1990) También debe considerarse que el contenido de Iba-1 no necesariamente tiene que aumentar ya que lo reportado en microglía activada es un cambio en su morfología y, por ende, una redistribución celular de esta proteína. Estos resultados se podrían corroborar viendo la presencia de una proteína más específica de activación microglial. Sin embargo, tomando en cuenta la respuesta homogénea y consistente de la activación astrocitaria detectada, y así mismo el incremento significativo de los niveles de GFAP, se pudo observar que con la dosis utilizada de LPS, la vía de administración utilizada (i.p.), y los tiempos de tratamiento utilizados, se estableció un modelo *in vivo* de neuroinflamación.

En cuanto al efecto de la neuroinflamación en la expresión transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, en estudios previos se ha observado que el nivel transcripcional para estos genes disminuyó en diferentes órganos, como corazón, riñón e hígado de rata en un modelo de inflamación sistémica mediante la administración i.p. de LPS a una dosis de 1mg/Kg (**Anwar-mohamed et al. 2010**). En nuestro modelo de inflamación en el cerebro, los resultados obtenidos a nivel transcripcional para *Cyp2j3* (**Fig. 14**) y *Cyp2c11* (**Fig.15**) no mostraron cambios como lo reportado en otros órganos (**Anwar-mohamed et al. 2010**). Estos resultados pueden indicar que la regulación en el cerebro de estos citocromos puede estar sucediendo en magnitudes diferentes o en tiempos más cortos. Durante las horas anteriores al tratamiento 6, 12, 24, 48, y 72, la expresión transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11* se pudo haber estabilizado, es decir que a ese tiempo su expresión retornó a sus niveles normales, y por eso no hay diferencias con respecto al control, mientras que su regulación a la baja pudo haber iniciado antes de las 6 horas establecidas para el experimento. Se ha visto que la administración i.p. sistémica de LPS causa neuroinflamación entre las 2 y 6 horas post-tratamiento, siendo el tiempo de 2 horas el que presenta un mayor incremento de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (**Biesmans et al. 2013**). Por lo tanto, es posible que, en nuestro modelo, la regulación transcripcional de *Cyp2j3* y *Cyp2c11* se haya dado en tiempos más cortos, con la respuesta inflamatoria más inmediata ocasionada por la administración de LPS.

Se ha demostrado que los procesos de inflamación desencadenan la activación de NF- κ B (**Baldwin 1996, Schütze et al. 1995**). Así mismo, los CYPs disminuyen sus niveles de expresión durante procesos de inflamación, y esto se ha atribuido a la actividad de NF- κ B (**Zordoky and El-Kadi 2009**). Se sabe que varios estímulos como LPS, TNF- α , radiación ultravioleta, son capaces de activar el heterodímero de NF- κ B, el cual juega un papel importante en la regulación transcripcional de los genes de éstos citocromos, como el de suprimirlos al ubicarse en secuencias promotoras de éstos genes, evitando su expresión (**Gu et al. 2006**). NF- κ B es activado en respuesta a varios estímulos de estrés, que incluyen infecciones y respuestas inflamatorias; juega un rol inmediato en los efectos patológicos de TNF- α y LPS, sus regulaciones están basadas en las interacciones físicas sobre el DNA y reprimiendo la expresión de algunos genes (**Tian et al. 1999**). Adicionalmente, NF- κ B puede actuar mediante la regulación de receptores nucleares que están involucrados a su vez en la regulación de los CYPs, o mediante su unión directa al sitio promotor de la transcripción de los CYPs, bloqueando su expresión (**Zordoky and El-Kadi 2009, Anwar-mohamed et al. 2010, Tian 2009**).

Contrario a lo que se encontró en los niveles de expresión transcripcional del *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, donde no hubo cambios significativos con respecto a los controles; en los niveles de proteína para CYP2J3 y CYP2C11 se observó una disminución significativa en los grupos tratados con LPS. Por ejemplo, el nivel de proteína para CYP2J3 (**Fig. 16 y 17**) tuvo una disminución significativa a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas con respecto a su control (GAPDH), en la corteza cerebral. También para la proteína de CYP2C11 se observó una disminución con respecto a su control desde las 12 hasta las 72 horas evaluadas (**Fig. 18 y 19**). Esta disminución de ambos citocromos puede relacionarse con el aumento significativo que se encontró de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, especialmente para TNF- α (**Fig. 20 y 21**) y su subsecuente activación de NF- κ B (**Abdel-Razzak et al. 1993, Renton, Dibb and Levatte 1999, Iber et al. 2000, Bell and Strobel 2012**) (**Navarro-Mabarak et al. 2019**).

NF- κ B también puede regular los CYPs a nivel post-transcripcional, alterando la estabilidad de la proteína mediante su inhibición, ya que se ha visto que al inhibirse, los niveles de proteína de CYP3A4 y su estabilidad, disminuyen (**Zangar et al. 2008**). De esta manera, es posible que el CYP2J3 y CYP2C11 puedan ser regulados a la baja por la inflamación a nivel post-transcripcional por NF- κ B, que al desestabilizar la proteína, disminuye sus niveles.

Los niveles de IL-1 β también fueron evaluados, sin encontrarse un aumento de esta citocina (**Fig. 22**). Esto pudo darse debido a que esta citocina, presentó una respuesta temprana y de corta duración en la corteza cerebral, mientras otros procesos inflamatorios que fueron evaluados, persistieron por más tiempo. En estudios previos se ha observado que la administración de LPS induce la producción de IL-1 β en tal sólo 1 hora en hígado, suero y cerebro (**Qin et al. 2007**). Se ha estudiado el efecto del LPS en el nivel de IL-1 β en cerebro, y se ha postulado que esta proteína puede no estar siendo activada directamente por el LPS debido a su baja expresión (**Biesmans et al. 2013**). También se ha encontrado que a diferentes dosis de LPS, esta citocina se expresa a nivel de proteína desde tiempos muy tempranos como lo son 3 horas después del tratamiento. (**Erickson and Banks 2011**). Por lo tanto, se puede pensar que su expresión pudo haber incrementado desde tiempos más tempranos a los que fue evaluada, debido a que no presentó cambios significativos.

Se sabe que la expresión transcripcional de los CYPs epoxigenasas varía de tejido a tejido, y que el efecto de la inflamación en la expresión de los mismos depende del órgano en estudio, como se ha visto en corazón, riñón e hígado de rata, en donde por ejemplo CYP1A1 y CYP1B1 disminuyeron significativamente en un proceso inflamatorio sistémico en corazón y riñón, pero en hígado no hubo cambios significativos (**Anwar-mohamed et al. 2010**). Debe considerarse que el cerebro es un órgano con una respuesta diferente a efectos nocivos comparado con los demás órganos sistémicos, ya que contiene una eficaz barrera hematoencefálica que le permite una mayor protección, por tal motivo los resultados que fueron obtenidos para la expresión del *Cyp2j3* y *Cyp2c11* no son cambios significativos como se han mostrado en otros órganos, donde su

regulación es a la baja. Sin embargo, se ha demostrado que la regulación de las formas de los citocromos P450 en los cerebros de rata y en cultivos de astrocitos, se alteran durante la activación por una respuesta inflamatoria causada por LPS **(Renton and Nicholson 2000) (Navarro-Mabarak et al. 2019)**

Aunque los niveles de citocromo P450 en las regiones del cerebro son bajos, y están distribuidos para realizar sus procesos metabólicos, una respuesta del sistema inmune en el sistema nervioso central puede alterar su actividad y también sus rutas metabólicas normales por las cuales funcionan las diferentes isoformas de estos CYPs **(Nicholson and Renton 1999)**.

La importancia del estudio de la regulación de los CYP epoxigenasas en cerebro se debe al rol en el mantenimiento de la homeostasis de procesos inflamatorios, por la participación de los EETs como metabolitos anti-inflamatorios. Se ha reportado que los EETs participan activamente en la resolución de procesos neuroinflamatorios, disminuyendo los niveles de citocinas pro-inflamatorias, el volumen del infarto cerebral y edema cerebral **(Wang et al. 2018)**. Estos estudios, fortalecen la importancia y la función que representan estos metabolitos en el cerebro, ya que teniendo en cuenta nuestros resultados vemos que la inflamación ocasionada en el cerebro por la administración de LPS, regula a los CYPs con función de epoxigenasas

Estudios previos han propuesto a los EETs como agentes terapéuticos para tratar la isquemia cerebral y el daño por reperfusión, disminuyendo significativamente el volumen del infarto cerebral, el edema cerebral, e inhibiendo la expresión de proteínas involucradas en la inflamación como TNF- α , IL-6 y NF- κ B, a través de la inhibición de la activación de la vía de prostaglandinas y ciclooxigenasas **(Liu et al. 2017)**.

Los resultados de este estudio nos demuestran que la neuroinflamación regula a los citocromos con actividad epoxigenasa 2J3 y 2C11, los cuales pueden jugar un papel importante como blancos para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias en el cerebro. Sus metabolitos, los EETs se han considerado de gran importancia por su función como biomedadores para procesos fisiológicos

como son los inflamatorios, llevándonos a pensar que el usarlos como agentes terapéuticos para la resolución de procesos neuro-inflamatorios, nos llevaría a explicar mejor sus mecanismos de acción en patologías del SNC. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la función biológica de los EETs es disminuida, debido a la sEH, la cual los metaboliza a metabolitos menos efectores como lo son los DHETs. Por lo tanto se debe considerar que al iniciar un proceso terapéutico con los EETs, sería de gran relevancia inhibir a la sEH para evitar que la acción benéfica de éstos, se vea amenazada y por lo tanto no se vea un efecto protector para procesos inflamatorios en el cerebro.

XII. Conclusiones

- ✓ Se observó un aumento significativo en el nivel de proteína de GFAP concluyéndose que la administración i.p. de LPS a una dosis de 1mg/Kg causó neuroinflamación, desde las 6 horas hasta las 48 horas post-tratamiento.
- ✓ El aumento en el nivel de proteína de Iba-1 no fue constante para todas las muestras. Se podría pensar que hay diferencias interindividuales por la variación de la cantidad de microglía que está presente en diferentes regiones del cerebro. Así mismo, esto puede influir en la susceptibilidad diferencial al LPS, y puede reflejar los niveles de factores relacionados con la inflamación producida por estas células.
- ✓ La expresión transcripcional tanto de *Cyp2j3* y *Cyp2c11* no tuvo cambios significativos con la dosis de LPS utilizada a los tiempos evaluados, aunque para *Cyp2c11* se mostró una tendencia de disminución en su expresión. Por lo tanto, la regulación transcripcional pudo haberse llevado a cabo en tiempos más cortos o estas enzimas pudieron haber sido reguladas post-transcripcionalmente, conclusión a la que se llega por los resultados obtenidos en los niveles de proteína.
- ✓ Con el modelo de neuroinflamación en rata generado por la administración de LPS, se observó que el nivel proteico de CYP2J3 y CYP2C11 se reguló a la baja a pesar de que su expresión transcripcional no tuvo cambios significativos, llevándonos a pensar que la actividad epoxigenasa de los citocromos evaluados puede verse afectada por el incremento de las proteínas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, las cuales pueden estar regulando este proceso.

XIII. Bibliografía

- Abdel-Razzak, Z., P. Loyer, A. Fautrel, J. C. Gautier, L. Corcos, B. Turlin, P. Beaune & A. Guillouzo (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol*, 44, 707-15.
- Aitken, A. E. & E. T. Morgan (2007) Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 35, 1687-93.
- Alkayed, N. J., J. Narayanan, D. Gebremedhin, M. Medhora, R. J. Roman & D. R. Harder (1996) Molecular characterization of an arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke*, 27, 971-9.
- Anwar-mohamed, A., B. N. Zordoky, M. E. Aboutabl & A. O. El-Kadi (2010) Alteration of cardiac cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolism in response to lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. *Pharmacol Res*, 61, 410-8.
- Baldwin, A. S. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14, 649-83.
- Bell, J. C. & H. W. Strobel (2012) Regulation of cytochrome P450 4F11 by nuclear transcription factor- κ B. *Drug Metab Dispos*, 40, 205-11.
- Biesmans, S., T. F. Meert, J. A. Bouwknecht, P. D. Acton, N. Davoodi, P. De Haes, J. Kuijlaars, X. Langlois, L. J. Matthews, L. Ver Donck, N. Hellings & R. Nuydens (2013) Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*, 2013, 271359.
- Bonizzi, G., M. Bebien, D. C. Otero, K. E. Johnson-Vroom, Y. Cao, D. Vu, A. G. Jegga, B. J. Aronow, G. Ghosh, R. C. Rickert & M. Karin (2004) Activation of IKK α target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J*, 23, 4202-10.
- Capdevila, J. H. & J. R. Falck (2002) Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 325-44.
- Carver, K. A., D. Lourim, A. K. Tryba & D. R. Harder (2014) Rhythmic expression of cytochrome P450 epoxygenases CYP4x1 and CYP2c11 in the rat brain and vasculature. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, C989-98.
- Cederbaum, A. I. (2015) Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol*, 4, 60-73.
- Danielson, P. B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*, 3, 561-97.
- Deng, Y., K. N. Theken & C. R. Lee (2010) Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 331-41.
- Dutheil, F., P. Beaune & M. A. Lorient (2008) Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*, 90, 426-36.
- Dutheil, F., S. Dauchy, M. Diry, V. Sazdovitch, O. Cloarec, L. Mellottée, I. Bièche, M. Ingelman-Sundberg, J. P. Flinois, I. de Waziers, P. Beaune, X. Declèves, C. Duyckaerts & M. A. Lorient (2009) Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab Dispos*, 37, 1528-38.
- Elbekai, R. H. & A. O. El-Kadi (2006) Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther*, 112, 564-87.

- Erickson, M. A. & W. A. Banks (2011) Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun*, 25, 1637-48.
- Frei, K., C. Siepl, P. Groscurth, S. Bodmer, C. Schwerdel & A. Fontana (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol*, 17, 1271-8.
- Gebremedhin, D., Y. H. Ma, J. R. Falck, R. J. Roman, M. VanRollins & D. R. Harder (1992) Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 263, H519-25.
- Ghezzi, P., B. Saccardo, P. Villa, V. Rossi, M. Bianchi & C. A. Dinarello (1986) Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect Immun*, 54, 837-40.
- Ghosh, S., M. J. May & E. B. Kopp (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16, 225-60.
- Godbout, J. P., J. Chen, J. Abraham, A. F. Richwine, B. M. Berg, K. W. Kelley & R. W. Johnson (2005) Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J*, 19, 1329-31.
- Gu, X., S. Ke, D. Liu, T. Sheng, P. E. Thomas, A. B. Rabson, M. A. Gallo, W. Xie & Y. Tian (2006) Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J Biol Chem*, 281, 17882-9.
- Guengerich, F. P. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*, 8, E101-11.
- Guijarro, C. & J. Egido (2001) Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int*, 59, 415-24.
- Harder, D. R., N. J. Alkayed, A. R. Lange, D. Gebremedhin & R. J. Roman (1998) Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke*, 29, 229-34.
- Hauss-Wegrzyniak, B., P. Dobrzanski, J. D. Stoehr & G. L. Wenk (1998) Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res*, 780, 294-303.
- Iber, H., Q. Chen, P. Y. Cheng & E. T. Morgan (2000) Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch Biochem Biophys*, 377, 187-94.
- Iliff, J. J., J. Jia, J. Nelson, T. Goyagi, J. Klaus & N. J. Alkayed (2010) Epoxyeicosanoid signaling in CNS function and disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 91, 68-84.
- Iliff, J. J., R. Wang, D. C. Zeldin & N. J. Alkayed (2009) Epoxyeicosanoids as mediators of neurogenic vasodilation in cerebral vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, H1352-63.
- Kim, W. G., R. P. Mohny, B. Wilson, G. H. Jeohn, B. Liu & J. S. Hong (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*, 20, 6309-16.
- Kozak, W., M. J. Kluger, A. Kozak, M. Wachulec & K. Dokladny (2000) Role of cytochrome P-450 in endogenous antipyresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279, R455-60.
- Kumar, A., Y. Takada, A. M. Boriek & B. B. Aggarwal (2004) Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 82, 434-48.
- Kumins, N. H., J. Hunt, R. L. Gamelli & J. P. Filkins (1996) Partial hepatectomy reduces the endotoxin-induced peak circulating level of tumor necrosis factor in rats. *Shock*, 5, 385-8.
- Laflamme, N. & S. Rivest (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J*, 15, 155-163.

- Lawson, L. J., V. H. Perry, P. Dri & S. Gordon (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39, 151-70.
- Le Beau, M. M., C. Ito, P. Cogswell, R. Espinosa, A. A. Fernald & A. S. Baldwin (1992) Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFkB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively. *Genomics*, 14, 529-31.
- Liu, M. & N. J. Alkayed (2005) Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1alpha-linked induction of P450 2C11 epoxygenase in astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 939-48.
- Liu, Z., Y. Liu, H. Zhou, X. Fu & G. Hu (2017) Epoxyeicosatrienoic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory factors and pannexin-1. *Mol Med Rep*, 16, 2179-2184.
- Marowsky, A., J. Burgener, J. R. Falck, J. M. Fritschy & M. Arand (2009) Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience*, 163, 646-61.
- Martínez-Jiménez, C. P., R. Jover, M. T. Donato, J. V. Castell & M. J. Gómez-Lechón (2007) Transcriptional regulation and expression of CYP3A4 in hepatocytes. *Curr Drug Metab*, 8, 185-94.
- Meyer, R. P., M. Gehlhaus, R. Knoth & B. Volk (2007) Expression and function of cytochrome p450 in brain drug metabolism. *Curr Drug Metab*, 8, 297-306.
- Miksys, S., E. Hoffmann & R. F. Tyndale (2000) Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochem Pharmacol*, 59, 1501-11.
- Munro, A. W., H. M. Girvan & K. J. McLean (2007) Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep*, 24, 585-609.
- Navarro-Mabarak, C., R. Camacho-Carranza & J. J. Espinosa-Aguirre (2018) Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Drug Metab Rev*, 50, 95-108.
- Navarro-Mabarak, C., I. B. Mitre-Aguilar, R. Camacho-Carranza, C. Arias, A. Zentella-Dehesa & J. J. Espinosa-Aguirre (2019) Role of NF-κB in cytochrome P450 epoxygenases down-regulation during an inflammatory process in astrocytes. *Neurochem Int*, 129, 104499.
- Nicholson, T. E. & K. W. Renton (1999) Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. *Brain Res*, 827, 12-8.
- Node, K., Y. Huo, X. Ruan, B. Yang, M. Spiecker, K. Ley, D. C. Zeldin & J. K. Liao (1999) Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 285, 1276-9.
- Perkins, N. D. & T. D. Gilmore (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, 13, 759-72.
- Qin, L., J. He, R. N. Hanes, O. Pluzarev, J. S. Hong & F. T. Crews (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*, 5, 10.
- Qin, L., X. Wu, M. L. Block, Y. Liu, G. R. Breese, J. S. Hong, D. J. Knapp & F. T. Crews (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55, 453-62.
- Renton, K. W., S. Dibb & T. L. Levatte (1999) Lipopolysaccharide evokes the modulation of brain cytochrome P4501A in the rat. *Brain Res*, 842, 139-47.
- Renton, K. W. & T. E. Nicholson (2000) Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 294, 524-30.
- Rushmore, T. H. & A. N. Kong (2002) Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*, 3, 481-90.

- Schrenk, D. (1998) Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem Pharmacol*, 55, 1155-62.
- Schütze, S., K. Wiegmann, T. Machleidt & M. Krönke (1995) TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology*, 193, 193-203.
- Silverman, N. & T. Maniatis (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, 15, 2321-42.
- Spector, A. A., X. Fang, G. D. Snyder & N. L. Weintraub (2004) Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res*, 43, 55-90.
- Tian, Y. (2009) Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome. *Biochem Pharmacol*, 77, 670-80.
- Tian, Y., S. Ke, M. S. Denison, A. B. Rabson & M. A. Gallo (1999) Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem*, 274, 510-5.
- Tindberg, N., H. A. Baldwin, A. J. Cross & M. Ingelman-Sundberg (1996) Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Mol Pharmacol*, 50, 1065-72.
- Tirumalai, P. S., S. Bhamre, S. C. Upadhyaya, M. R. Boyd & V. Ravindranath (1998) Expression of multiple forms of cytochrome P450 and associated mono-oxygenase activities in rat brain regions. *Biochem Pharmacol*, 56, 371-5.
- Viatour, P., M. P. Merville, V. Bours & A. Chariot (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*, 30, 43-52.
- Wang, L., G. Luo, L. F. Zhang & H. X. Geng (2018) Neuroprotective effects of epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 138, 9-14.
- Warner, M., C. Köhler, T. Hansson & J. A. Gustafsson (1988) Regional distribution of cytochrome P-450 in the rat brain: spectral quantitation and contribution of P-450b,e, and P-450c,d. *J Neurochem*, 50, 1057-65.
- Zangar, R. C., N. Bollinger, S. Verma, N. J. Karin & Y. Lu (2008) The nuclear factor-kappa B pathway regulates cytochrome P450 3A4 protein stability. *Mol Pharmacol*, 73, 1652-8.
- Zanger, U. M. & M. Schwab (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 138, 103-41.
- Zeldin, D. C., J. Foley, S. M. Goldsworthy, M. E. Cook, J. E. Boyle, J. Ma, C. R. Moomaw, K. B. Tomer, C. Steenbergen & S. Wu (1997) CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol*, 51, 931-43.
- Zordoky, B. N., M. E. Aboutabl & A. O. El-Kadi (2008) Modulation of cytochrome P450 gene expression and arachidonic acid metabolism during isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. *Drug Metab Dispos*, 36, 2277-86.
- Zordoky, B. N. & A. O. El-Kadi (2009) Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab*, 10, 164-78.
- Zou, A. P., Y. H. Ma, Z. H. Sui, P. R. Ortiz de Montellano, J. E. Clark, B. S. Masters & R. J. Roman (1994) Effects of 17-octadecynoic acid, a suicide-substrate inhibitor of cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, on renal function in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 474-81.

XIV Anexos

Tabla 4. Reactivos y preparación para el gel separador

REACTIVO	CÁLCULO PARA 1 GEL AL 11%	CÁLCULO PARA 2 GELES AL 11%
H ₂ O	4.9 mL	9.8 mL
30% Mezcla Acrilamida	5.5 mL	11 mL
1.5 M Tris pH 8.8	3.8 mL	7.6 mL
10% SDS	150 µl	300 µl
10% persulfato de Amonio	150 µl	300 µl
TEMED	6 µl	12 µl

Tabla 5. Reactivos y preparación para el gel concentrador

REACTIVO	CANTIDAD
H ₂ O	4.1 mL
30% Mezcla Acrilamida	1.0 mL
1.0 M Tris pH 6.8	750 µL
10% SDS	60 µl
10% Persulfato de Amonio	60 µl
TEMED	6 µl

Tabla 6. Preparación del Buffer de transferencia

Metanol Absoluto	Agua	Buffer de transferencia
200 mL	720 mL	80 mL

Anticuerpos primarios.

Tabla 7: concentraciones de los anticuerpos primarios

Nombre Anticuerpo	Dilución	Volumen BSA 0.5%	Volumen Anticuerpo
Anti-GAPDH	1: 10000	10mL	1 μ l
Anti-GFAP	1:10000	10 mL	1 μ l
Anti-Iba-1	1:1000	2mL	2 μ l
Anti-CYP2J3	1:500	2mL (Por cada membrana)	4 μ l
Anti-CYP2C11	1:500	2mL (Por cada membrana)	4 μ l

Anticuerpos secundarios.

Tabla 8: concentraciones de los anticuerpos secundarios

Anticuerpo utilizado	Dilución utilizada	Volumen BSA 0.5%	Volumen Anticuerpo
GAPDH: Anti-ratón	1: 10000	10 mL	1 μ l
GFAP: Anti-pollo	1:10000	10 mL	1 μ l
Iba-1: Anti-conejo	1:5000	10 mL	2 μ l
CYP2J3: Anti-conejo	1:5000	10 mL	2 μ l
CYP2C11: Anti-ratón	1:5000	10 mL	2 μ l

Soluciones del Western Blot

a) Acrilamida/bis acrilamida

- ✓ Acrilamida: 30.0 g
- ✓ Bis acrilamida: 0.8 g
- ✓ Agua 100mL

Nota: Filtrar con papel de 0.45 μ m y almacenar a 4°C en oscuridad por no más de 30 días. Usar guantes y cubre bocas.

b) Amortiguador de tris 1.5 M pH 8.8

- ✓ Pesar 18.15 g.
- ✓ Ajustar pH 8.8.
- ✓ Aforar a 100 mL.

c) Amortiguador de tris 0.5 M pH 6.8

- ✓ Pesar 6.05 g.
- ✓ Ajustar pH 6.8.
- ✓ Aforar hasta 100 mL.

d) TBS 10 X

Pesar

- ✓ Tris base 24.2 g
- ✓ NaCl 80 g
- ✓ HCl 1N 38 mL
- ✓ Ajustar pH 7.6
- ✓ Aforar 1 litro
- ✓ Filtrar la solución.

e) TBS TWEEN 0.3% (TTBS)

- ✓ TBS 10X 100 mL
- ✓ H₂O 900 mL
- ✓ Tween 3 mL

f) Amortiguador de corrida 10X

Pesar

- ✓ Tris base 30.2 g
- ✓ Glicina 144 g
- ✓ SDS 10% 100 mL. 10 g para 10mL. Usar cubre bocas
- ✓ H₂O. Aforar hasta 1000mL

g) Amortiguador de transferencia 10X

Pesar

- ✓ Tris base 30.3 g
- ✓ Glicina 144.15 g
- ✓ Aforar hasta 1000mL.

h) Amortiguador de transferencia 1X

Preparar:

- ✓ Metanol: 200mL
- ✓ 720 mL de H₂O
- ✓ Amortiguador de transferencia 10X (80 mL)

i) Amortiguador de corrida 1X

Preparar:

- ✓ 50 mL de Amortiguador al 10X
- ✓ 450 mL de H₂O