



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA
CATEPSINA B, H Y CISTATINA C, MEDIANTE
INMUNOHISTOQUÍMICA EN UN MODELO DE
TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO EN RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

M A R I B E L S O T O N Ú Ñ E Z



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.

2005

m348862



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

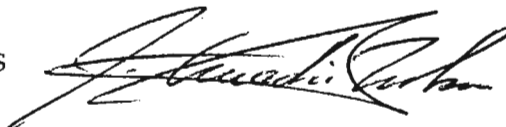
Presidente:	PROF RESÉNDIZ VÁZQUEZ BERTHA
Vocal	PROF. ORTEGA MUÑOZ RAQUEL
Secretario	PROF. MOLINA GUARNEROS JUAN A.
1er. Suplente	PROF. CERBÓN CERVANTES MARCO A.
2o. Suplente	PROF. CARDOSO SALDAÑA GUILLERMO C.

Este trabajo de tesis:

- Se realizó en el laboratorio de Inmunofarmacología ubicado en el Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del M. en C. Juan A. Molina Guarneros.
- En colaboración con el grupo de la Dra. María de la Luz Navarro Angulo, ubicado en el departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- En colaboración con el laboratorio de Inmunoterapia experimental, ubicado en el Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Andrés E. Castell R.
- Contó con los apoyos de: Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT-D.G.A.P.A., UNAM), proyecto IN215203. y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) referencia P43331M.

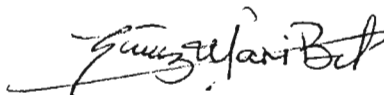
Director de tesis:

M. en C. Juan A. Molina Guarneros



Sustentante:

Maribel Soto Núñez



Agradecimientos:

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan Molina por su apoyo y guía incondicional de siempre y por aceptarme como su alumna.

Al Dr. Andrés Castell por todos los consejos y conocimientos que aportò a este trabajo y por ser siempre un apoyo incondicional para mì.

A Bety y Marina por que sin ellas llegar a la meta hubiera sido mucho màs difícil.

A la Dra Luz Navarro por aceptarme en su proyecto y confiar en mi.

Al Dr. Sanpedro por toda la ayuda que siempre me bnrindo.

A mis amigos de la facultad; a mis amigos de siempre y a mi familia

A Eny por ayudarme a levantar cuando creìa no poder màs y por siempre estar ahì

A Yuss por enseñarme que siempre puedo esperar màs de mi

A Omar por ser una nueva ilusiòn en mi vida y por ayudarme incondicional,mente

"Dedico este trabajo a mi mamà porque juntas lo logramos"

INDICE GENERAL

1	Resumen	1
2	Introducción	3
2.1	Generalidades	3
2.2	Traumatismo craneoencefálico	3
2.3	Vulnerabilidad del sujeto dependiente de la hora del día	5
2.4	Cisteín proteasas	6
2.5	Catepsinas	7
2.5.1	Catepsina B	8
2.5.2	Catepsina H	9
2.6	Cistatina C	10
2.7	Relación catepsinas / cistatina	11
2.8	Daño neuronal	12
3	Planteamiento del problema	15
4	Objetivos e Hipótesis	16
5	Metodología	17
5.1	Sujetos	17
5.2	Obtención de la muestra	17
5.2.1	Fijación	17
5.2.2	Extracción del cerebro	18
5.2.3	Inclusión en parafina	18
5.2.4	Inclusión en tissue tek	18
5.2.5	Cortes en parafina	19
5.3	Inmunolocalización	19
5.3.1	Inmunolocalización de catepsinas B,H y cistatina C con peroxidasa y DAB	19
5.3.2	Inmunofluorescencia de catepsina B y cistatina C.	20
5.3.3	Doble inmunolocalización de catepsina B y cistatina C mediante IHQ	21

5.4	Traumatismo craneoencefálico	21
6	Resultados	23
6.1	Expresión y distribución de la catepsina H en cerebro de rata	23
6.2	Expresión y distribución de la catepsina B en cerebro de rata	24
6.3	Inmunolocalización de cistatina C	27
6.4	Inmunolocalización en cerebelo	28
6.5	Variación de la expresión dependiendo el ciclo luz/oscuridad	29
6.6	Expresión y distribución de la catepsina B y cistatina C en TCE	30
	6.6.1 Tallo cerebral	30
	6.6.2 Corteza cerebral	34
	6.6.4 Hipocampo	35
7	Discusión	41
8	Conclusiones	45
9	Bibliografía	46

1. RESUMEN

Los eventos traumáticos representan uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país. Cuando un sujeto sufre un traumatismo craneoencefálico se desencadenan una serie de cambios funcionales, estructurales y moleculares que pueden dar lugar a daño neuronal, como por ejemplo liberación de neurotransmisores excitadores, entrada masiva de Ca^{2+} y la consecuente activación de proteasas como las catepsinas entre otras. Esto da lugar a la activación de vías apoptóticas y/o necróticas y a la muerte celular. Sin embargo no todos los cambios son nocivos, algunos de éstos tienen un efecto neuroprotector. En este trabajo analizaremos la participación de un tipo especial de proteasas, las catepsinas y de su inhibidor endógeno, la cistatina C en la fisiopatología del traumatismo craneoencefálico. En algunas condiciones fisiopatológicas que involucran daño neuronal, se ha descrito un incremento en la expresión de algunas catepsinas, así como de la cistatina C, o bien un incremento del cociente catepsina/cistatina. La expresión y distribución de éstas moléculas no ha sido analizada en un TCE. Creemos que la liberación de las catepsinas en un evento traumático incrementan la muerte neuronal, mientras que la liberación de cistatina C representa una de las respuestas neuroprotectoras del organismo.

Así pues en este trabajo analizaremos la expresión basal y la distribución de las catepsinas B, H y de la cistatina C y además su expresión en respuesta a un traumatismo craneoencefálico.

Utilizando como modelo experimental a la rata y a un método conocido como "closed head injury", se realizaron inmunohistoquímicas de cerebro de rata para inmunolocalizar a las proteínas mencionadas. Posteriormente se provocó el TCE y se observó que ambas moléculas co-localizan. Encontramos un incremento en la expresión de catepsina B y

cistatina C a partir de las 24 hrs. post-trauma. Los cambios de mayor intensidad se presentaron en tres zonas: corteza, hipocampo y tallo cerebral.

Uno de los resultados relevantes que se derivó de este estudio, es que se encontró que pueden presentarse cambios en la expresión de la catepsina B (incremento) y la aparición de cistatina C, co-localizando con la catepsina B, en áreas distantes a la zona del impacto, lo cuál no ha sido anteriormente reportado.

2.INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades.

Los **eventos traumáticos** representan uno de los principales problemas de salud pública. A nivel mundial, ocupan el tercer lugar como causa de muerte. En nuestro país los traumatismos representan la cuarta causa de muerte general y la primera dentro de la población económicamente activa (INEGI, 2002). Se ha señalado que por cada muerte ocasionada por un traumatismo se originan dos casos de discapacidad. En México provocan el segundo lugar como causa de discapacidad (Programa Nacional de Salud 2001-2006). Su adecuada atención representa uno de los objetivos del Programa Nacional de Salud 2001-2006.

2.2 Traumatismo craneoencefálico (TCE).

Se define al traumatismo craneoencefálico (TCE), como cualquier lesión física, o deterioro funcional del contenido craneal, secundario a un intercambio brusco de energía mecánica (Fig. 1) (Povlishock, 1995). En el TCE hay repercusión neurológica que resulta en un deterioro de la conciencia, síntomas focales neurológicos y amnesia postraumática. En un TCE se pueden identificar dos tipos de lesiones. A) La lesión primaria, corresponde al daño mecánico al parénquima o a la vasculatura, ocurre en el momento del impacto y no es reversible. B) La lesión secundaria, corresponde a los daños tardíos, que se presentan de horas a días

postrauma; esta última es un proceso potencialmente reversible, mediante una terapia adecuada (Nestler et al, 2000).

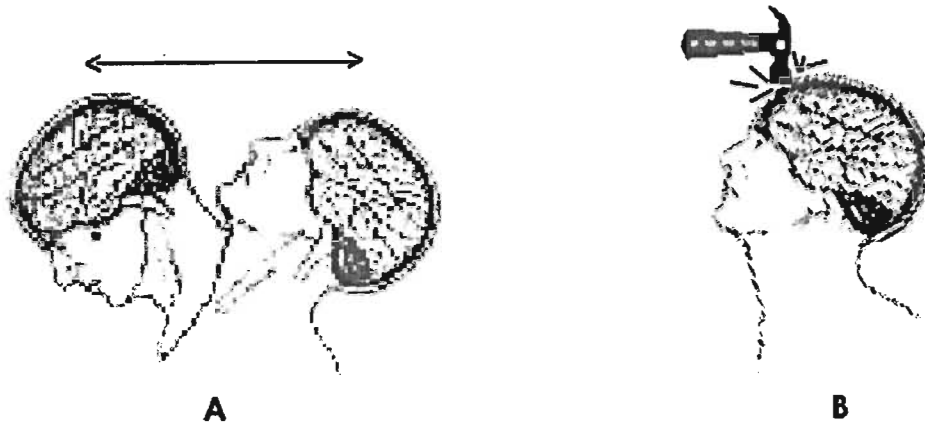


Figura 1 A) Traumatismo craneoencefálico originado por un movimiento brusco del cuello originando el choque entre el cráneo y el cerebro. B) traumatismo craneoencefálico originado por el choque de un objeto externo contra el cráneo del individuo.

Esta lesión secundaria también es conocida como zona de penumbra isquémica y está sujeta a varios procesos patológicos que pueden derivar en la muerte propia y la de las zonas vecinas. Estos mecanismos promotores de muerte se comparten tanto en el TCE como en un daño cerebral isquémico; involucra una serie de cambios funcionales, estructurales y moleculares que pueden dar lugar a daño neuronal. Cuando cesa el flujo de sangre al tejido cerebral, se ve severamente dañada la entrada de oxígeno y nutrientes así como la salida de metabolitos potencialmente tóxicos, lo que da lugar a los cambios bioquímicos en el área cerebral afectada. Entre estos cambios hay una depleción de glucosa y del glucógeno, falla de la Na/K ATPasa y de otras bombas, que dan lugar a la disminución en el umbral de excitación y con esto se presentan potenciales de acción, liberación de neurotransmisores excitadores como glutamato, entrada masiva de calcio, producción de radicales libres,(Juuurlink et al, 1998), activación de proteasas, lipasas,

sintasa de óxido nítrico, endonucleasas y potencialmente necrosis y/o apoptosis (Nestler et al, 2000).

Sin embargo no todos los cambios son nocivos, algunos de éstos tienen un efecto neuroprotector, es decir parece haber una respuesta homeostática del organismo por restituir el estado basal, activando mecanismos de neuroprotección. Estos mecanismos parecen compartirse tanto frente a un daño causado por un TCE como por un accidente vascular cerebral. Por lo tanto la meta a alcanzar, sería minimizar la activación de los mecanismos de toxicidad y potenciar la actividad de los mecanismos de neuroprotección endógena, ya que el balance entre estos determinará el destino del tejido en riesgo. La importancia de una terapia de protección neuronal recae por lo tanto en mantener la sobrevivencia de las células de la penumbra.

2.3 Vulnerabilidad del sujeto dependiente de la hora del día.

En la rata, la isquemia provoca un mayor daño si ésta se induce en las horas de oscuridad en comparación con las horas de luz (Vinall et. Al, 2000). Se ha analizado la severidad de un TCE en relación al fotoperiodo. Utilizando a la rata como modelo, se encontró que la recuperación frente a un TCE infligido mediante la técnica de "closed head injury" (Panikashvili et. al, 2001) presenta variaciones diurnas, siendo mejor la recuperación si el traumatismo ocurre en horas de luz.

Por otra parte se ha analizado el patrón de expresión de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a lo largo de las 24 horas y se encontró en particular una banda proteica de aproximadamente 15kDa que varía de una manera cíclica, presentando mayor concentración en las horas de luz (Gonzalez-Rivera et. al, 2003) y que incrementa su concentración 24 horas

después del TCE. Esta banda se aisló a partir de un gel de poliacrilamida y se obtuvo un análisis de su secuencia mediante la técnica de MALDI-TOF (W.M. Keck Facility, Yale University, USA). LA banda corresponde a cistatina C, un inhibidor de cisteín-proteasas.

Con respecto a estudios en las expresiones de catepsinas y cistatinas en tejidos cerebrales, y variaciones diurnas de estas expresiones hay muy pocos datos en la literatura, por ejemplo se han descrito variaciones diurnas en catepsina H en suero humano, mientras que catepsina B y cistatina C no presentan variaciones séricas significativas (Cimerman N. *et al*, 2000).

2.4 Cisteín proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces amido y su efecto es irreversible, una vez que la proteína es hidrolizada, la única manera de reconstruirla es sintetizando mas mRNA. El mecanismo es el ataque nucleofílico al carbonilo del enlace amido, lo que genera un proceso hidrolítico ácido-base que rompe el enlace covalente. Con base a esto, las proteasas se clasifican en : serin-, cisteín-, aspartato- y metalo-proteasas (Grzonka *et. al*, 2001). Las serin- y cisteín-proteasas usan su grupo OH- y HS- directamente como nucleófilos. Estas proteínas se hayan estructuradas en dos dominios largos globulares que rodean una hendidura donde se hallan los residuos que conforman el sitio activo (Fig 2).

Las cisteín-proteasas tienen un péptido señal y una pro-pieza que se remueve durante la maduración, aquellas carentes de pro-pieza no adquieren la conformación necesaria para su activación. (Fox T *et al*, 1992).

El principal papel fisiológico de las cisteín proteasas es la degradación metabólica de péptidos y proteínas, su actividad se regula

mediante el balance de la cantidad de enzima presente y la cantidad de inhibidores. Sin embargo la regulación de las cisteín proteasas es compleja y también se ve afectada por el pH, mecanismos redox, síntesis como precursor inactivo, N- glicosilaciones que las compartimentalizan y la presencia de inhibidores que inactivan la enzima activa que se escapa de la compartimentalización. Por lo tanto estos inhibidores se encuentran en el citoplasma y espacios extracelulares en un exceso estequiométrico. (Chapman *et al*, 1997).

El hecho de que la expresión de las cisteín-proteasas sea restringida, y su actividad sea regulada ha puesto de manifiesto su importancia fisiológica. Recientemente se ha reconocido que participan en procesos vitales como, como procesamiento postraducciona l de hormonas, citocinas, presentación de antígenos, coagulación, entre otros (Chapman *et. al*, 1997).

2.5 Catepsinas.

Las catepsinas pertenecen a una de las dos superfamilias que constituyen a las cisteín-proteasas, como su nombre lo indica, son enzimas capaces de degradar proteínas, poseen una cisteína en su sitio activo y utilizan el grupo sulfhidrilo como nucleófilo. Poseen pesos moleculares entre 21 y 30 kDa, tienen un pH óptimo entre 4 y 6.5 y utilizan al glutatión como cofactor. Se han descrito dos superfamilias, la familia de las cisteín proteasas relacionadas a la enzima convertidora de interleucina 1-beta y la familia de las relacionadas a la papaína.(Fig. 2)

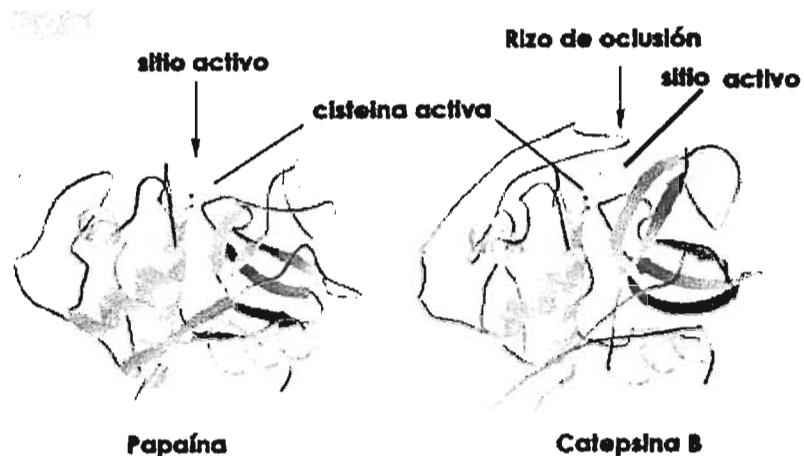


Figura 2 Imagen que muestra las similitudes del sitio activo entre las moléculas de papaína y catepsina B. el rizo de oclusión que se localiza en la catepsina B le confiere mayor especificidad (imagen modificada de <http://delphi.phys.univ-tours.fr/prolysis/images/cbpap.jpeg>).

Los lisosomas contienen tres principales tiol- endopeptidasas: catepsinas B, H y L que son esenciales para el catabolismo de las proteínas. La secuencia de aminoácidos de las catepsinas B y H de hígado de rata, determinada por Takio *et al*(1983) indica que estas enzimas pertenecen a la familia de la papaína.(Kominami *et al*,1985)

En mamíferos, se han descrito la presencia de las catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V y W de localización lisosomal. Su actividad está regulada por su síntesis, su recambio, por la presencia de cofactores y la de inhibidores como la cistatina C, ya señalada.

2.5.1 Catepsina B

La catepsina B tiene una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos adicionales a su sitio activo, restringiendo el acceso de sustratos potenciales. Lo que explica la baja actividad de esta catepsina como endoproteasa; en contraste tiene buena actividad de

carboxipeptidasa (Baudys *et. al*, 1991). Así como otras proteínas lisosomales, la catepsina B se sintetiza como una pre-pro-enzima glicosilada inactiva y es dirigida a los lisosomas vía retículo endoplásmico y Golgi. Esta proteína es proteolíticamente procesada a una proteína de cadena sencilla activa, que es nuevamente escindida a dos cadenas unidas por un puente disulfuro (Hasilik A, *et al* 1992).

Se encuentra en altas concentraciones en riñón, vagina y bazo. La glándula adrenal y el cerebro contienen mayor concentración de catepsina B que de H (Kominami *et al*, 1985).

Es la proteasa lisosomal más abundante y se requiere para el mantenimiento de la función de los lisosomas. Esta catepsina es capaz de digerir gradualmente proteínas celulares, ácidos nucleicos, carbohidratos complejos, lípidos y esta relacionada al recambio proteico fisiológico en las neuronas. (Pope A, *et al* 1984).

La catepsina B se sobre-expresa en el hipocampo de primates de 3 a 5 días después de isquemia global y su inhibición específica le confiere neuroprotección a la región CA1 del hipocampo (Yamashima *et. al*, 1998).

2.5.2 Catepsina H

La catepsina H es una cisteín-proteasa lisosomal de la familia de la papaína, que ha sido purificada de varios tejidos y especies, se encuentra en altas concentraciones en riñón, vagina, hígado, pulmón y bazo. (Kominami *et al*, 1985)

Como otras catepsinas lisosomales se sintetiza como una pre-pro-enzima (41 kDa), la cual es escindida a pro-enzima cotranscripcionalmente en el retículo endoplásmico rugoso y finalmente procesada

postranscripcionalmente a la enzima madura (28 kDa), en el ambiente ácido de los endosomas o lisosomas tardíos (Brguljan P.M, *et al* 2003).

Esta catepsina tiene un reducido sitio activo por lo que su función predominante de aminopeptidasa, la distingue fácilmente de otras cisteín proteasas lisosomales (Baudys *et. al*, 1991).

2.6 Cistatina C.

Dentro de los inhibidores de las proteasas la más abundante es la superfamilia de cistatinas. Existe el tipo intracelular que carece del péptido señal (cistatina A, B) y el tipo abundante secretado o inhibidor extracelular cistatina C; a los circulantes se les conoce como quininógenos. Estos inhibidores se unen fuertemente a las proteasas y su función es proteger células, tejidos y a la circulación de la actividad no deseada de las cisteín proteasas (Barret AJ, 1986-87).

La cistatina C humana es un inhibidor de cisteín proteasas de la familia de la papaína (p. ej. catepsinas), potente, reversible, competitivo y de bajo peso molecular (13 kDa), codificada en el cromosoma 20 en humanos. Cuenta con 120 aminoácidos y es sintetizada como pro-proteína conteniendo un péptido señal de 26 aminoácidos, lo cual es congruente con su actividad extracelular. Además posee dos puentes disulfuro, no glucosilados y su punto isoeléctrico es de 9.3 (Abrahamson M. *et al*, 1987). El hecho de ser una proteína básica, hace que no sea reabsorbida en el túbulo renal y permite que sus niveles plasmáticos sean utilizados como marcador de filtración glomerular (Laterza *et. al*, 2002).

La cistatina C es un potente inhibidor endógeno de las catepsinas B, H, K, L y S, que están implicadas en varios procesos biológicos como la degradación de proteínas celulares y la regulación de pro-enzimas y pro-

hormonas. Está ampliamente distribuida en los tejidos y se encuentra principalmente en secreciones y fluidos extracelulares. Sus niveles se encuentran más elevados en el líquido seminal y el LCR. Por su amplia distribución y potencia inhibidora se sugiere que es la principal inhibidora de las cisteín-proteasas (Grzonka *et. al*, 2001).

Sin embargo la cistatina C está implicada en otras funciones celulares no relacionadas con su función inhibitoria de proteasas, como la regulación de la actividad fagocítica; la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos polimorfonucleares y en la regulación de la liberación de óxido nítrico de los macrófagos activados. También la forma glicosilada de la cistatina C esta implicada en la proliferación de las células tallo neuronales (Olsson *et. al*, 2004).

Aunque la cistatina C se encuentra principalmente de manera extracelular, también se localiza intracelularmente. La cistatina C se expresa en cerebro de rata, primate y humano y se localiza predominantemente en los astrocitos aunque también en algunas neuronas (Yasuhara *et al*, 1993), como las neuronas piramidales CA1 del hipocampo de gerbo (Ishimaru *et al*, 1996). En el cerebro probablemente participa controlando la homeostasis proteica en los compartimentos extracelulares, inhibiendo la degradación hidrolítica de proteasas liberadas de las células, ya que cambios en los niveles de cistatina C han sido asociados a diferentes padecimientos neuronales inflamatorios. (Brguljan P.M, *et al* 2003).

2.7 Relación catepsinas / cistatina.

Hay datos contradictorios respecto a la presencia de cistatina C como marcador de daño cerebral. Se ha observado que se acumula en neuronas degeneradas junto con agregados beta-amiloides (Levy *et. al*,

2001). También se ha observado un incremento en la inmuno reactividad a cistatina C en corteza cerebral en humanos con Alzheimer, *post mortem* donde su papel como neuroprotector o mediador de la neurodegeneración ha sido discutido (Deng et. al, 2001), así como su sobre expresión en neuronas degeneradas CA1 de hipocampo de rata en modelos experimentales de isquemia (Palm et. al, 1995) sugiriendo un papel en la muerte neuronal después de isquemia cerebral.

En procesos inflamatorios en disfunciones neurológicas, por ejemplo la esclerosis múltiple, los niveles de cistatina C en LCR están disminuidos, mientras que los niveles de catepsinas B y H se encuentran incrementados (Nagai et. al, 2000; 2003).

Así pues parece que el marcador de daño neuronal podría ser más bien el desbalance entre las concentraciones de algunas catepsinas y su inhibidor.

También se ha descrito que la catepsina L pasa de la fracción lisosomal a la citoplásmica como respuesta a la reperfusión sanguínea posterior a un episodio isquémico (Islekek et. al, 1999) No hay datos respecto al papel de las otras catepsinas (H, K y S) en daño neuronal. Recientemente se ha propuesto que la participación de las proteasas puede inclinar la balanza entre apoptosis y necrosis en modelos de isquemia global transitoria (Yamashima, 2000).

2.8 Daño neuronal,

Las neuronas en el centro de una lesión isquémica derivan en una muerte necrótica y son resistentes a los inhibidores de caspasas, mientras que las neuronas de la periferia muestran características apoptóticas y

pueden ser parcialmente rescatadas con inhibidores de caspasas.(Artal – Sanz M, et al 2005).

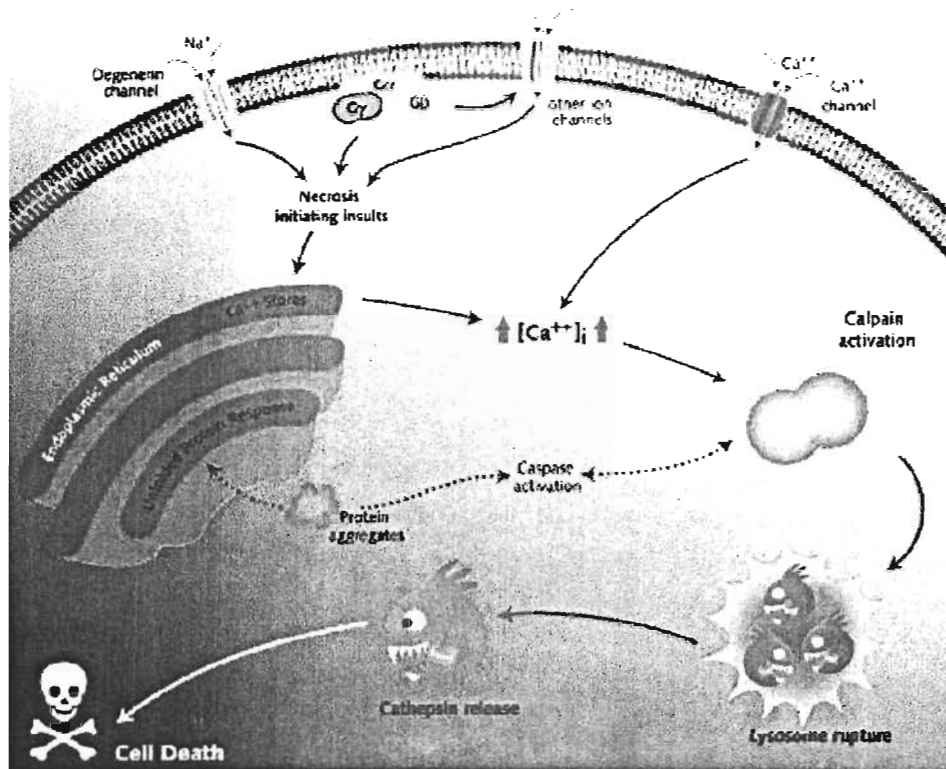


Fig 3 Cascada calpaína-catepsina inducida por calcio como un mecanismo de muerte neuronal. Al inicio de un insulto necrótico, se provoca la movilización de calcio intracelular, que ingresa del medio extracelular o bien se libera de los depósitos internos. Esta movilización de Ca²⁺ induce la ruptura lisosomal. Las catepsinas liberadas degradan las proteínas constitutivas de la célula derivando en muerte neuronal. [imagen tomada de Cell calcium 36(2004)]

A diferencia de la apoptosis, la necrosis nos se desarrolla como una muerte programada de la célula por la desregulación de sus actividades normales cuando es expuesta a condiciones de estrés como isquemia, hipoxia, infarto o trauma, la necrosis neuronal está mediada por el incremento de calcio intracelular, es independiente de caspasas, en su lugar las calpaínas citosólicas y las catepsinas liberadas son las proteínas que mas participan en el proceso.(Fig 3)

La apoptosis es consecuencia de un programa genéticamente regulado y da lugar a una muerte "silenciosa", previene la inflamación y el daño al tejido, mientras que la necrosis comienza con hinchamiento celular y mitocondrial, provoca inflamación y daño al tejido vecino con salida del contenido celular hacia el medio extracelular. De acuerdo a Yamashima (2000) en un evento isquémico, posterior a la entrada masiva de calcio, se activan proteasas, en particular calpaína, una cisteín-proteasa ubicua, la cual participa en la activación de caspasa-3 induciendo apoptosis, o bien participa en el rompimiento de lisosomas, que liberan catepsinas que inducen necrosis (Fig 3). De hecho, se han utilizado algunos inhibidores de cisteín y serin-proteasas como leupeptina o selectivos de calpaína (Markraf et. al, 1998) para prevenir el daño causado por un episodio isquémico (Lee et. al, 1991) con resultados prometedores. Vale la pena señalar que prácticamente no hay datos en la literatura respecto al papel de las catepsinas o bien de la cistatina C en traumatismo cerebral. Solo hay un reporte en necropsias de humanos que han fallecido debido a TCE, en el que se describe que hay un incremento en la expresión de catepsina D (Scherriff et. al, 1994).

Se sabe que los inhibidores de proteasas tienen un papel importante neuroprotector pero no hay información de esta acción en el traumatismo craneoencefálico.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En relación a lo descrito anteriormente y a que prácticamente no hay datos en la literatura respecto al papel de las catepsinas o bien de la cistatina C en traumatismo cerebral y de que solamente hay un reporte en necropsias de humanos que han fallecido debido a TCE, en el que se describe que hay un incremento en la expresión de catepsina D (Sherriff *et al*, 1994), nos proponemos estudiar la localización de las catepsinas B, H y su inhibidor endógeno cistatina C en la rata. El conocimiento generado a partir de este estudio nos brindará conocimiento de la localización de éstas proteínas en condiciones normales y nos permitirá analizar la función de estas catepsinas y de su inhibidor endógeno, en la fisiopatología del TCE.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Determinar mediante inmunohistoquímica en un modelo de TCE en rata, si las catepsina B y H co-localizan con la cistatina C.

Objetivos particulares

Describir la expresión y distribución de las catepsinas B, H y de su inhibidor endógeno cistatina C en el cerebro de rata.

Detectar las modificaciones en la expresión y distribución de las catepsinas B, H y la cistatina C en cerebro de rata a consecuencia de un traumatismo craneoencefálico.

Identificar las zonas de co-localización de la catepsina B, H y cistatina C antes y después de un TCE en la rata.

Hipótesis

La expresión de catepsina B, H y cistatina C se verá incrementada en la zona del traumatismo craneoencefálico, y habrá co-localización de estas proteasas con su inhibidor endógeno.

5. METODOLOGIA

5.1 Sujetos

En todos los estudios se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 350 g de peso, mantenidas a temperatura constante, con agua y comida *ad libitum*

5.2 Obtención de la muestra

5.2.1 Fijación.

A la rata previamente anestesiada con hidrato de cloral al 8% se le realiza una incisión en la cavidad torácica dejando el corazón al descubierto, al cual se le inserta una aguja (20 G X 32 mm) conectada a un sistema de bombeo de soluciones [Solución de lavado: PB (buffer de fosfatos) y Solución de fijado: paraformaldehído al 4%].

Las soluciones se bombean por gravedad colocando los frascos con las soluciones a una altura de 1.50 m para que el líquido baje con cierta presión por una manguera a la que se le adapta una aguja. Primero se administran 300 mL de PB para remover la sangre, la cual sale por una incisión en la aorta

Posteriormente se cambia la solución de lavado por la solución fijadora de paraformaldehído al 4 %, 300 mL aproximadamente. El tejido que esta fijado pierde la flexibilidad.

5.2.2 Extracción del cerebro (tejido de estudio).

La rata se decapita y se le retira la piel . con ayuda de unas pinzas se rompe el cráneo cerca de los bulbos nasales; cuidando de no estropear el tejido, se retira hasta dejar el cerebro expuesto; con una espátula se retira y se coloca en un vial que contenga el fijador (paraformaldehído 4% en PB).

Se mantienen los cerebros en p-formaldehído al 4% durante 2 hrs.

5.2.3 Inclusión en parafina

El tejido previamente perfundido se deshidrata pasándolo por una serie de diluciones acuosas de etanol en concentraciones crecientes del 60 al 96% de etanol hasta llegar al etanol anhidro.

El tejido deshidratado se sumerge en xilol (aclaramiento). Posteriormente se coloca en parafina líquida, que disuelve el xilol y penetra en el tejido. La parafina se enfría y solidifica obteniéndose un bloque sólido.

5.2.4 Inclusión en tissue tek (Bayer)

Una vez fijado el tejido se transfiere a una solución de PB 10% para su lavado. Se transfiere a una solución de PB + Sacarosa 10% por 24 hrs. Se transfiere a una solución de PB + Sacarosa 14% por 1 hora. Se transfiere a una solución de PB + Sacarosa 16% por 1 hr.

Y finalmente se coloca el tejido en una cámara de papel aluminio y se llena hasta cubrirlo con tissue-tek la cual se mantiene en congelación hasta obtener un bloque sólido

5.2.5 Cortes de parafina

Los cortes de cerebro con un grosor de 5 a 8 micras, se colocan en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma P-8920). Después se someten a un proceso de desparafinización colocándolos a 38° C durante 20 min. El paso siguiente es la rehidratación del tejido empezando con baños de xilol y etanol en concentraciones decrecientes del 96 al 60% y finalmente agua destilada.

5.3 INMUNOLOCALIZACION

Pre-tratamiento

Las secciones de tejido se tratan con citrato de sodio 10 mM, pH 6.0 por 3 minutos a 120° C y se enfrían en un baño de agua fría para exponer los antígenos. Posteriormente son tratados con peróxido de hidrógeno al 3% [1mL H₂O₂ 30% + 9 mL H₂O] a temperatura ambiente por 10 minutos para bloquear la peroxidasa endógena, las laminas son lavadas una vez con agua destilada y otra con PBS y procesadas para su análisis inmunohistoquímico.

5.3.1 Inmunolocalización de Catepsinas B, H y Cistatina C con peroxidasa y diaminobencidina (DAB).

El tejido es bloqueado con Blotto (M-7409 Sigma) por 1 hora a temperatura ambiente, después se incuba con uno de los anticuerpos primarios toda la noche a en una cámara húmeda.

Anti-catepsina B hecho en cabra (Sta. Cruz sc-6493) 2 µg/mL; anti catepsina H hecho en cabra (Sta. Cruz sc-6496) 2 µg/mL; anti cistatina C

hecho en conejo (Upstate biotechnology 06-458) 10 µg/mL. Se utiliza como control negativo la lámina que carece del anticuerpo primario.

Después de lavar las preparaciones con PBS estas fueron incubadas durante 1 hr a 37° C con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra hecho en conejo conjugado con biotina (Zymed 81-1640) 5 µg/mL o anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con biotina (Zymed 81-6140) 5µg/mL. Después de lavar las muestras con PBS, estas fueron incubadas con el complejo de peróxidasa-estreptavidina-biotina (Zymed 43-4323) 2.5 µg/mL durante 1 hora a 37° C. Concluida la incubación las preparaciones se lavaron extensivamente y se revelaron usando diaminobencidina como sustrato cromógeno (Kit DAB Zymed 00-2020), la reacción se detiene con agua destilada* y se deshidrata el tejido nuevamente pasando por el tren de deshidratación que consiste en soluciones de Etanol:Agua del 60% al 96%, alcohol absoluto y finalmente xilol. Las láminas se montan en bálsamo de Canadá

*Si es necesario se puede contrateñir sumergiendo las láminas 5 segundos en hematoxilina y se retira el exceso con agua corriente.

5.3.2 Inmunofluorescencia de Catepsina B y Cistatina C.

Para la inmunofluorescencia se utilizaron tanto cortes en parafina como cortes por congelación. Los cortes por congelación no necesitan ningún pre-tratamiento.

Se incuban con los mismos anticuerpos primarios mencionados anteriormente. Posteriormente se añade el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo (anti-IgG de conejo acoplado a rodamina) las láminas se manipulan en un cuarto oscuro. Estas preparaciones se montan en un medio acuoso glicerina-PBS 1:1 para su análisis con microscopio de epi-fluorescencia (Nikon Eclipse 600). Se utilizó un filtro con una longitud de

excitación de 570 nm y una longitud de excitación de 590 nm. Se realizó la fotodocumentación con equipo de microfotografía en película fotográfica tri-X pan asa 400.

5.3.3 Doble inmunolocalización de catepsina B y cistatina C mediante inmunohistoquímica [IHQ] con peroxidasa y fosfatasa alcalina respectivamente.

La doble inmunolocalización se lleva a cabo realizando las mismas seriadamente. Primero se llevó a cabo la inmunolocalización de catepsina B mediante peroxidasa y utilizando la DAB como sustrato cromógeno mediante el procedimiento descrito anteriormente, una vez que se detiene la reacción del revelado (precipitado café). Se enjuaga el tejido con PBS y se incuba el anticuerpo primario anti-cistatina C hecho en conejo (Upstate biotechnology 06-458) 10 µg/mL toda la noche. Después de lavar con PBS se incuba el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina, F(ab')₂ (Sigma immunochemicals A-7778) 1:50. Se enjuaga extensivamente con TBS pH 7.5 y se revela usando BCIP como sustrato cromógeno (kit BCIP/NBT Zymed 00-2211) obteniendo un precipitado morado/azul. Se deshidratan y montan igual que en la inmunohistoquímica simple.

5.4 Traumatismo craneoencefálico (TCE).

Los animales son anestesiados previamente con hidrato de cloral al 8% (0.5 mL/kg) y 15 minutos después se sometieron al TCE. Se utilizó la técnica conocida como "closed head injury".

Consiste en dejar caer un peso de 95 g sobre el cráneo expuesto del animal a una altura de 50 cm, colocando una punta de plástico de 2 mm a 4 mm del bregma, para que el impacto sea puntual y sobre la corteza motora derecha. (Fig 4)

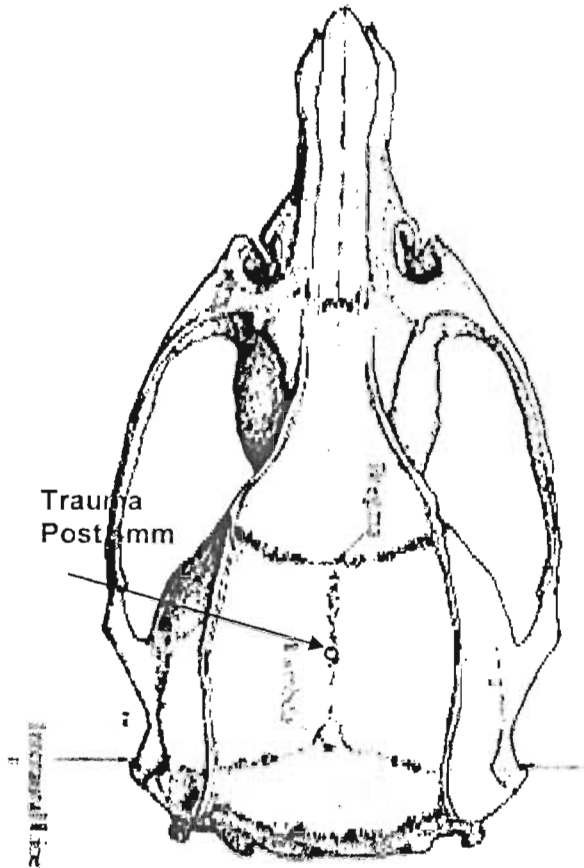


Fig 4 Localización anatómica del sitio en el que se le aplica el TCE a los sujetos de estudio.

6. Resultados

Se realizaron inmunohistoquímicas (IHC) en cortes de cerebro de rata para detectar la expresión y distribución de las catepsinas B, H y de su inhibidor endógeno Cistatina C. Encontrando lo siguiente:

6.1 Expresión y distribución de la de catepsina H en cerebro de rata

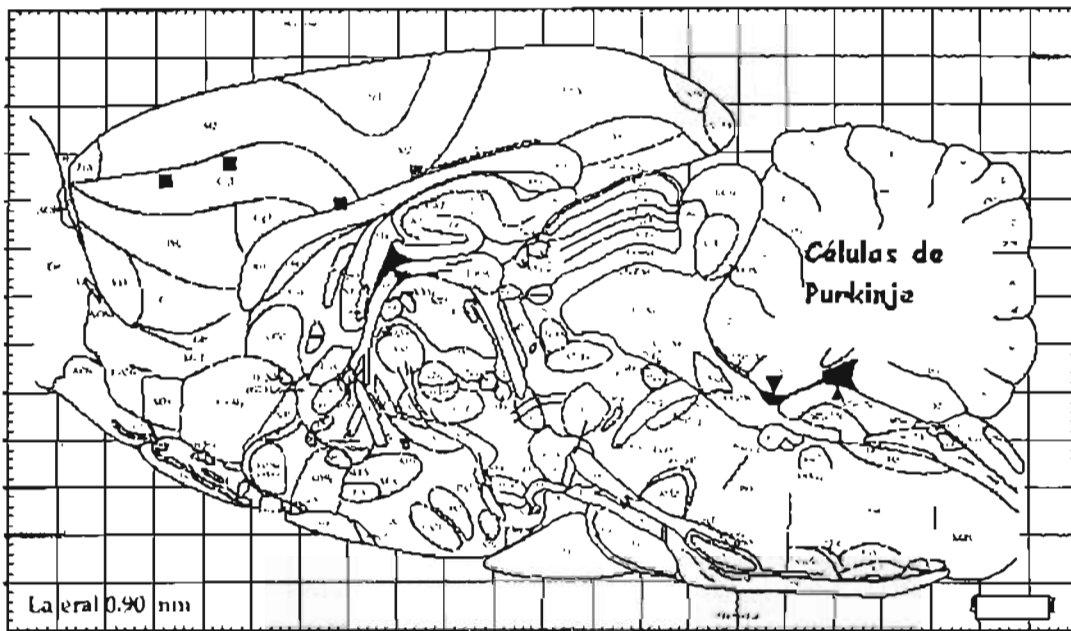


Fig. 5 Expresión y distribución de la catepsina H en cortes sagitales de cerebro de rata, los cuadros rellenos representan una mínima expresión de la catepsina H y los triángulos una intensa

La catepsina H tiene una expresión escasa en el cerebro de rata. Las zonas inmuno reactivas que reconoce el anticuerpo contra catepsina H son: Algunas células de la microglia (Fig. 6A) y cerebelo (ver inmunolocalización en cerebelo, Fig 13B). El único sitio donde tiene una fuerte expresión es en plexo coroideo que a diferencia de catepsina B que no se presenta en esta zona. (Fig 6 B,C).

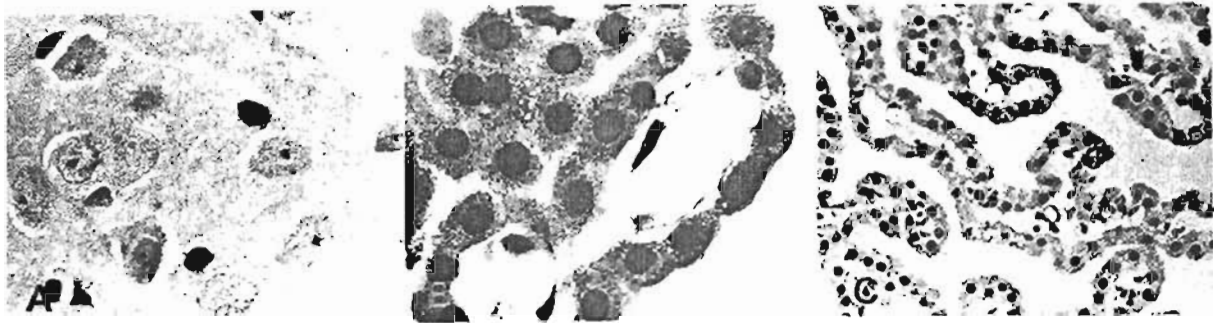


Fig 6. Inmunolocalización de catepsina H en cerebro de rata, precipitado café. (A) Células de la glía positivas. [400X]. (B) Intensa immuno reactividad en plexo coroideo (1000 X). (C) Células del plexo coroideo negativas a catepsina B (400 X).

6.2 Expresión y distribución de la de catepsina B en cerebro de rata

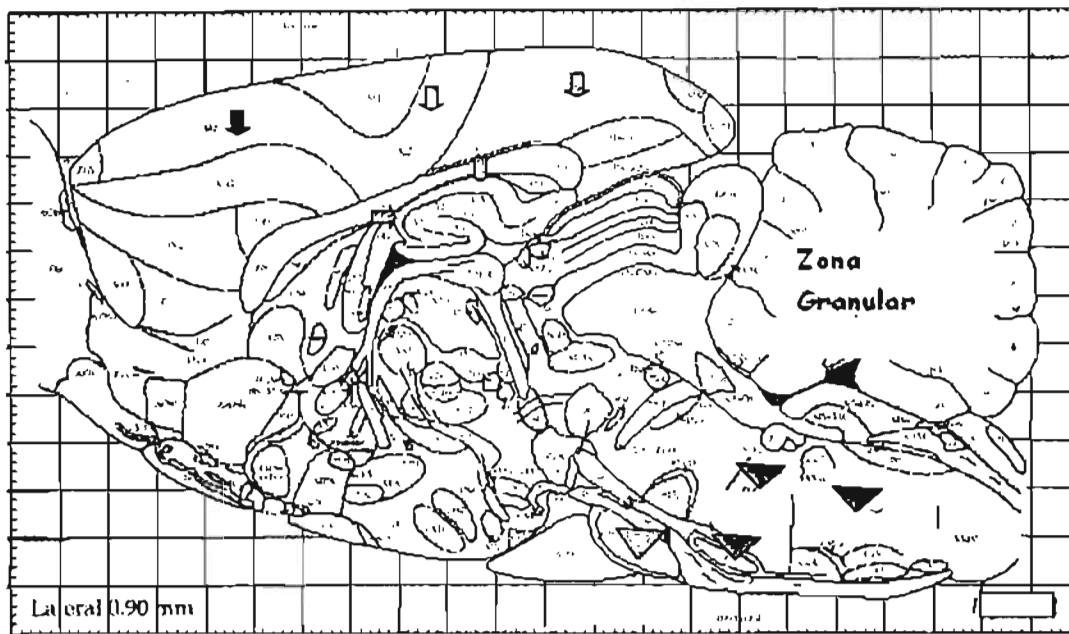


Fig. 7 Expresión y distribución de la catepsina B en cortes sagitales de cerebro de rata. Los triángulos representan las zonas de mayor expresión de la catepsina B, que como se observa es principalmente la zona del tallo cerebral, la médula oblongada y el puente cerebral. Las flechas indican la expresión basal de esta catepsina en la zona de la corteza cerebral e hipocampo.

La catepsina B tiene una mayor distribución en el cerebro. Se encuentra principalmente en la zona del tallo cerebral (Fig 8) y tiene una expresión basal muy débil en hipocampo y corteza. (datos no mostrados).

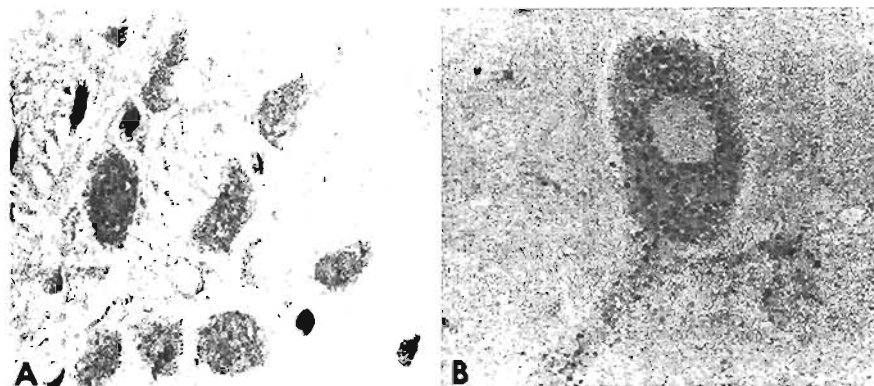


Fig 8. (A) Células del tallo cerebral inmuno reactivas a catepsina B. (B) Distribución lisosomal de la catepsina B, que se observa como una marca granular en el citoplasma de la célula.

Para estas inmunolocalizaciones se utilizaron dos anticuerpos policlonales: un anti-catepsina B hecho en cabra (Santa Cruz sc-6493) y un anti-catepsina B hecho en conejo (Santa Cruz sc-13985). Este último presentó una afinidad mayor con respecto al primero y como resultado se pudo apreciar la inmunolocalización de la catepsina B en una zona específica del hipocampo denominada CA2 (Fig 9,10), para asegurarnos de que se trataba de la catepsina B se realizaron inmunofluorescencias en cortes por congelación de cerebro de rata y la catepsina B se encontraba inmunolocalizada en la misma zona (Fig 10). Cabe mencionar que esta zona solo está presente en algunos de los cortes con los que se trabajaron debido a su limitada extensión.

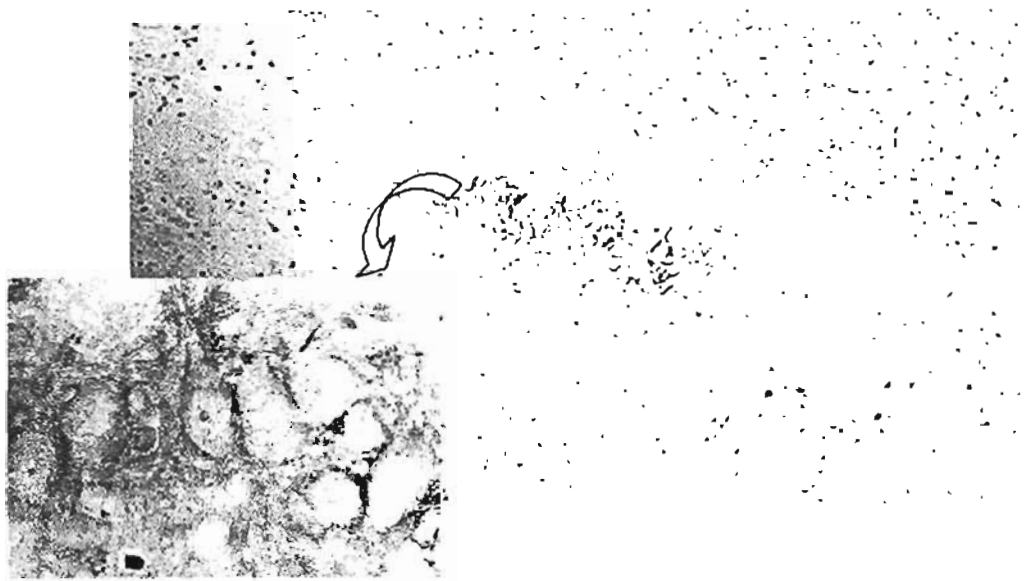


Fig. 9 Inmunolocalización de catepsina B en la región CA2 del hipocampo de rata, mediante IHQ, la catepsina B corresponde al precipitado café y en el recuadro pueden apreciarse las neuronas inmunopositivas al anticuerpo anti-catepsina B a mayor aumento. (1000X)



Fig 10. Inmunolocalización de catepsina B en la región CA2 del hipocampo, detectada mediante e inmunofluorescencia .

6.3 Inmunolocalización de cistatina C

El inhibidor de las cisteín proteasas, cistatina C, no tiene una marcada distribución en el cerebro. En este estudio se inmunolocalizó en la zona del tallo cerebral (Fig 11B) y en plexo coroideo principalmente (Fig 11A). A diferencia de la catepsina B no está presente en la zona de la corteza y del hipocampo, como una expresión basal.

En general al ser una proteína extracelular principalmente no la encontramos en el interior de las células y la marca en el exterior es casi imperceptible. A continuación se presentan imágenes de las zonas que sí mostraron inmuno reactividad. Algunas de las cuales coinciden con las catepsinas de manera natural, sin que el cerebro tenga alguna patología o daño (Fig 11C).



Fig 11. Inmunolocalización de cistatina C en cerebro de rata mediante inmunohistoquímica (azul), los cortes están contrateñidos con verde luz. Las imágenes corresponden a las zonas de mayor expresión de la proteína. (A) Plexo coroideo. (B) Células positivas en el tallo cerebral. (C) Células positivas en el núcleo pontino.

6.4 Inmunolocalización en cerebello

La expresión de estas proteínas en el cerebello, tiene un patrón de marcaje definido para cada una de ellas. Lo que lo convirtió en un control positivo para los inmunoensayos. La cistatina C se expresa principalmente en las células de Purkinje y esta expresión se extiende a través de las dendritas (Fig 12)

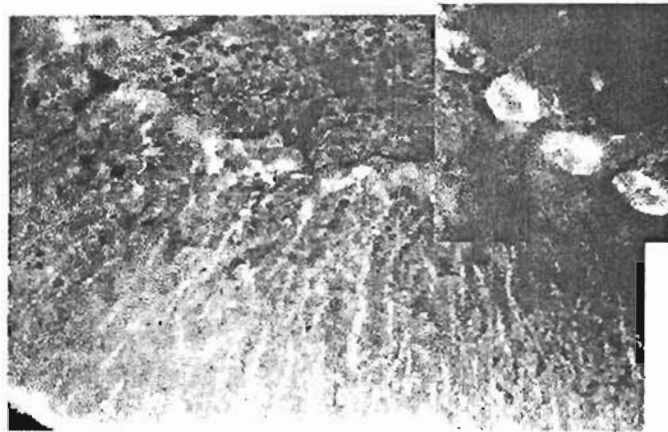


Fig 12. Inmunolocalización de cistatina C en cerebello de rata mediante inmunofluorescencia indirecta. La cistatina C se localiza en la zona de las células de Purkinje y como se puede apreciar se extiende a través de las dendritas.

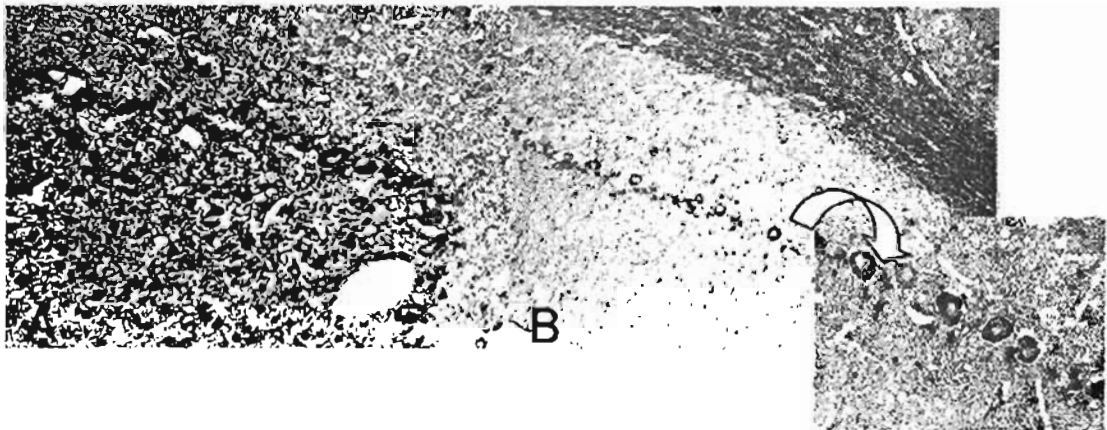


Fig 13. Inmunolocalización de catepsinas B y H en cerebello de rata. (A) La catepsina B se presenta en las zonas granular y molecular del cerebello y en el citoplasma de las células de Purkinje. (B) La catepsina H se presenta en las células de Purkinje y en la sustancia blanca. Las imágenes se obtuvieron de dobles IHC donde la catepsina B se presenta en color café y la cistatina C en color morado.

La catepsina B se encuentra presente en la zona granular, las células de purkinje y en algunas células de la zona molecular del cerebelo (Fig 13A). En cambio la catepsina H está presente en las células de purkinje y en la sustancia blanca del cerebelo; pero no en las zonas molecular o granular (Fig 13B).

6.5 Variación de la expresión dependiendo el ciclo luz/oscuridad.

Se realizaron inmunolocalizaciones de las catepsinas B, H y de la cistatina C para saber si el periodo luz / oscuridad representaba una variable importante en la expresión de estas proteasas y su inhibidor endógeno. Por lo tanto se trabajó con cortes de cerebros de rata sacrificadas a diferentes horas del día. Con base en los trabajos previos de otros colaboradores en donde se observaron cambios en la expresión de cistatina C las 13:00 hrs. (Gonzalez-Navarro), tomamos esta hora como tiempo cero y solamente se observó un ligero incremento en la expresión de la catepsina B en cerebros de ratas sacrificadas a la 1:00, principalmente en la zona de la corteza cerebral como se muestra en la Fig 14.

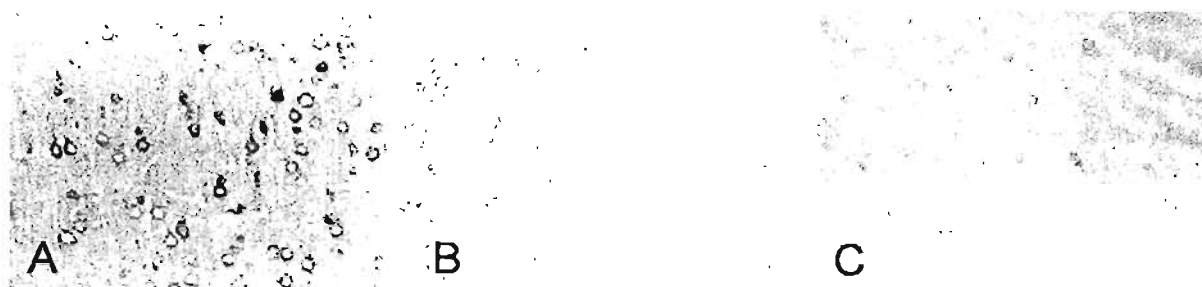


Fig 14. Inmunolocalización de catepsina B en corteza cerebral de rata (A) A la 1:00, (B) 1 pm y (C) control negativo carente de anticuerpo primario.

La catepsina H que se detecta principalmente en el plexo coroideo, no presenta cambios detectables mediante inmunohistoquímica. A la par de este estudio se realizó un análisis de la variación diurna de esta proteasa mediante Western Blott y los datos obtenidos no muestran un cambio en la expresión de esta proteasa a lo largo del día. (Leon P. 2005).

La cistatina C tampoco presentó cambios en su expresión dependiendo de la hora del día a pesar de los reportados por Gonzalez-Rivera R (2003).

6.6 Expresión y distribución de la catepsina B y cistatina C en el traumatismo craneoencefálico.

Para observar cambios en la expresión y distribución de la catepsina B y detectar la posible co-localización con su inhibidor endógeno cistatina C. Se utilizó un modelo de traumatismo craneoencefálico en rata, conocido como *closed head injury*. Los animales fueron sacrificados a diferentes horas después de ser sometidas al TCE (24, 48 y 72 hrs.).

En un principio se trabajó con las primeras horas post-trauma, incluso se sacrificaron los animales inmediatamente después del TCE; sin embargo no se encontró ninguna diferencia con respecto a los cerebros de ratas control (no traumatizadas). Posteriormente se ampliaron los tiempos de sacrificio a 24, 48 y 72 horas post-trauma, durante los cuales los sujetos de experimentación se mantuvieron bajo las mismas condiciones que antes de someterlos al TCE. Las zonas del cerebro que mostraron diferencias en cuanto a intensidad y/o localización fueron el tallo, la corteza y el hipocampo.

6.6.1 Tallo cerebral

Una de las zonas en las que se detectaron mayores cambios fue en el cuerpo trapezoide. Como se observa en la *Fig 15*, el cerebro control (cerebro no sometido a TCE) ya presenta una expresión considerable de catepsina B y su interacción con la cistatina C es mínima (*Fig 15 A, E*), esta interacción no incrementa en el TCE, durante todo el periodo de estudio. Después del TCE se observa un incremento evidente de la catepsina B, a partir de las 48 hrs post-TCE (*Fig 15 C,G*) e incluso se observa que el número de células inmuno reactivas es mayor que a horas anteriores. Es importante resaltar que no se pierde la distribución lisosomal de la catepsina B incluso a las 72 hrs post-TCE (*Fig 15 D,H*).

En el nucleo pontino también se detectaron diferencias (*Fig 16*). Nuevamente se presenta una expresión considerable de la catepsina B, que además en esta zona esta co-localizando con su inhibidor cistatina C , ya que en los cerebros control, ya se observaba la expresión de cistatina C en esta zona (*Fig 11C y 16 A*). Sin embargo a partir de las 48 hrs post-TCE se observa un cambio en la inmuno reactividad de la catepsina B ya que deja de estar compartamentalizada en los lisosomas para volverse citoplasmática, en contraste se observa la marca difuminada por toda la célula (*Fig 16C*). Se hace más evidente la co-localización de la cistatina C a partir de las 48hrs y no se observa mayor cambio o disminución a las 72 hrs post-TCE (*Fig 16 D*).

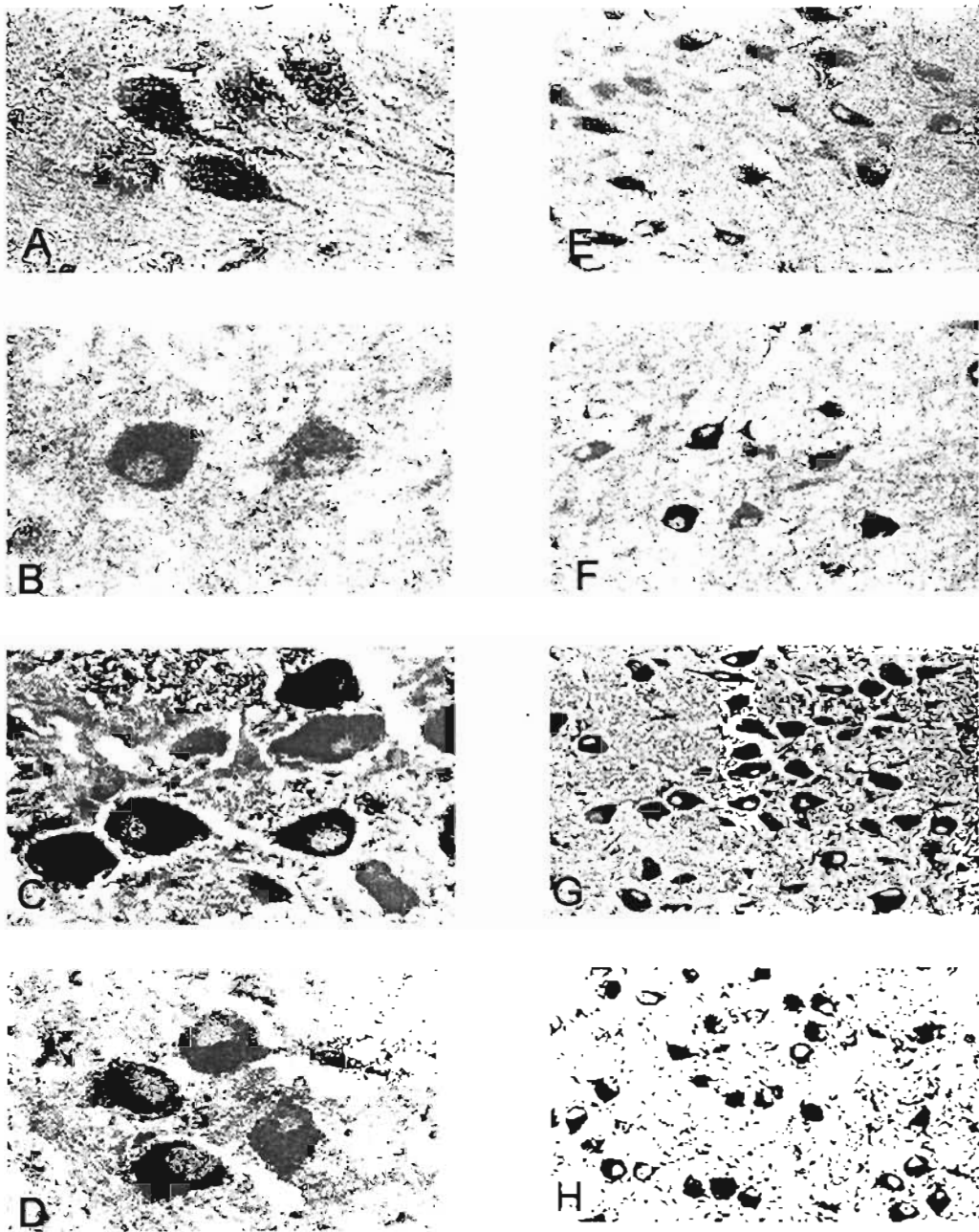


Fig 15. Cambios en la inmuno reactividad de catepsina B y cistatina C en el curso del tiempo, monitoreados por doble IHC. Todos los campos se tomaron de la región del cuerpo trapezoide de cerebros de rata control (A,E) o sometidos a un TCE y sacrificadas a las 24 (B,F), 48 (C,G) y 72 (D,H) hrs post-TCE . Los datos se muestran a dos diferentes magnificaciones 100X (A-D) y 20X (E-H). La catepsina B se observa como un precipitado café y la cistatina C se observa en color morado.

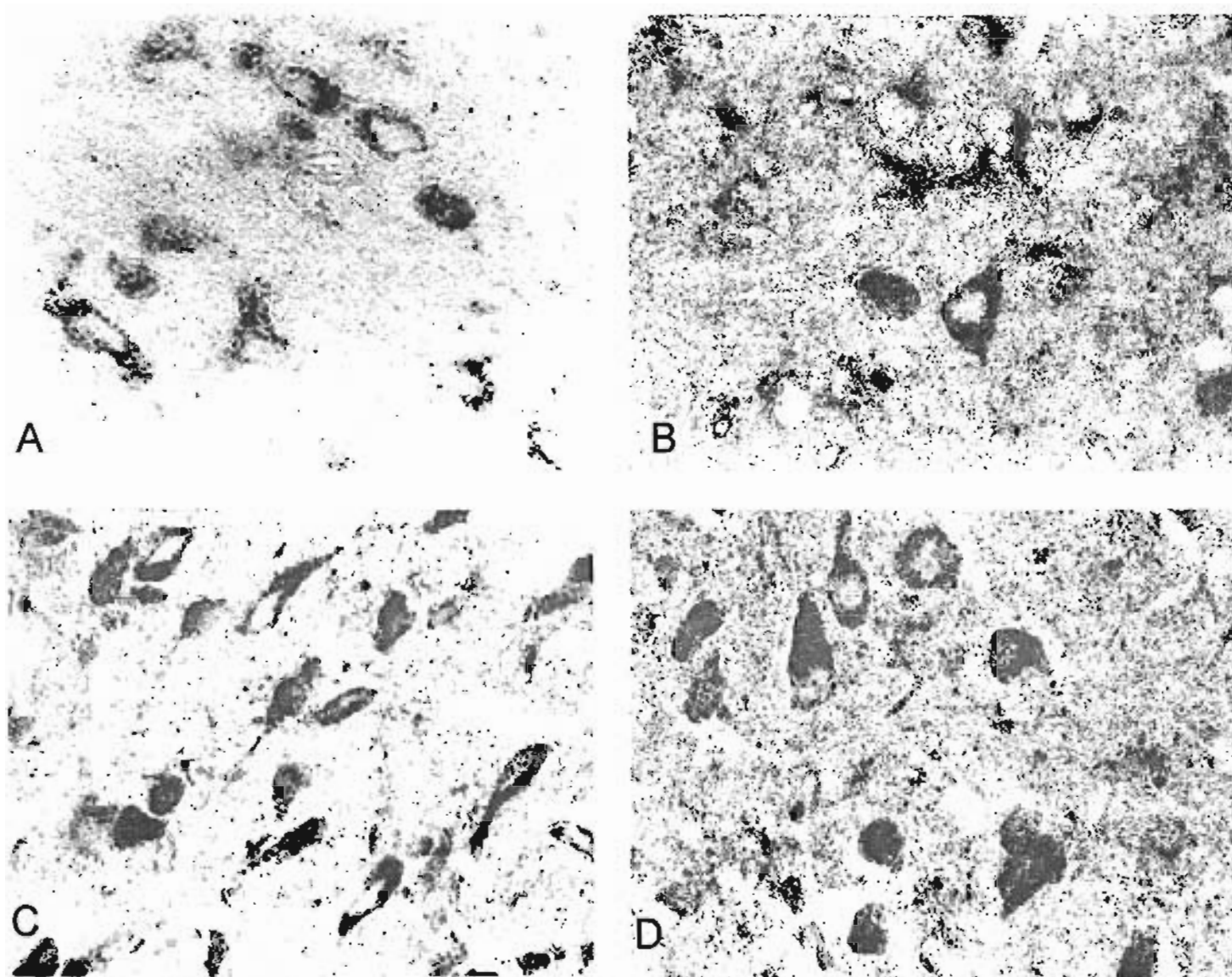


Fig 16. Cambios en la inmuno reactividad de catepsina B (café) y cistatina C (morado) en el curso del tiempo monitoreados por IHQ. Todos los campos se tomaron de la región del núcleo pontino de cerebro de rata control (A) o sometidas a un TCE y sacrificadas a 24hrs (B), 48hrs (C) y 72hrs (D) post-TCE. Magnificación 400X

Otras zonas del tallo cerebral donde catepsina B y cistatina C no co-localizan en los cerebros control, si lo hacen en cerebros traumatizados, como se observa en la Fig 17.

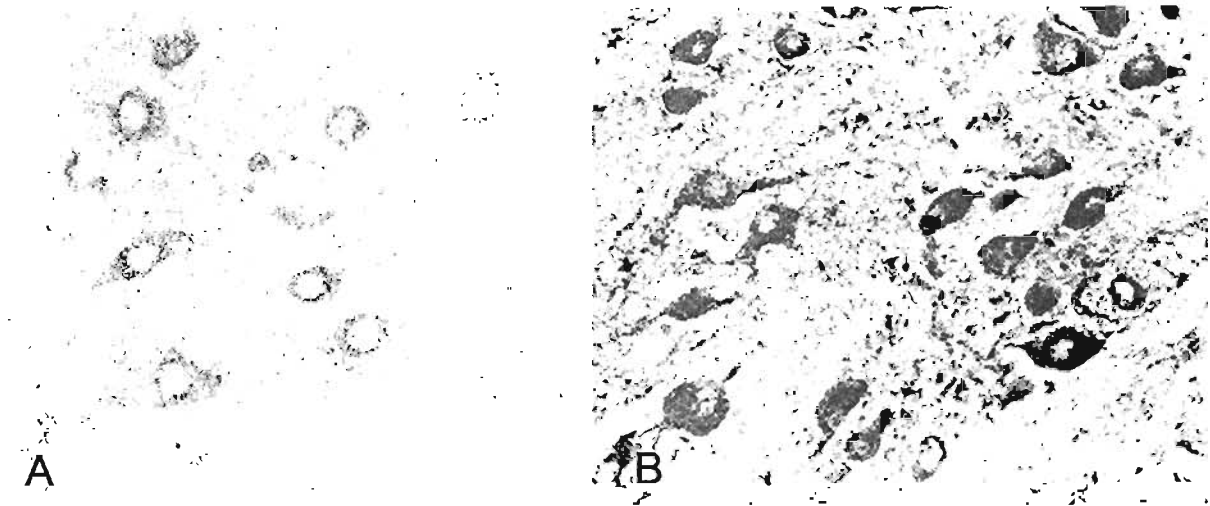


Fig 17. Cambio en la inmuno reactividad de catepsina B (café) y cistatina C (morado) en el tallo cerebral de rata, posterior a un TCE, detectadas mediante doble IHQ. (A) Células positivas a catepsina B en cerebros control, no se observa la cistatina C. (B) Incremento en la inmuno reactividad de catepsina B e inmuno reactividad positiva a cistatina C, en un cerebro obtenido a 72 hrs post-TCE

6.6.2 Corteza cerebral

Al analizar la zona de la corteza cerebral se observaron cambios en dos regiones principalmente la corteza motora y la corteza agranular retrosplenial (RSA). En la corteza motora se observa un incremento evidente en la inmuno reactividad de catepsina B y cistatina C. (Fig 18), ya que en los cerebros control ambas proteínas casi no son detectadas y después del TCE el incremento en su expresión se hace evidente.



Fig 18. Comparación de la inmuno reactividad de catepsina B (café) y cistatina C (morado). (A) Corteza cerebral de rata control. (B) Corteza cerebral 24 hrs post-TCE.

En general en la corteza cerebral motora se detectaron diferencias en la inmuno reactividad de la catepsina B y la cistatina C en los cerebros con TCE (Fig 19). Se observa como incrementa la marca de las 24 a las 48 hrs post-TCE (Fig 19 A,B); de manera contraria a las 72 hrs comienza a desaparecer (Fig 19 C).

También se presentaron cambios similares en la corteza agranular retrosplenial, analizando desde el cerebro control hasta las 72hrs post-TCE (Fig 20 A-D), en esta zona se observa un incremento en la inmuno reactividad de catepsina B y cistatina C y ambas marcas decrecen a las 72 hrs post-TCE, hasta casi desaparecer (Fig 20D).

Observamos que en los cerebros control la expresión de la catepsina B es muy escasa y se limitó a una reducida área perinuclear, además la cistatina C no está presente en la mayoría de las células (Fig 20A). A las 24hrs post-TCE el incremento en la expresión de catepsina B es evidente, tanto que incluso se distingue su presencia en los axones; adicionalmente se observa la co-localización con la cistatina C (Fig 20B). A las 48 hrs post-TCE la expresión de ambas proteínas sigue incrementada (Fig 20C); pero a las 72hrs post-TCE ambas proteínas decrecen en la intensidad de su expresión hasta casi desaparecer, de hecho la imagen observada es similar a la del cerebro control (Fig 20D).

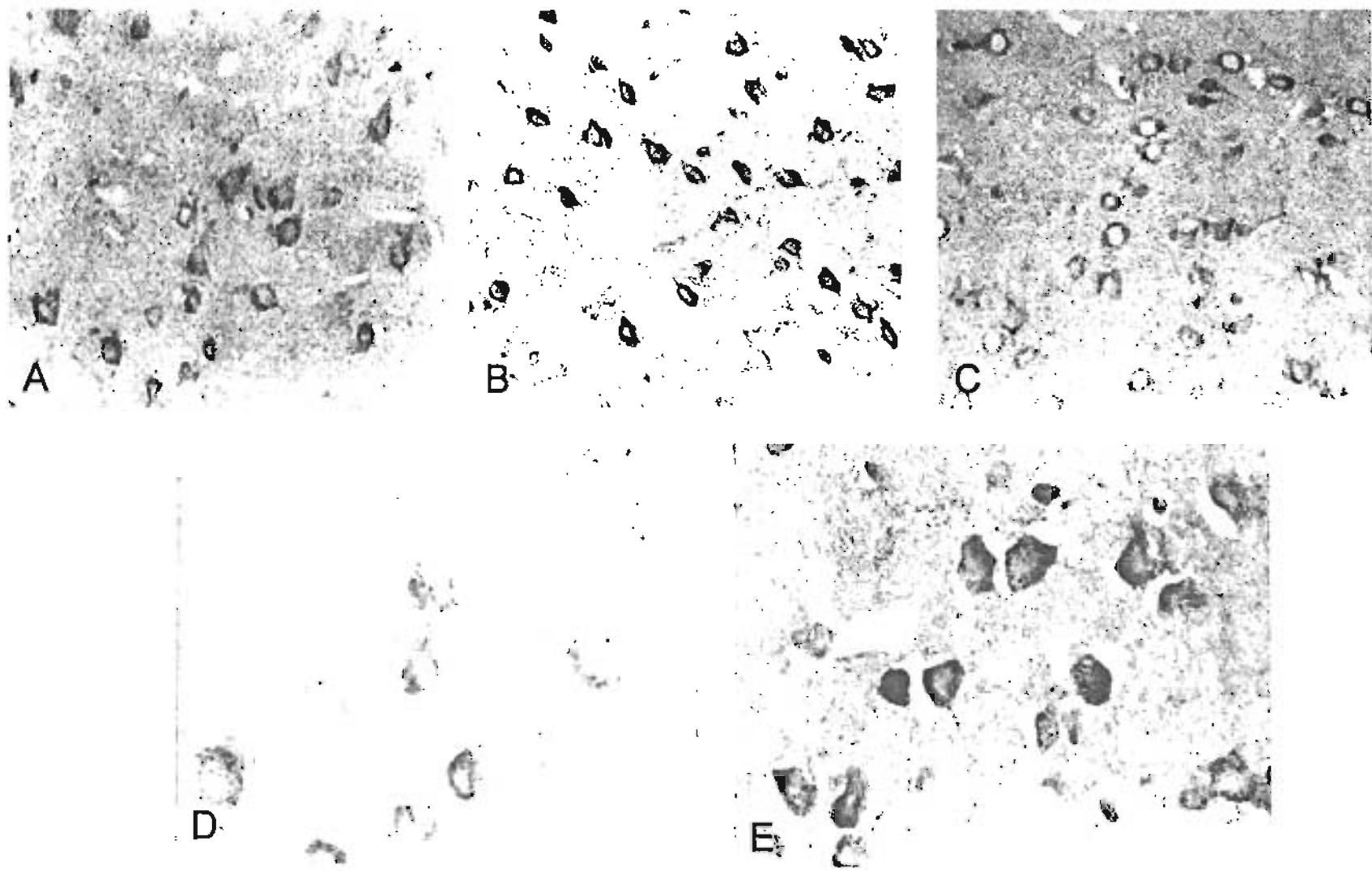


Fig 19. Curso temporal de la inmuno reactividad de catepsina B (café) y cistatina C (morado) monitoreados por IHQ. Todos los campos se tomaron de la región de la corteza cerebral motora de ratas sometidas a TCE y sacrificadas a 24 hrs (A, D) 48 hrs (B, E) y 72 hrs (C) post-TCE.

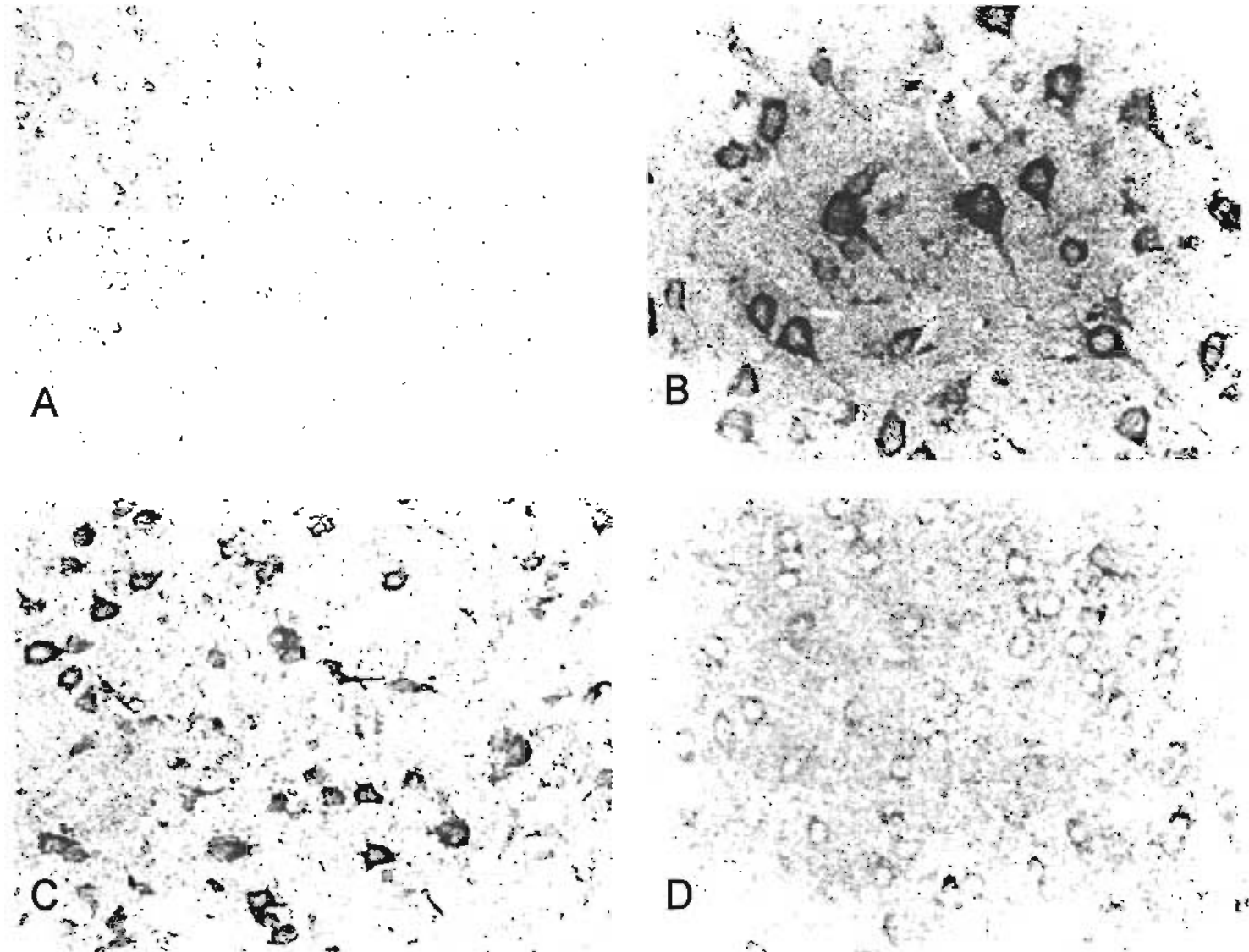


Fig 20. Curso temporal de la expresión de catepsina B (café) y cistatina C (azul) por IHQ como consecuencia de un TCE. Todos los campos se tomaron de la RSA de rata control (A) o sometida a un TCE y sacrificadas a (B) 24 hrs, (C) 48 hrs y (D) 72 hrs post-TCE.

Para apreciar mejor la co-localización de la catepsina B y su inhibidor cistatina C en la RSA se presentan imágenes a 1000X (Fig 21).

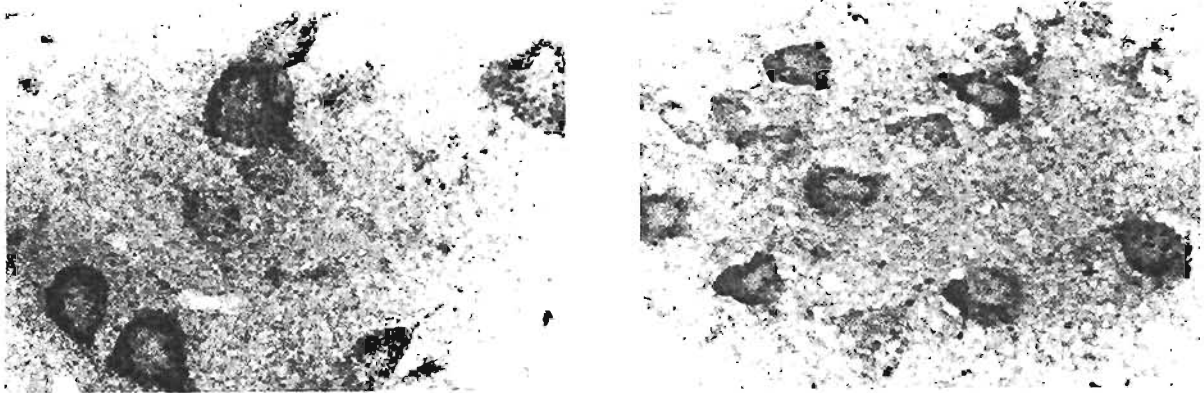


Fig 21. Co-localización de catepsina B y cistatina C en células de la RSA. La catepsina B se observa como granulos color café y la cistatina C como precipitado color morado.

6.6.3 Hipocampo

Las neuronas piramidales de esta zona se han caracterizado por ser muy sensibles al daño neuronal y el daño causado por el TCE no fue la excepción. Se estudiaron dos zonas principalmente la CA1 (Fig 22) y la CA3 (Fig 24). Y aunque esta reportada la alta susceptibilidad de la zona CA1 al daño neuronal isquémico y en otros procesos neurodegenerativos (Lee et al , 1991), la zona CA3 también presentó cambios considerables en la expresión de catepsina B y cistatina C.

Lo primero que se observó fué que existe una expresión basal mínima de catepsina B, en la zona CA1 del hipocampo (Fig 22A), no siendo lo mismo para la cistatina C, después de un TCE se observa el incremento en la inmuno reactividad de la catepsina B y se logra detectar a su inhibidor la cistatina C, cuya mayor interacción observada se presenta a las 72 hrs post-TCE (Fig 22B-D). El incremento en la catepsina B en estas células

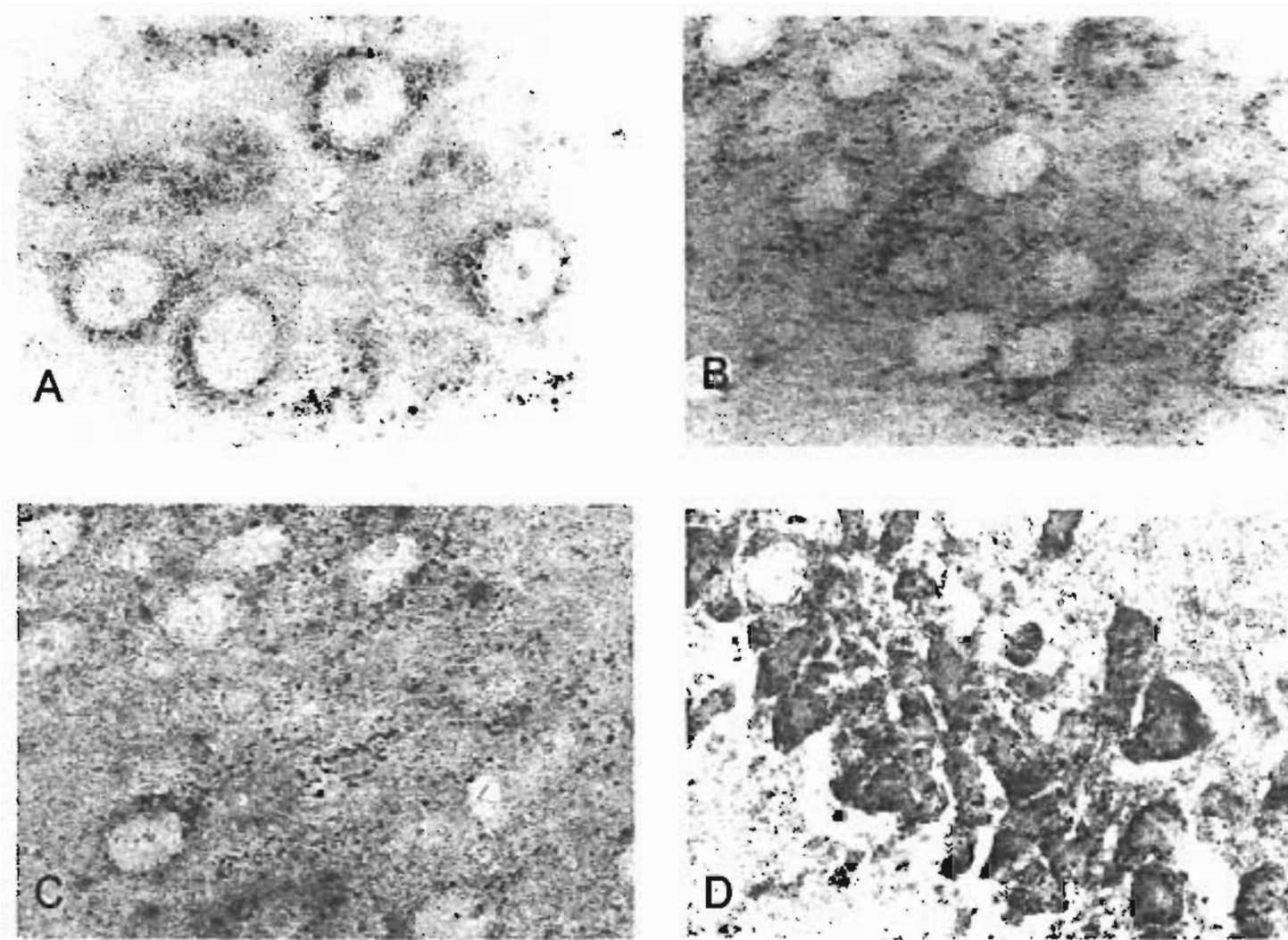


Fig 22. Doble IHQ para catepsina B [café] y cistatina C [morado]. Secciones de la zona CA1 del hipocampo de rata sometidas a TCE. (A) Control, muestra la distribución de catepsina B contenida en los lisosomas. (B) 24 hrs, (C) 48 hrs, (D) 72 hrs post-TCE. Las células dañadas muestran una intensa immuno reactividad a catepsina B que ha perdido su distribución lisosomal.

dañadas, muestra una aparente pérdida de la distribución lisosomal, junto con la reducción del núcleo y el citoplasma deformado ligeramente, apreciándose ahora esta marca que parece ser citoplasmática y lisosomal, que probablemente a tiempos mayores desaparezca (Fig 22D).

Como ya se había comentado la zona CA3 también presenta cambios en su expresión. Al igual que la zona CA1 se cuenta con una expresión mínima basal de la catepsina B y no se detecta cistatina C (Fig 24A). Después del TCE se presenta un incremento en ambas marcas (Fig 24B-D). En este caso contrario al anterior la marca de catepsina B no se vuelve citoplasmática sino que simplemente comienza a disminuir a las 72 hrs post-TCE (Fig 24 D). La co-localización de catepsina B y cistatina C, se aprecia mejor a mayor aumento. (Fig 23)



Fig 23. Co-localización de catepsina B (café) y cistatina C(morado) en neuronas piramidales de la zona CA3 del hipocampo de rata sometida a TCE.

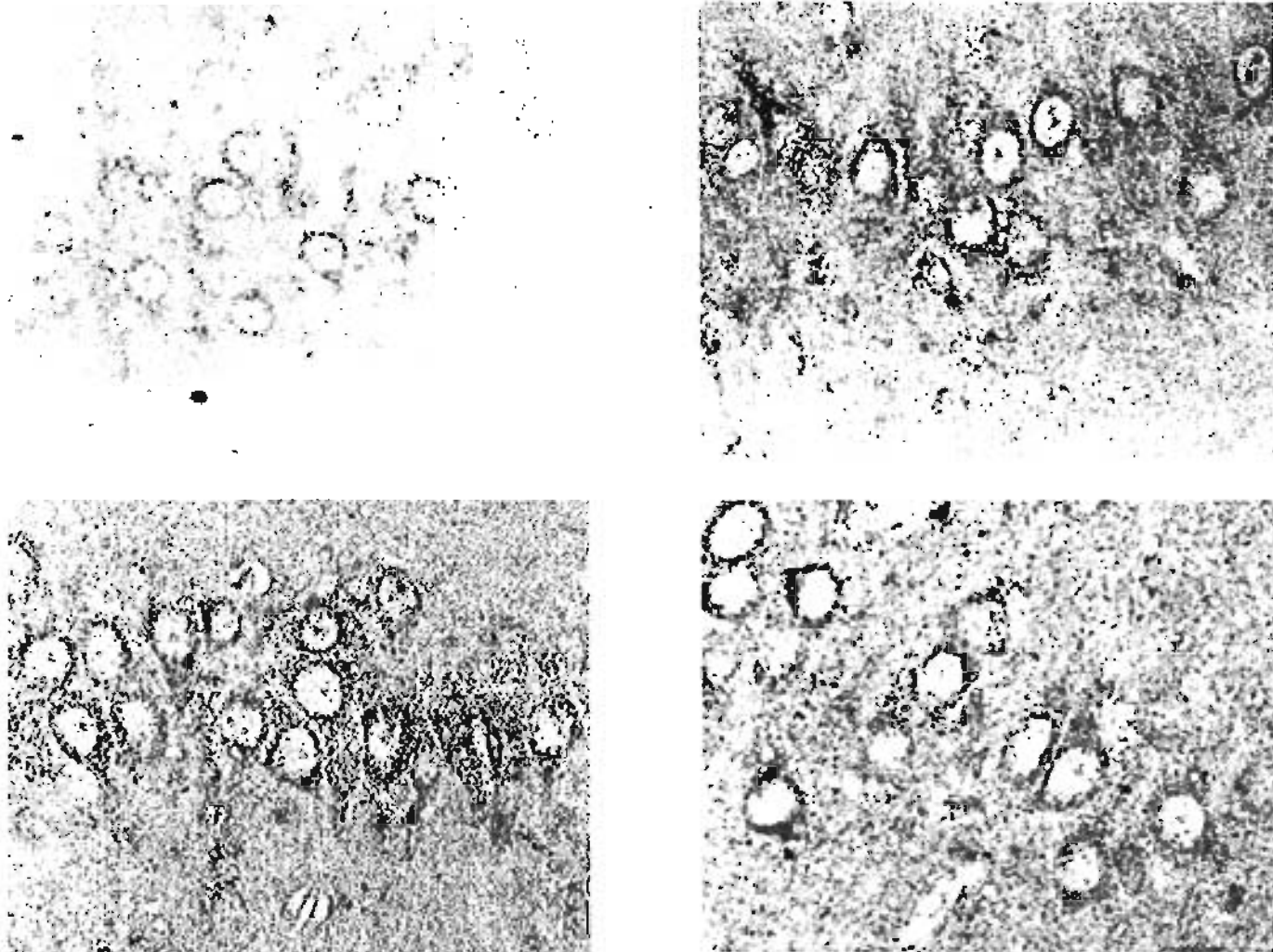


Fig 24. Doble IHQ de catepsina B (café) y cistatina C (morado). Secciones de la zona CA3 del hipocampo tomadas de ratas sometidas a TCE. (A) cerebro control, muestra la distribución de la catepsina B contenida en los lisosomas. (B) 24 hrs, (C) 48 hrs post-TCE se observa un incremento en la inmuno reactividad de catepsina B y co-localización con la cistatina C. (D) 72 hrs post-TCE, se observa un decline en la inmuno reactividad de catepsina B y cistatina C.

Cada una de las zonas : tallo cerebral, corteza e hipocampo, donde se localizaron estas proteínas presentaron sus propias diferencias en cuanto a la expresión y localización de las mismas. Sin embargo queda claro que tanto la catepsina B como la cistatina C, presentaron un incremento en su expresión a consecuencia del traumatismo craneoencefálico; esta variación se presenta en ocasiones a las 24 hrs post-TCE, mientras que en otras zonas del cerebro fue más marcada a las 48 hrs post-TCE, cambiando incluso de localización intracelular.

En lo que respecta a la cistatina C las diferencias observadas se basaron en cuanto a su presencia o ausencia en éstas zonas del cerebro en estudio, fue evidente su presencia en zonas como el hipocampo donde previo al TCE no se inmunolocaliza y posterior al TCE se observan zonas de inmuno reactividad positiva a esta proteína y que además co-localizan con la catepsina B.

7. Discusión

Lo primero que se estudió fue la distribución normal de estas moléculas en cerebros controles, que no fueron sometidos a ningún proceso isquémico o traumático.

Encontramos a la *cistatina C* principalmente en plexo coroideo y en algunas células del tallo cerebral. Sin embargo cuando el cerebro sufre un TCE, aumenta su expresión en zonas donde se presentaba como el núcleo pontino, y en otras donde no se inmunolocalizaba, co-localiza con la catepsina B.

Esta reportado que la *catepsina H* es una de las principales proteasas en la degradación de neuropéptidos y que es un marcador de la activación de la microglia y astrocitos después de estímulos epileptogénicos. (Ryan R. E, *et al.* 1995). No obstante observamos una distribución en el cerebro de rata muy escasa, limitándose a algunas zonas del tallo cerebral y el plexo coroideo. Se realizaron inmunolocalizaciones para ver si como consecuencia del TCE, se observaba su expresión en la zona del daño al tejido (la corteza cerebral) o alguna otra; su expresión no cambió con respecto a los cerebros controles y no se observó co-localización con la *cistatina C*. La explicación más probable de que este patrón no se modifique, puede deberse a que la molécula no se conserva a través de todo el proceso de la inmunolocalización, ya que según Barret A, (1987) la *catepsina H* de rata es sensible al calentamiento.

La *catepsina B* se localiza en núcleo, citoplasma y principalmente en los lisosomas (Keppler D, *et al* 1996) y es en los lisosomas donde la hemos inmunolocalizado observándose como una marca compartimentalizada

en los cerebros control. Cuando se realizó un análisis de su expresión de acuerdo a la hora del día, encontramos que en horas de luz (13:00 hrs) la expresión de catepsina B en corteza cerebral era apenas perceptible y en horas de oscuridad (1:00 hrs) se observaba intensa. Lo que concuerda con los datos presentados por Vinall (2000) donde el daño al cerebro es mayor en horas de oscuridad.

En el cerebelo las catepsinas B, H y la cistatina C se expresaron de manera diferenciada y fue esta expresión la que nos permitió utilizar esta zona como un control positivo en los inmuno ensayos.

Traumatismo Craneoencefálico

En la zona de la corteza cerebral esperábamos una expresión intensa debido a que sufre el daño principal. Efectivamente se observaron incrementos en la expresión de la catepsina B además de la co-localización de cistatina C, la cuál no estaba presente en los cerebros controles. La expresión de catepsina B comenzó a disminuir a las 72 hrs post-TCE, lo que sugiere dos posibilidades: a) Interrupción de la síntesis de la proteína; b) Las determinantes antigénicas están siendo degradadas.

De acuerdo a reportes existentes (Leker R. *et al*, 2002) este daño debería presentarse de manera estratificada existiendo una zona o lesión primaria con células necróticas que se pierden en los primeros minutos después del TCE y la lesión secundaria dividida en zonas de penumbra donde se observara una disminución en la inmuno reactividad de la catepsina B a medida que nos alejamos de la zona del daño; pero no fue eso lo que observamos sino que los cambios en la expresión de ésta proteasa fueron iguales en las diferentes zonas de penumbra y además

afectaron zonas lejanas a la corteza cerebral, como el hipocampo y el tallo.

Se decidió estudiar la zona del hipocampo, porque se sabe es muy sensible a los procesos neurodegenerativos como en el caso de un TCE. Con respecto a la cistatina C observamos que era inmunolocalizada sólo después de un TCE, mientras que la catepsina B siempre está expresada en la zona. Existen reportes de la elevación de la cistatina C en procesos neurodegenerativos; pero nosotros no los observamos, probablemente este incremento de la cistatina C se esté dando a un periodo de tiempo mayor, entre los días 3 y 7 después del daño neuronal como lo reporta Hill (1997). Observamos el incremento de la inmunoreactividad de catepsina B en las zonas consideradas como resistentes (CA3) y vulnerables (CA1) a la isquemia. Después del TCE, los gránulos lisosomales de las neuronas CA1 engrosaron y pasadas las 48 hrs. , se muestra la liberación en el citoplasma.

Se sabe que las neuronas piramidales CA1 del hipocampo son vulnerables a la isquemia transitoria, que es una de las consecuencias que se presentan después de un TCE y se ha demostrado que la presencia de micro-calpaína localizada en la membrana alterada de los lisosomas en las neuronas post-isquémicas CA1, razón por la cual se especula la liberación de las proteasa lisosomales, incluida la catepsina B.(Yamashima T, 2000); resultados que concuerdan con los cambios en la localización intracelular de catepsina B que nosotros observamos.

En contraste en la zona CA3, la inmunoreactividad de catepsina B se ve incrementada en la zona perinuclear sin haber liberación de los lisosomas. Estos resultados concuerdas con datos reportados por Kodha (1996) en hipocampo de primates y Nitatori en gerbos (1995).

En lo referente a la inmunodetección de cistatina C en neuronas susceptibles (CA1) en este modelo de TCE, se enfoca la atención al papel neuroprotector de ésta proteína. Especulando que en reacción a esta descompartmentalización de la catepsina B la cistatina C extracelular sea transportada al interior de la célula para proteger a la célula de una disfunción lisosomal excesiva y por lo tanto en el inmunoensayo se observe como una co-localización de dichas moléculas.

Otra de las zonas donde también se presentaron cambios en la expresión de catepsina B y cistatina C, a consecuencia del TCE fue el tallo cerebral, sobretodo en la zona del núcleo pontino y el cuerpo trapezoide. Cabe mencionar que la expresión de la catepsina B en los cerebros controles era evidente; no obstante cuando se analizaron después de un TCE se detectaron cambios considerables tanto en la catepsina B como en la cistatina C. Estos resultados llaman la atención ya que estas células se encuentran en un área distante a la zona del impacto. Estos cambios puedan atribuirse a la presencia de edema, que pudiera estar comprimiendo las células, o bien a un fenómeno llamado depresión cortical extendida [DCE], que es causado por el calcio intracelular que despolariza las células (Leker R, *et al* 2002).

En este estudio se demostraron los cambios en la expresión de catepsina B y cistatina C, en el proceso de la neurodegeneración post-traumática en un modelo de TCE y no se observaron cambios para la catepsina H. Es posible que la catepsina B con una fuerte actividad proteolítica sea capaz de gradualmente dañar las estructuras de células normales y que la cistatina C esté siendo dirigida hacia su sustrato como una respuesta homeostática en el cerebro para evitar el daño irreparable a las células.

8. CONCLUSIONES

1. La expresión y distribución de la catepsina H en cerebro de rata se circunscribe al plexo coroideo y algunas células de la glia. Encontrando que este patrón no se modifica a consecuencia de un traumatismo craneoencefálico.

2. El patrón de expresión y distribución de la catepsina B es intensa en las células del tallo cerebral y se presenta escasamente en la corteza cerebral y el hipocampo.

3. La cistatina C no se encuentra en concentraciones detectables mediante IHQ en cerebro de rata y únicamente es localizada en plexo coroideo y algunas células del tallo cerebral.

4. El traumatismo craneoencefálico provocó un incremento en la expresión de catepsina B y modificaciones en su localización dentro de algunas células (de lisosomal a citoplasmática). Además se hizo evidente la co-localización con su inhibidor endógeno la cistatina C, en todas las zonas estudiadas (corteza, hipocampo y tallo cerebral).

5. Los cambios encontrados en la reactividad de la catepsina B y su inhibidor endógeno no solo se presentaron en las células cercanas a la agresión (corteza); también se observaron en zonas alejadas al trauma, como lo fue el hipocampo y el tallo cerebral.

6. Este modelo de TCE en rata, permitió entender la expresión y la distribución de las catepsinas B, H y su inhibidor endógeno cistatina C, logrando identificar un patrón para cada una de estas moléculas mediante inmunohistoquímica.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahamson M, Grubb A, Olafsson I, Lundwall A. **1987** Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS lett.* 216: 229-233
2. Artal-Sanz M, Tavernarakis N, **2005**. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS lett.* 579-15: 3287-3296
3. Barret A. J. **1986** The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta* 45: 1363-1364.
4. Barret A. J. **1987** The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 12: 193-196
5. Baudys M, Meloun T, Gan-Erdene T, Fusek M, Mares M. **1991**. S-S bridges of cathepsin B and H from bovine spleen: a basis for cathepsin B model building and possible functional implications for discrimination between exo- and endopeptidase activities among cathepsins B, H and L. *Biomed. Biochim. Acta* 50: 569-577.
6. Brguljan P, Turk V, Cimerman N, Brzin J, Krizaj I, Popovič T. **2003**. Human brain cathepsin H as a neuropeptide and bradykinin metabolizing enzyme. *Peptides* 24: 1977-1984.
7. Chapman H. a.; Riese R. J., Shi G. P. **1997**. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 63-88.
8. Cimerman N, Meško-Brguljan P, Krašovec M, Šuškovič S, Janko Kos J. **2002**. Circadian rhythms of cysteine proteases and cystatins, potential tumor markers in normal sera. *Radiol Oncol* 36:180-182
9. Deng A., Irizarry M. C., Nitsch R. M., Growdon J. H., Rebeck G. W. **2001** Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *American Journal of pathology.* 159: 1061.
10. Fox T, de Miguel E, Mort JS, Storer AC. **1992**. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* 31: 12571-12576.

11. González-Rivera R. **2003**. Identificación y caracterización bioquímica de proteínas de secreción con expresión diferencial durante sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR). Tesis de maestría de Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias.
12. González-Rivera R, Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, Landa A, Prospero-García O, Navarro L. **2003**. Identification of a 12 KDa protein extracted from cerebrospinal fluid (CSF) of rats deprived of rapid eye movement sleep (REMS). Society for Neurosciences 33th Annual Meeting, November 8-12, New Orleans.
13. Grzonca Z., Jankowska E., Kasprzykowski F., Kasprzykowska R., Lankiewicz L., Wiczak W., Wiczerzak E., Ciarkowski J., Drabik P., Janowski r., Kozack M., Jaskólski M., Grubb A. **2001**. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochemica Polonica* 48: 1-20.
14. Hasilik A. **1992** The early and late processing of lysosomal enzymes: Proteolysis and compartmentation. *Experientia*. 48: 130-151
15. INEGI. Estadísticas Demográficas Cuaderno No. 14 Edición 2002
16. Ishimaru H., Ishikawa K., Ohe Y., Takahashi A., Maruyama Y. **1996** Cistatin C and apolipoprotein E immunoreactivities in CA1 neurons in ischemic gerbil hippocampus. *Brain Res*. 709: 155-162
17. Islekel H., Islekel S., Guner G., Ozdamar N. **1999**. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia-reperfusion. *Brain Res*. 843: 18-24
18. Juurlink B.H., Paterson P.G. **1998**. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J. Spinal Cord Med*. 21:309-334.
19. Keepler D, Sameni M, Moin K, Mikkelsen T, Diglio C.A, Sloane B.F. **1996**. Tumor progression and angiogenesis: cathepsin B & Co. *Biochem. Cell Biol*. 74, 799-810.
20. Kohda Y, Yamashita T, Sakuda K, Yamashita J, Ueno T, Tsuchiya K, Yoshioka t, Kominami E. **1996**. Dynamic changes of cathepsins B and L expression in the monkey hippocampus after transient ischemia. *Biochem. And Biophys. Res. Commun*. 228: 616-622.

21. Kominami E., Tsukahara T., Bando Y., Katunuma N. **1985** Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J. Biochem.* 98:87-93
22. Laterza O.F., Price C. P., Scott M. G. **2002**. Cystatin C: a improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem.*48: 699-707.
23. Lee K. S., Frank S., Vanderklis P., Arai A., Lynch G. **1991** Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemic. *PNAS USA* 88: 7233
24. Levy E., Sastre M., Kumar A., Gallo G., Piccardo P., Ghetti B., Tagliavini F. **2001**. Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60: 94-104.
25. Markgraf C. G., Velayo V. N., Johnson M. P., McCarty D.R., Medi S., Koehl J. R., Chimielewski P. A., Linnik M. D., **1998** six hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29: 152
26. Nagai A., Murakawa Y., Terashima M., Shimode K., Umegae N., Takeuchi H., Kobayashi S. **2000**. Cystatin C and cathepsin B in CFS from patients with inflammatory neurologic disease. *Neurol.* 55:1828
27. Nagai A., Terashima M., Harada T., Shimode K., Takeuchi H., Murakawa Y., Nagasaki M., Nakano A., Kobayashi S. **2003**. Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in CFS from patients with leptomeningeal metastasis. *Clin. Chim. Acta.* 329: 53
28. Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R. C. **2000**. Seizures and stroke. In: *Molecular Neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience.* McGraw-Hill, NY, pp 479-503,
29. Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y. **1995** *J. Neurosci.* 15 : 1001-1011
30. Olsson T., Nygren J., Hakansson K., Lundblad C., Grubb A., Smith M. L., Wieloch T. **2004** Gene deletion of cystatin C aggravates brain damage following focal ischemia but mitigates the neuronal injury after global ischemia in the mouse. *Neuroscience* 128: 65-71.

31. Palm D. E., Knuckey N. W., Primiano M. J., Spangenberg A.G., Johanson C. E. **1995** Cystatin C, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 691: 1-8.
32. Panikashvili D., Simeonidou C., Ben-Shabat S., Hanus L., Breuer A., Mechoulam R., Shonami E. **2001**. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413: 527-531.
33. Pope A, Nixon R.A., **1984**. Proteases of human brain. *Neurochem. Res.* 9: 291-323.
34. Povlishok J.T., Christman C.W. **1995**. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animal and humans: a review of current thoughts. *J. Neurotrauma* 12: 555-564.
35. Programa Nacional de Salud 2001-2006. Programa de Acción para Prevención y Rehabilitación de discapacidades. PreveR-Dis. Secretaría de Salud.
36. Ryan R.E, Sloane B.F, Sameni M, Wood P.L. **1995**. Microglial cathepsin B: An immunological examination of cellular secreted species. 65-3: 1035-1045.
37. Sherriff F. E., Bridges L. R., Gentleman S. M., Sivaloganathan S., Wilson S. **1994**. Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 88: 433-439.
38. Takio K., Towatari T., Katunuma N., Teller e. C., Titani K. **1983**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 80: 3666-3670
39. Vinall P.E., Kramer M.S., Heinel L.A., Rosenwasser R.H., **2000**. Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult. *J. Neurosurg.* 93: 82-89
40. Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka t, Kominami E. **1998**. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on "calpain-cathepsin hypothesis" *Eur. J. Neurosci.* 10: 1723-1733
41. Yamashima T. **2000**. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog. Neurobiol.* 62: 273-295.

42. Yasuhara O., Hanai K., Ohkubo I., Sasaki M., McGeer P. L., Kimura H.
1993 Expression of cystatin C in rat, monkey and human brains. *Brain Res.* 628: 85-92