



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estudio de la expresión diurna de la catepsina  
H, en el plexo coroideo de la rata.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

PABLO BENJAMÍN LEÓN ROSARIO

Director de Tesis:

Dr. JUAN A. MOLINA GUARNEROS



Unidad en la Diversidad:  
Zaragoza Frente al Siglo XXI

México, D.F. 2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: Mtra. Rosalinda Escalante Pliego
- Vocal: M. en C. Juan A. Molina Guarneros
- Secretario: Dra. Consuelo Rubio Póo
- 1er Suplente: Dr. Alberto Monroy García
- 2do Suplente: M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

## **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.
- Contó con los apoyos de: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-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:

\_\_\_\_\_  
Pablo Benjamín León Rosario

Agradecimientos:

A todas las personas que colaboraron en la realización de este trabajo.

Dedicatoria:

Con toda gratitud, dedico este trabajo a mi madre, Reynalda N. Rosario Ortíz, a mi padre, Aristeo León Ortíz y a mis hermanos, Aristeo León Rosario y Gabriela León Rosario.

"Ustedes son el soporte de todos mis sueños."

## ÍNDICE.

1. Abreviaturas.	5
2. Resumen.	7
3. Marco teórico.	8
3.1 Generalidades.	8
3.2 Traumatismo Craneoencefálico (TCE).	9
3.3 Vulnerabilidad del sujeto dependiente de la hora del día.	11
3.4 Catepsinas.	12
3.5 Cistatina C.	13
3.6 Daño neuronal, catepsinas y cistatina C.	14
3.7 Plexos coroideos.	16
3.8 Ritmo diurno.	17
3.9 Variaciones diurnas de catepsinas y de cistatina C.	17
4. Planteamiento del problema.	19
5. Objetivos.	20
6. Hipótesis.	20
7. Material y Métodos.	21
7.1 Materiales.	21
7.1.1 Extracción de LCR.	21
7.1.2 Homogenizado de tejidos.	21
7.1.3 Cuantificación de proteína.	21
7.1.4 Inmunoensayo Enzimático en Fase Sólida (ELISA).	22
7.1.5 Western blot.	23
7.1.6 Software.	24
7.1.7 Animales	24
7.2 Metodología.	25
7.2.1 Traumatismo craneoencefálico (TCE).	25
7.2.2 Extracción de tejidos cerebrales.	25
7.2.3 Inmunoensayo Enzimático en Fase Sólida (ELISA).	26
7.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	27
7.2.5 Western blot.	27
8. Resultados.	30
9. Discusión.	43
10. Conclusiones.	45
11. Glosario.	46

12. Anexos.	49
A. Preparación de soluciones.	49
13. Bibliografía.	52

## 1. ABREVIATURAS.

AB	Complejo avidina-biotina
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
DAB-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Diaminobencidina-peróxido de hidrógeno
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Inmunoensayo Enzimático en Fase Sólida
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilo Daltones
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
NaOH	Hidróxido de sodio
SDS-PAGE	Gel electroforético de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
PBS	Amortiguador de fosfatos salina
pH	Potencial de iones hidrógeno
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RCF	Fuerza relativa de centrifugación
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletiletilendiamina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol

Tris-HCl	Clorhidrato de 2 - amino - 2 - (hidroximetil) - 1, 3 - propanediol
Tween 20	Monolaurato de polioxietilenglicolsorbitol
μL	Microlitros
μg	Microgramos



## 2. RESUMEN.

Se intentó determinar la catepsina B mediante ELISA en corteza, hipocampo y líquido cefalorraquídeo de ratas macho wistar. Debido a que varios de los anticuerpos presentaron inespecificidad ya que reconocían a varias moléculas simultáneamente a las catepsinas, se intentó otra metodología con este propósito.

Se empleó entonces la técnica de electroforesis en poliacrilamida, y western blot para identificar las catepsinas B, H y L, en corteza, hipocampo, líquido cefalorraquídeo, puente y plexo coroideo. Se logró identificar positivamente a la catepsina H en plexo coroideo únicamente. Se realizó el estudio de la expresión diurna de ésta molécula mediante densitometría a 6 diferentes tiempos en un período de 24 horas. Los valores de las densitometrías muestran que no hubo variación diurna en su expresión en este tejido. Al estudiar la relación catepsina H y cistatina C, mediante los valores obtenidos por densitometría, se encontró que no existe una variación significativa en la relación de catepsina H / cistatina C en las ratas estudiadas.

Los resultados indicaron que no existe variación diurna en la expresión de estas moléculas, y que la relación entre catepsina H y cistatina C es constante en condiciones fisiológicas, lo que podría posteriormente ser útil en otro tipo de estudios al permitir hacer comparaciones de la expresión diurna en condiciones patológicas, como por ejemplo, las que se presentan posteriores a un traumatismo craneoencefálico.

### **3. MARCO TEÓRICO.**

#### **3.1 Generalidades.**

Los eventos traumáticos representan uno de los principales problemas de salud pública. A nivel mundial, ocupan el tercer lugar como causa de muerte y el segundo como causa de discapacidad (Programa Nacional de Salud 2001-2006). La población más afectada por los accidentes la constituyen los niños, adolescentes y jóvenes entre 20 y 35 años. Los accidentes ocurren tanto en el hogar como en la escuela, el trabajo y la vía pública; en esta última por choques automovilísticos, atropellamientos y en eventos violentos como heridas por arma blanca y de fuego. Los accidentes tienen importantes repercusiones en el individuo, en la familia y en la comunidad, tanto por la pérdida de vidas como por la incapacidad temporal, la discapacidad permanente y su alto costo directo e indirecto. Se ha señalado que por cada muerte ocasionada por un traumatismo se originan dos casos de discapacidad. En nuestro país, los traumatismos representan la cuarta causa de muerte en general y la primera dentro de la población económicamente activa (INEGI, 2002). Su adecuada atención representa uno de los objetivos del Programa Nacional de Salud 2001-2006.

En algunas condiciones patológicas que involucran daño neuronal, se ha descrito un incremento en la expresión de algunas catepsinas, así como de la cistatina C (Nagai y cols., 2000). La expresión de estas moléculas no ha sido analizada en estado durante un periodo diurno en estados fisiológicos. Nosotros creemos que las catepsinas son parte de las moléculas que se liberan en un evento patológico, por ejemplo un evento de traumatismo y que incrementan la muerte

neuronal, mientras que la liberación de cistatina C representa una de las respuestas de autoprotección del organismo (Leker & Shohami, 2002).

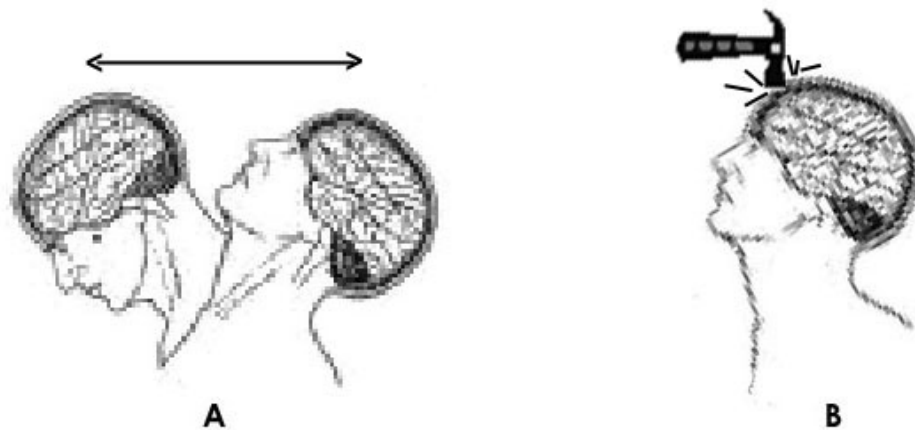
Utilizando a la rata como modelo experimental se ha visto que el organismo está más protegido frente a un TCE en las horas de luz (Navarro y cols., 2003), así pues en este proyecto analizamos la expresión basal de la catepsina H y su relación con la expresión de la cistatina C, a lo largo del día.

### **3.2 Traumatismo craneoencefálico (TCE).**

Se define al Traumatismo Craneoencefálico (TCE), como cualquier lesión física, o deterioro funcional del contenido craneal, debido a un intercambio brusco de energía mecánica (Figura 3.1).

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, la lesión primaria, que corresponde al daño mecánico al parénquima o a la vasculatura, ésta tiene lugar en el momento del impacto y no es reversible. Y la lesión secundaria, que corresponde a los efectos tardíos, que se presentan de horas a días post-trauma. Esta última es un proceso potencialmente reversible, mediante una terapia adecuada (Nestler y cols., 2000).



**Figura 3.1 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.**

La lesión secundaria involucra una serie de cambios funcionales, estructurales y moleculares que pueden dar lugar al daño neuronal. Entre los eventos que ocurren, se ha descrito que se presenta un daño cerebral isquémico. 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 cambios bioquímicos en el área cerebral afectada. Entre estos cambios hay una depleción de la glucosa y del glucógeno, falla de la Na/K ATPasa y de otras bombas, que dan lugar a una disminución en el umbral de excitación, consecuentemente se presentan potenciales de acción, liberación de neurotransmisores excitadores, entrada masiva de calcio, activación de proteasas, lipasas, sintasa de óxido nítrico, endonucleasas, producción de radicales libres y potencialmente necrosis y/o apoptosis (Nestler y cols., 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 que conduce al estado basal, activando mecanismos de neuroprotección. Estos mecanismos parecen compartirse en eventos de daño causado por un TCE, como por un accidente vascular cerebral. Entre estas

respuestas se ha observado la participación de sistemas inhibitorios (Leker & Shohami, 2002).

### **3.3 Vulnerabilidad del sujeto dependiente de la hora del día.**

El ataque isquémico cerebral, de manera similar al ataque al miocardio, tiene un marcado ritmo diurno. Numerosos estudios han mostrado que la hora de inicio de los accidentes vasculares cerebrales, así como de los ataques isquémicos transitorios, ocurren preferentemente entre las 6:00 y las 12:00 horas del día, es decir después de que el sujeto se levanta y empieza a presentar actividad (Marler, 1993). Numerosas variables se han mencionado como responsables de este patrón circádico, entre las que se encuentran cambios posturales, variaciones circádicas de la agregación de plaquetas, trombolisis, presión arterial, ritmo cardíaco y concentraciones circulantes de catecolaminas, cuyos niveles máximos ocurren justo en este periodo. En rata, la isquemia provoca un mayor daño si ésta se induce en las horas de oscuridad en comparación con las horas de luz (Vinall y cols., 2000).

Analizando la severidad de un TCE en relación al fotoperíodo y utilizando para esto a la rata como modelo biológico experimental, se encontró que la recuperación frente a un TCE infligido mediante la técnica de "closed head injury" (Panikashvili y cols., 2001) presenta variaciones diurnas, siendo mejor la recuperación, si el traumatismo ocurre en las horas de luz respecto a las horas de oscuridad (Navarro et. al, 2003). Es decir parece haber una respuesta de autoprotección mayor en las horas de luz.

Por otra parte también se ha analizado el patrón de expresión de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a lo largo de las 24 horas localizándose una banda proteica de aproximadamente 15 kDa, correspondiente a cistatina C, (González-Rivera y cols., 2003), y que incrementa su concentración 24 horas después del TCE.

### 3.4 Catepsinas.

Las catepsinas pertenecen a una de las dos superfamilias que constituyen a las cistein-proteasas o proteasas de cisteína. Las cistein-proteasas, como su nombre lo indica, son enzimas capaces de degradar proteínas, poseen una cisteína en su sitio activo y utilizan al grupo sulfidrilo como nucleófilo. Poseen pH óptimo entre 4 y 6.5 y utilizan al glutatión como cofactor. Se han descrito dos superfamilias, la familia de las cistein-proteasas relacionadas a la enzima convertidora de interleucina 1-beta y la familia de la papaína (Figura 3.2). A esta última familia pertenecen las catepsinas.

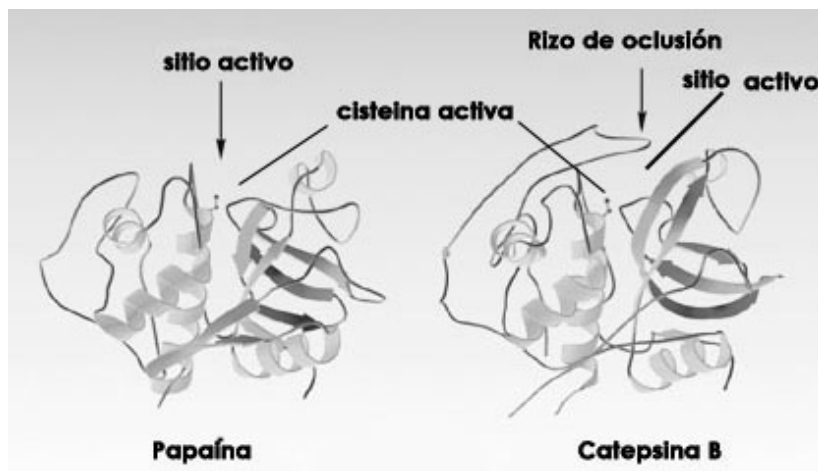


Figura 3.2 Imagen que muestra las similitudes del sitio activo entre las moléculas de papaína y catepsina B. el rizo de oclusión que se localiza en la catepsina B le confiere mayor especificidad a esta (imagen modificada de <http://delphi.phys.uni-tours.fr/prolysis/images/cbpap.jpeg>).

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

El hecho de que la expresión de las cistein-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 procesamiento de hormonas, citocinas, presentación de antígenos, coagulación, entre otros (Chapman y cols., 1997).

### **3.5 Cistatina C.**

La cistatina C humana es una proteína de 120 aminoácidos, codificada en el cromosoma 20 en humanos. Pertenece a una superfamilia de inhibidores de proteasas, conocidos en general como cistatinas, presenta 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 (Figura 3.3). Al ser una proteína básica, no es reabsorbida en el túbulo renal y permite que sus niveles plasmáticos sean utilizados como marcador de filtración glomerular (Laterza y cols., 2002).

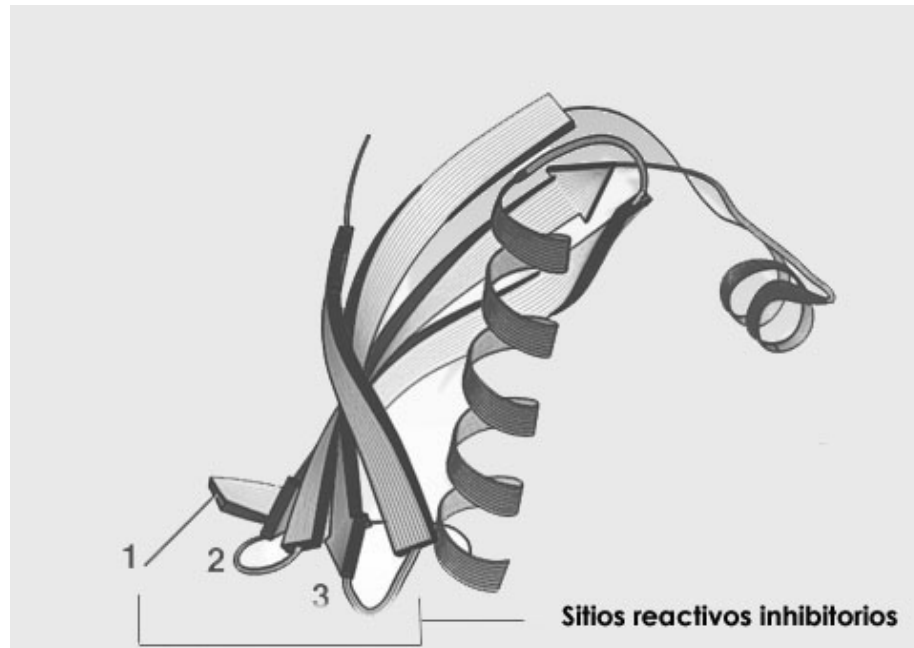


Figura 3.3. Imagen de la molécula de cistatina C donde se muestran los sitios reactivos. (Imagen modificada de <http://delphi.phys.uni-tours.fr/prolysis/images/cystatin.jpeg>).

La cistatina C es inhibidora de las catepsinas B, H, K, L y S. Está ampliamente distribuida en fluidos biológicos. Sus niveles se encuentran más elevados en el líquido seminal y en líquido cefalorraquídeo (LCR). También se encuentra en menores concentraciones en lágrimas, en líquido amniótico, en saliva, en leche y en plasma.

Por su amplia distribución y potencia inhibidora se sugiere que es la principal inhibidora de las cistein-proteasas (Grzonka y cols., 2001).

### 3.6 Daño neuronal, catepsinas y cistatina C.

Hay datos contradictorios respecto a la presencia de la cistatina C como marcador de daño cerebral. Por ejemplo, se ha observado un incremento en la inmunoreactividad a cistatina C en corteza cerebral en humanos con Alzheimer, *post mortem* (Deng y cols., 2001), así como en hipocampo de rata en modelos experimentales de isquemia (Palm y



cols., 1995). En procesos inflamatorios en disfunciones neurológicas, por ejemplo en esclerosis múltiple y metástasis leptomenigeal, los niveles de cistatina C en LCR están disminuídos, mientras que los niveles de catepsinas B y H se encuentran incrementados (Nagai y cols., 2000; 2003).

Así pues parece que el marcador de daño neuronal podría ser la pérdida del balance entre las concentraciones de algunas catepsinas y su inhibidor.

También se ha descrito que la catepsina L, pasa de la fracción lisosomal a la citosólica como respuesta a la reperfusión sanguínea posterior a un episodio isquémico (Islekel y cols., 1999). No hay datos respecto al papel de las otras catepsinas (B y H) 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). 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. En un evento isquémico, posterior a la entrada masiva de calcio, se activan proteasas, en particular calpaína, una cistein-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 (Yamashima, 2000). De hecho, se han utilizado algunos inhibidores de cistein y serin-proteasas como leupeptina o selectivos de calpaína (Markgraf y cols., 1998) para prevenir el daño causado por un episodio isquémico (Lee y cols., 1991) con resultados prometedores. Vale la pena señalar que prácticamente no hay datos en la literatura respecto a la variación diurna de las catepsinas B, H y L y la relación

que guardan con la cistatina C en un estado fisiológico. Solo hay un reporte en autopsias de humanos que han fallecido debido a TCE, en el que se describe la presencia de un incremento en la expresión de catepsina D (Sherriff y cols., 1994).

### **3.7 Plexos coroideos.**

Los plexos coroideos son tejidos localizados en el cerebro. Se subdividen en tres regiones cada una de las cuales se constituye por pequeños vasos sanguíneos que existen dentro de los ventrículos cerebrales. Elaboran en su mayor parte el líquido cefalorraquídeo.

- Plexo coroideo del cuarto ventrículo: plexo bastante grande que se encuentra en la porción más baja del techo del ventrículo.
- Plexo coroideo del tercer ventrículo: un par de plexos que se extienden hacia abajo a cada uno de los lados del techo del tercer ventrículo (Figura 3.4).
- Plexo coroideo del ventrículo lateral: plexos de los ventrículos laterales que se extienden desde el foramen interventricular hasta el cuerno inferior (Figura 3.4).

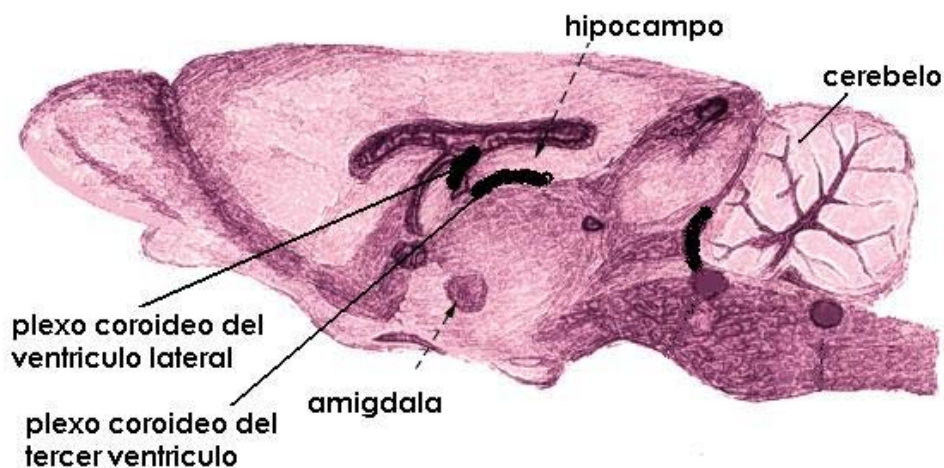


Figura 3.4. Imagen del cerebro de rata donde se muestran los plexos coroideos del ventrículo lateral y del tercer ventrículo.

### 3.8 Ritmo Diurno.

Generalmente los hábitos de actividad-reposo se coordinan con respecto al día solar (24 horas), estos ritmos se denominan circádicos debido a que su periodicidad se acerca a las 24 horas del día oscilando entre las 22 y las 26 horas. Un ritmo circadiano es aquel que persiste en el organismo al aislar a este de señales cíclicas, esto quiere decir bajo condiciones ambientales constantes ya sea de luz u oscuridad durante 24 horas (Rusak, 1980). Si solo se analizan manifestaciones fisiológicas o expresiones moleculares en condiciones ambientales constantes (12 horas de luz por 12 horas de oscuridad) se tiene que hablar entonces de ritmos diurnos.

### 3.9 Variaciones diurnas de catepsinas y de cistatina C.

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 ha descrito la expresión circádica de catepsina H, B y L en suero humano

(Cimerman y cols., 2000; 2002), sin embargo no se han realizado estudios en la variación de la expresión diurna. Como se señaló anteriormente, existen datos que describen el comportamiento diurno de las concentraciones de cistatina C en LCR de rata (González- Rivera, 2003).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

No existen reportes en la literatura respecto al nivel basal de las catepsinas y tampoco se ha analizado una relación entre las concentraciones de catepsinas con respecto a su inhibidor endógeno, la cistatina C, solamente existe un reporte de un estudio realizado en autopsias de humanos que han muerto como consecuencia de un TCE, en el que se describe un incremento en la expresión de catepsina D (Sherriff y cols., 1994).

Un estudio consistente de la variación diurna en la expresión de estas moléculas en condiciones fisiológicas aportaría datos relevantes que permitirán tener un parámetro de las mismas. Teniendo un punto de comparación del nivel de dichas moléculas, en condiciones fisiológicas, se pueden contrastar los niveles de las mismas moléculas en condiciones patológicas múltiples como por ejemplo el traumatismo craneoencefálico.

Nos propusimos estudiar la expresión diurna de las catepsinas B, H, L. Además de la relación que existe entre estas catepsinas y la cistatina C, todo ello en tejidos cerebrales de rata en condiciones fisiológicas.

El conocimiento generado a partir de este estudio nos permitirá determinar si existen cambios en la expresión de estas moléculas y en la relación de las mismas, dependiendo de la hora del día, de manera fisiológica. Lo que posteriormente se podrá contrastar con ensayos dependientes de algún daño cerebral inducido, para analizar los cambios en la expresión de las moléculas derivados de esta fisiopatología.

## 5. OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Estudiar la expresión diurna de las catepsinas B, H y L, y la relación existente con la expresión diurna de la cistatina C en tejidos cerebrales en la rata.

Objetivos particulares.

- Determinar la expresión diurna en las concentraciones de las catepsinas B, H y L, mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA y western blot).
- Determinar la relación que existe entre las catepsinas B, H y L, y su inhibidor endógeno la cistatina C, durante la expresión diurna de dichas moléculas.

## 6. HIPÓTESIS.

La hipótesis nula ( $H_0$ ) es que no existe variación diurna en la expresión de las catepsinas B, H y L en tejidos cerebrales de la rata, en condiciones fisiológicas, y que el cociente derivado de la cuantificación en la expresión de catepsinas y de cistatina C no presenta una variación diurna.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1 Materiales.**

#### **7.1.1 Extracción de LCR.**

- Agujas para insulina.
- Pentobarbital sódico de uso veterinario (anestesal Pfizer).
- Cloruro de Benzalconio.

#### **7.1.2 Homogenizado de tejidos.**

- Ultracentrifuga (Sorvall super T21).
- Amortiguador A, para 200 mL (21.88 g sacarosa, 2 mL Tris-base 1 M pH 6.8, 0.8 mL EDTA 0.5 M, 0.0952 g  $MgCl_2$ , aforo con agua destilada a 200 mL).
- Mezcla de inhibición para 10 mL de amortiguador A (Aprotinina 1  $\mu$ L, DTT 10  $\mu$ L y PMSF 120  $\mu$ L).

#### **7.1.3 Cuantificación de proteína por el método de Lowry.**

- $Na_2CO_3$  anhidro.
- $KNaC_4H_4O_6 - 4 H_2O$ .
- $CuSO_4 - 5 H_2O$ .
- Espectrofotómetro (turner 690).
- Microcentrifuga (eppendorf 5415).

#### 7.1.4 Inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA).

- Placas Nunc maxisorp certificadas (439454), para inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA).

- Anticuerpos.

- Anti -catepsina B de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G policlonal hecho en cabra. Santa Cruz (sc-6493).

- Anti-catepsina B de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G policlonal hecho en conejo. Santa Cruz (sc-13985).

- Anti-catepsina H de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G hecho en cabra. Santa Cruz (sc-6496).

- Anti-catepsina L de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G hecho en conejo. Santa Cruz (sc-10778).

- Amortiguadores.

- PBS (Amortiguador de fosfato-salina 10 mM, pH 7.4)

- PBS-Tween (Amortiguador de fosfato-salina y detergente 10 mM, pH 7.4, 0.01% Tween 20 (sigma P-2287).

- Amortiguador para el sustrato (10 mM de Tris-HCl pH 9.5, 1 M de dietanolamina, 10 mM de 4-nitro-fenilfosfato, 0.25 mM de MgCl<sub>2</sub>).

- Amortiguador de carbonatos (pH 9.5).

- Albúmina sérica bovina (BSA sigma A-7030), al 1% en amortiguador de carbonatos.

- Leche descremada de bovino (sigma) al 1% en amortiguador de carbonatos.

- NaOH (2 M).

- Sustrato para fosfatasa alcalina, 4-nitro-fenilfosfato 10 mM (Sigma Chemical).



- Lector de microplacas Biotek EL311 con filtro de 405 nm.

### 7.1.5 Western blot.

- Gel electroforético de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 12%.
  - Acrilamida 30% (Gibco-BRL).
  - Tris 1.5 M. pH 8.8 (Gibco-BRL).
  - Tris 0.5 M. pH 6.8 (Gibco-BRL).
  - H<sub>2</sub>O.
  - SDS 10%(Gibco-BRL).
  - Persulfato de amonio 10%(Gibco-BRL).
  - TEMED (Gibco-BRL).
- Amortiguador de cargado para proteínas (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS).
  - β- mercaptoetanol (10 μL por cada mL de amortiguador de cargado de proteínas).
    - Estándares de proteínas preteñidas (Gibco-BRL).
    - Anticuerpos.
      - Anti-catepsina B de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G policlonal hecho en cabra (sc-6493).
      - Anti-catepsina B de origen humano que identifica catepsina B humana, de raton y de rata, Ig-G policlonal hecho en conejo (sc-13985).
      - Anti-catepsina H de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G hecho en cabra (sc-6496).
      - Anti-catepsina L de origen humano que identifica catepsina B humana, de ratón y de rata, Ig-G hecho en conejo (sc-10778).
      - anti-conejo Ig-G hecho en ratón marcado con fosfatasa alcalina (sc-2358).
      - Anti-cabra Ig-G hecho en ratón marcado con fosfatasa alcalina (sc-2355).

- Anti Ig-G peroxidado hecho en cabra.
- Amortiguadores.
- PBS (Amortiguador de fosfato-salina 10 mM, pH 7.4).
- PBS-Tween (Amortiguador de fosfato-salina, pH 7.4, 0.01%-Tween 20).
- Suero normal de conejo (Vector S1000).
- Suero normal de cabra (Vector S5000).
- Kit vector para inmunoensayo (6101 conejo).
- Kit vector para inmunoensayo (6105 cabra).
- Papel de nitrocelulosa para electro-transferencia (Hybond-C 0.45 $\mu$  Amersham Life Science).
- Leche descremada (Nestlé svelt).
- Tabletas NBT/BCIP (Roche).
- DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7.5 mg DAB, 15 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 mL PBS).

#### **7.1.6 Software.**

- Software. SigmaStat V. 3.1, (Jandel Scientific).
- Software SigmaPlot V. 9.0 (Jandel Scientific).
- Software Quantity One para análisis de bandas (Bio-RAD Laboratorios, Hércules CA, USA).

#### **7.1.7 Animales.**

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho wistar con un peso entre 250 g y 300 g al momento de ser sacrificadas. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz oscuridad 12/12 (luz encendida a las 8:00 am), con agua y alimento *ad libitum*.

## **7.2 Metodología.**

### **7.2.1 Traumatismo craneoencefálico (TCE).**

Se anestesiaron los animales con anestésico vía intraperitoneal (100µL/100mg de peso). Posteriormente se utilizó el modelo conocido como "closed head injury" que consiste en dejar caer una pesa sobre el cráneo del animal a una distancia fija 20 cm., obteniendo un daño moderado en los sujetos experimentales.

Los animales se anestesian y posteriormente se marca la zona del impacto, que se localiza en la parte media del cráneo, 5 mm delante de la línea media de las orejas. Con este sistema el impacto es sobre la corteza motora derecha.

### **7.2.2 Extracción de tejidos cerebrales.**

Se anestesiaron los animales con anestésico vía intraperitoneal (100µL/100mg de peso) y se les extrajo LCR introduciendo una aguja para insulina en la cisterna magna del roedor localizada en la parte baja de la nuca, esta extracción se realizó por capilaridad. Posterior a la toma de LCR los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina.

De cada una de las ratas se extrajo el cerebro y se disectaron corteza, hipocampo, puente y plexo coroideo. Estos fueron homogenizados por separado con 500 µL de amortiguador de inhibición (pH 5.5). Posteriormente los homogenados se centrifugaron a 600G durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, se separaron sobrenadante y precipitado de cada muestra, obteniendo dos muestras independientes por tejido, de cada muestra independiente se tomaron

2  $\mu$ L para realizar la cuantificación de proteína total (Lowry y cols, 1951). Cabe mencionar que los resultados están basados en tejidos de animales en condiciones fisiológicas normales.

### **7.2.3 Inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA).**

Se realizó inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA; Clark, 1987). Para esto se tomó una muestra de 100  $\mu$ l de líquido cefalorraquídeo. Se diluyó 1:100 en PBS (10 mM y pH 7) y se incubaron 100  $\mu$ l de la dilución en placas Maxisorp (Nunc), durante 2 horas a temperatura ambiente. Previamente las placas fueron cubiertas con 100  $\mu$ l (1  $\mu$ g ) de los siguientes anticuerpos de captura: anti-catepsina B (IgG de cabra) y anti -catepsina B (IgG de conejo) según correspondiera. El anticuerpo de captura fue diluido a la concentración correspondiente para cada ensayo en amortiguador de carbonatos pH 9.5. Se dejaron incubando a 4°C toda la noche, posteriormente se lavaron con PBS-Tween-20 (0.1%) para después bloquear con 150  $\mu$ l de BSA al 1% ó 150  $\mu$ L de leche descremada de bovino (sigma) al 1% según correspondiera, en amortiguador de carbonatos pH 9.5 a temperatura ambiente durante 4 horas. Se lavó con PBS-Tween 20 (0.1%) y se agregaron los anticuerpos de detección; anti-catepsina B (Ig-G de conejo) ó anti-catepsina B (Ig-G de cabra) según fuese el caso. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizó un lavado con PBS-Tween-20. Se agregó en cualquiera de los casos un tercer anticuerpo ratón anti-Ig-G de conejo marcado con fosfatasa alcalina (sc-2358) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en ausencia de luz. Finalmente se lavó con PBS-Tween 20 y se agregó el sustrato (1 M de dietanolamina, 10 mM de 4-nitro-fenilfosfato, 0.25 mM de  $MgCl_2$ ) diluido en amortiguador 10 mM de Tris-HCl, pH 9.5. Se dejó reaccionar por 30 minutos, para finalmente detener la reacción con 50  $\mu$ l de NaOH 2M y se leyeron las absorbancias en un lector de

microplacas Biotek EL311 a 405 nm. Con las absorbancias se graficaron los resultados con el software SigmaPlot V. 9.0 y se realizaron las comparaciones estadísticas con el software Sigma stat V. 3.1.

#### **7.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE).**

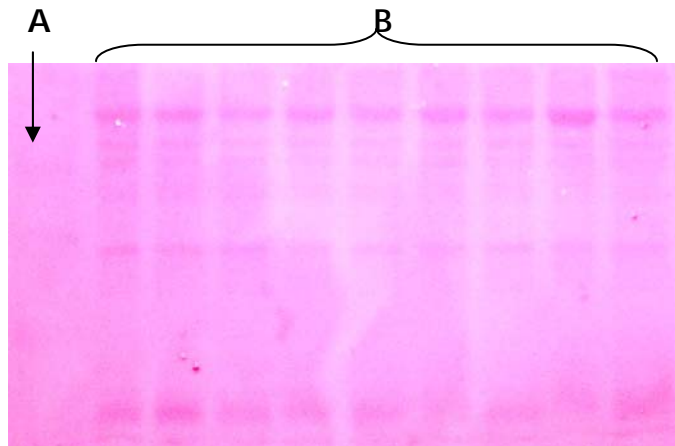
Se prepararon geles de poliacrilamida adicionados con SDS a un porcentaje del 12 % (Laemmli, 1970) y con un grosor de 0.75 mm. Se realizó una mezcla con 15 ó 50  $\mu$ L de proteína de muestra independiente por tejido, según fuese el caso, con amortiguador de proteínas 2x a una disolución 1:1. Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se centrifugaron a 600 RCF durante 5 minutos. Para reconocer los pesos moleculares de las proteínas se utilizaron estándares de pesos moleculares preteñidos (GIBCO BRL) los cuales se procesaron de la misma manera que las muestras.

Las muestras se cargaron en el SDS – PAGE (muestra individual por carril). La electroforesis se corrió durante 2 horas 30 minutos a un voltaje de 150 volts y 250 miliamperes.

#### **7.2.5 Western blot.**

Las proteínas separadas en el gel de electroforesis junto a los patrones de pesos moleculares preteñidos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta transferencia se llevó acabo en una cámara de transferencia húmeda durante 1 hora a 100 volts y 250 miliampers.

Las membranas de nitrocelulosa fueron reveladas con rojo de Ponceau S, esto se realizó para determinar que la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa fuese exitosa, además de lograr la determinación de los carriles de transferencia (Fig. 7.1).



**Figura 7.1** Se muestra el revelado de la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau S. A) carril en donde se encuentran los estándares de pesos moleculares preteñidos. B) carriles en donde se localizan las proteínas.

Posteriormente se bloquearon los sitios libres en la membrana con PBS-Tween enriquecido con 10% leche Nestlé sveltí y 4% de suero normal de cabras si el primer anticuerpo estaba hecho en conejo ó suero normal de conejo si el primer anticuerpo estaba hecho en cabra. Esto se incubó en agitación constante y a temperatura ambiente durante 1 hora. Pasado el tiempo se adicionó el 1er anticuerpo (anticuerpos anticatapsina, ya descritos) y se incubó a 4 °C durante 12 horas.

A las membranas se les realizaron tres lavados con PBS-Tween y uno con PBS. A los anticuerpos que reconocieron y se acoplaron a las proteínas en la membrana se les adicionó un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina o al complejo avidina-biotina (complejo AB), según fuese el caso y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente se desarrolló la precipitación colorida para identificar las bandas utilizando los siguientes sustratos: p-nitrofenilfosfato y NBT/BCIP (Roche) en el caso de fosfatasa alcalina, y DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el caso del complejo AB. El tiempo óptimo de reacción para obtener la precipitación colorida fue de 3 minutos, posterior a este tiempo se lavó

la membrana con agua. Se dejó secar la membrana para obtener los western blot con las bandas reveladas.

Los blots obtenidos se escanearon y se realizó la cuantificación de las bandas por medio del programa Quantity One. Finalmente se realizaron las gráficas y el análisis estadístico por medio de los programas SigmaPlot V 9.0 y SigmaStat V 3.1.

## 8. RESULTADOS.

Se realizó la titulación de los anticuerpos primario y secundario para detectar catepsina B, con muestra de LCR (100  $\mu$ L) mediante ensayo de ELISA indirecto tipo sandwich. En la gráfica obtenida para determinar las concentraciones idóneas de anticuerpos no se observó una tendencia que permitiera determinar dichas concentraciones (Figura 8.1).

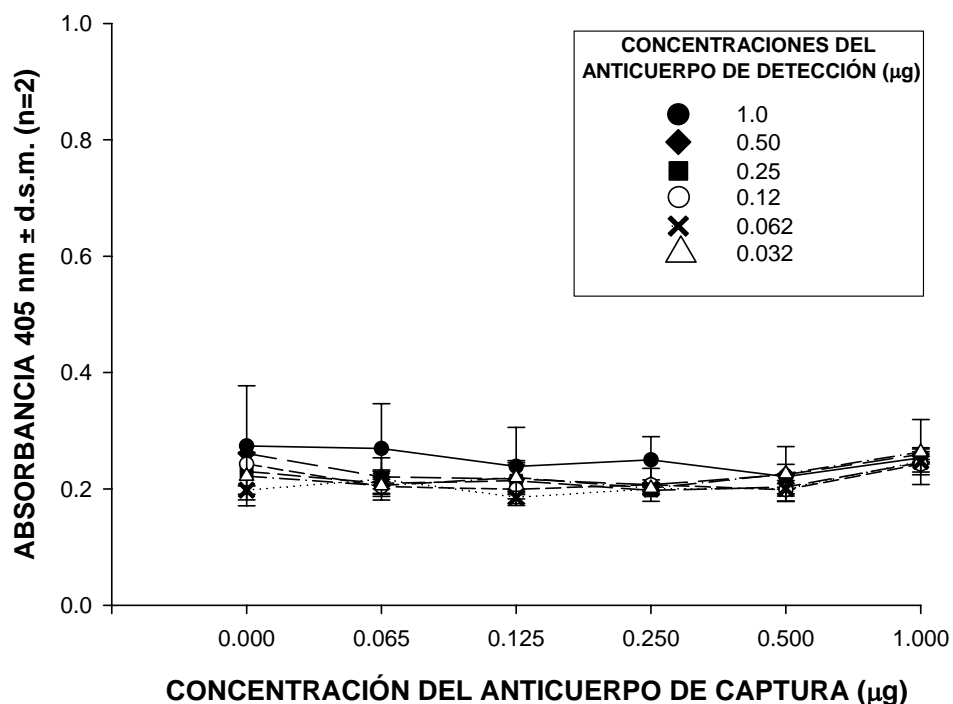


Figura 8.1 Titulación de anticuerpos (anticatepsina B hecho en cabra y anticatepsina B hecho en conejo) con muestra de LCR de rata y BSA como bloqueador mediante ELISA indirecto tipo sándwich.

Lo anterior sugirió dos posibles alternativas:

a) Que solo estuviéramos observando el fondo debido a la escasez de catepsina B en LCR.

B) Una interacción del bloqueador con los anticuerpos que pudiera enmascarar la detección de catepsina B.

Debido a estas posibilidades se decidió determinar la eficiencia del bloqueador (BSA) para este modelo de detección, además de la



correcta elección de tejidos cerebrales para la determinación de catepsinas.

Por lo tanto, se realizó la determinación de catepsina B con el mismo bloqueador BSA, utilizando como muestra sobrenadante de un macerado de corteza y sobrenadante de un macerado de hipocampo, ambos tejidos de rata y manejados por separado. Esta determinación mostró que la BSA interactúa directamente con los anticuerpos provocando aumento en las lecturas de absorbancia en el ensayo de ELISA tipo sandwich (Figura 8.2).

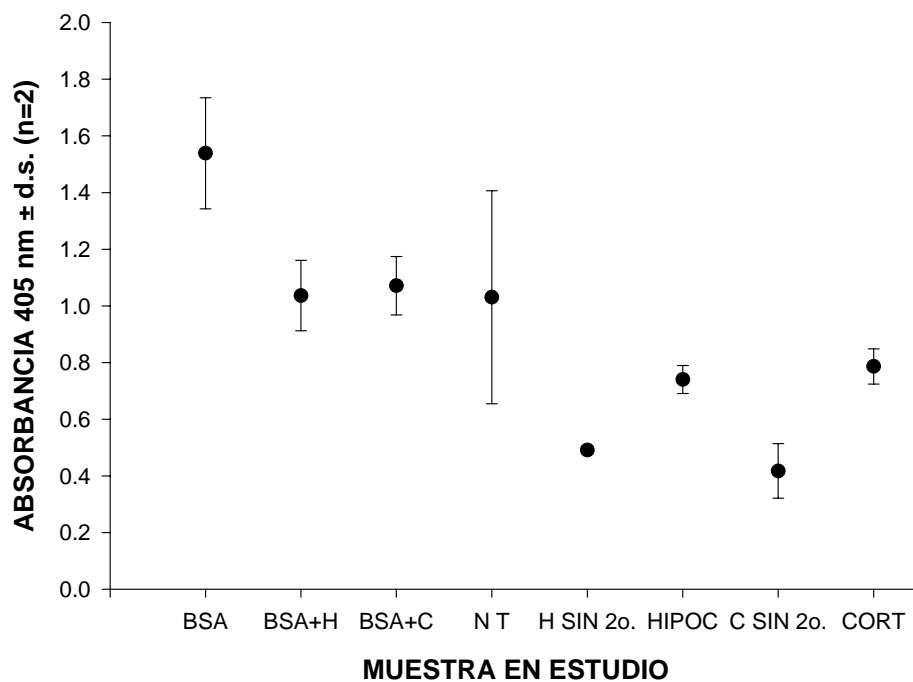
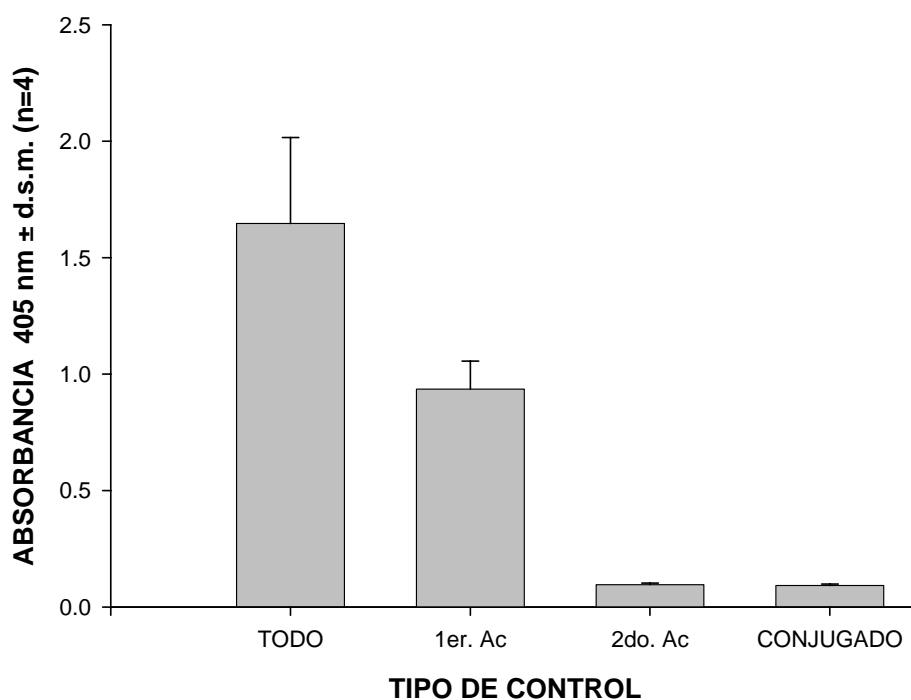


Figura 8.2 Cuantificación de catepsina B en tejidos cerebrales de rata (corteza e hipocampo) sacrificadas 24 hrs post-TCE, mediante ELISA indirecto tipo sandwich. (BSA) bloqueante + 2º anticuerpo; (BSA + H) bloqueante + muestra de hipocampo + 2º anticuerpo; (BSA + C) bloqueante + muestra de Corteza + 2º anticuerpo; (NT) 1er anticuerpo + bloqueante + 2º anticuerpo; (H SIN 2º.) 1er anticuerpo + bloqueante + muestra de hipocampo; (HIPOC) 1er anticuerpo + bloqueante + muestra de hipocampo + 2º anticuerpo; (C SIN 2º) 1er anticuerpo + bloqueante + muestra de corteza; (CORT) 1er anticuerpo + bloqueante + muestra de corteza + 2º anticuerpo.

Posterior a esto se decidió realizar un ensayo donde solo se evaluó la leche descremada de bovino como bloqueador y el anticuerpo de captura anti-catepsina B (Ig-G de cabra) (Figura 8.3).



**Figura 8.3** Determinación de la interacción del 1er anticuerpo anti-catepsina B con el bloqueante leche descremada de bovino (Sigma) y detectado con el 2° anticuerpo conjugado con biotina. (TODO) bloqueador + 1er anticuerpo + 2do anticuerpo; (1er Ac) bloqueador + 2do anticuerpo; (2° Ac) bloqueador + 1er anticuerpo; (CONJUGADO) solo el bloqueante mas el complejo avidina - fosfatasa alcalina.

Obteniendo resultados favorables con la leche descremada como bloqueante, se procedió a ensayar este sistema de bloqueo con muestras de sobrenadante de macerado de corteza e hipocampo y con muestras de LCR de rata con y sin TCE para corroborar la eficiencia del sistema. Sin embargo la señal que se obtuvo en ambos casos es inespecífica (Figuras 8.4 y 8.5).

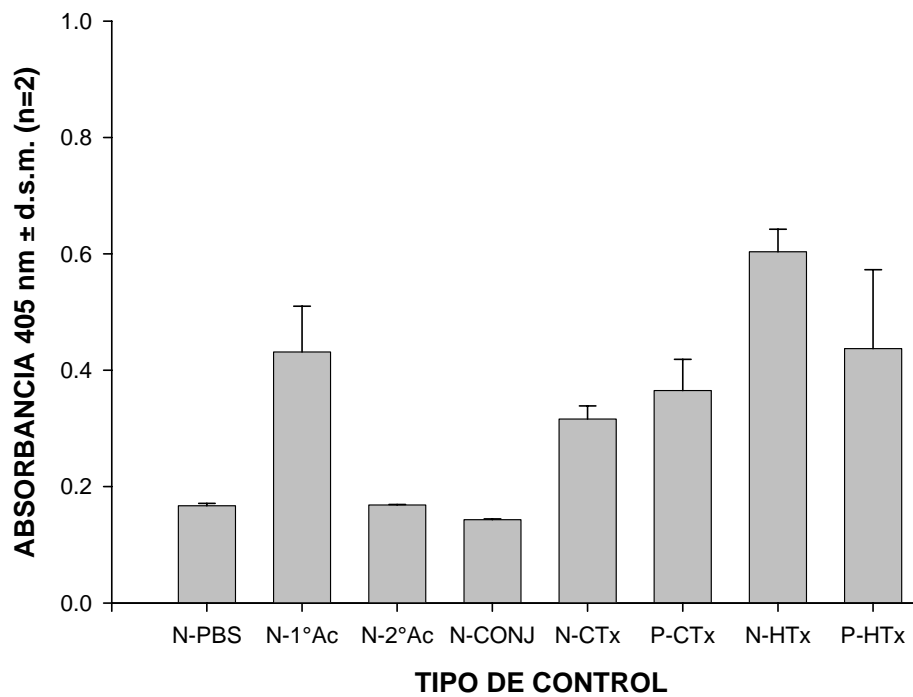


Figura 8.4 Determinación de catepsina B en diversos tejidos cerebrales mediante ELISA indirecto tipo sándwich. (N-PBS) 1er anticuerpo + bloqueador + PBS + 2° anticuerpo; (N-1°Ac) bloqueador + muestra de corteza + 2° anticuerpo; (N-2°Ac) bloqueador + 2° anticuerpo; (N-CONJ) bloqueador; (N-CTx) 1er anticuerpo + bloqueador + muestra de corteza; (P-CTx) 1er anticuerpo + bloqueante + 2° anticuerpo; (N-HTx) 1er anticuerpo + bloqueador + muestra de hipocampo; (P-HTx) 1er anticuerpo + bloqueador + muestra de hipocampo + 2° anticuerpo.

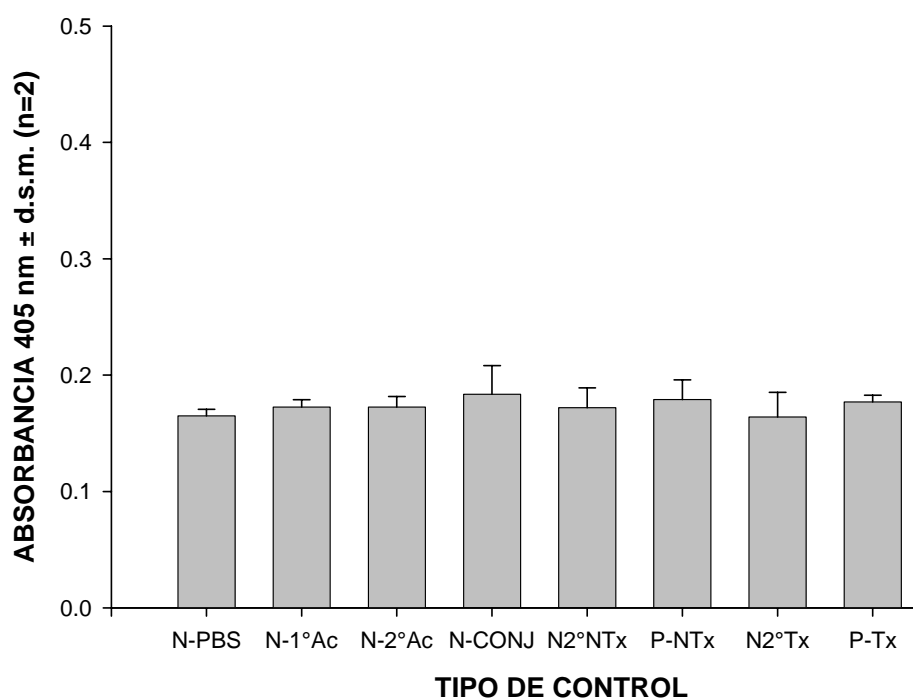
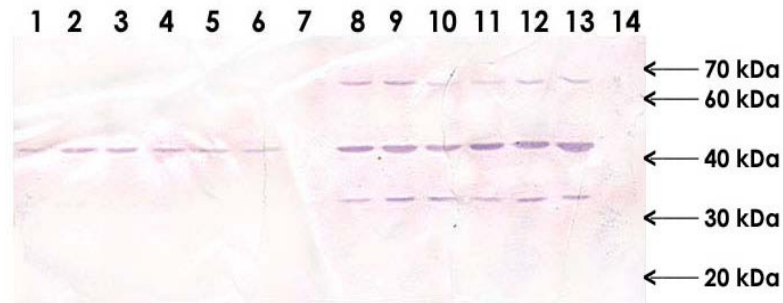


Figura 8.5 Determinación de catepsina B en LCR de rata traumatizada y no traumatizada utilizando leche descremada de bovino (Sigma) como bloqueador; (N-PBS) 1er anticuerpo + bloqueante + PBS + 2° anticuerpo; (N-1°Ac) bloqueador + LCR de rata con TCE + 2do anticuerpo; (N-2°Ac) bloqueador + 2do anticuerpo; (N-CONJ) bloqueante; (N-2°NTx) 1er anticuerpo + bloqueador + LCR de rata sin TCE. P-NTx) 1er anticuerpo + bloqueador + LCR de rata sin TCE + 2° anticuerpo; (N2°Tx) 1er anticuerpo + bloqueador + LCR de rata con TCE; (P-Tx) 1er anticuerpo + bloqueador + LCR de rata con TCE + 2° anticuerpo.

Después de la señal inespecífica que se detectó en los ensayos de ELISA, se decidió utilizar la técnica de Western blot para corroborar la especificidad de los anticuerpos y posteriormente realizar la detección y cuantificación de las proteínas en estudio.

En primera instancia se determinó que la catepsina B no era detectable en las muestras de tejidos cerebrales manejadas, además de la inespecificidad del anticuerpo. La inespecificidad de este anticuerpo quedó demostrada al obtener diversas bandas, de las

cuales ninguna coincidió con el peso específico para catepsina B que es de 28 kDa (Figura 8.6).



**Figura 8.6** Western blot donde se muestra la ausencia de catepsina B en diversos tejidos del cerebro de rata. En cada carril se colocaron 15  $\mu$ g de proteína total de cada de tejido según correspondía. (1-6) Precipitado; (8-12) sobrenadante; (1) corteza de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (2) Hipocampo de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (3) Corteza de rata sacrificada 5 minutos Post-TCE; (4) Hipocampo de rata sacrificada 5 minutos post-TCE; (5) Corteza de rata sin TCE; (6) Hipocampo de rata sin TCE; (7) LCR de rata sacrificada 24 hr post-TCE; (8) Corteza de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (9) Hipocampo de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (10) Corteza de rata sacrificada 5 minutos Post-TCE; (11) Hipocampo de rata sacrificada 5 minutos post-TCE; (12) Corteza de rata sin TCE; (13) Hipocampo de rata sin TCE; (14) LCR de rata sin TCE.

Estudiando la catepsina H en condiciones similares en corteza e hipocampo, se observa una señal mínima aunque no cuantificable por la baja intensidad de la banda en el blot (Figura 8.7).

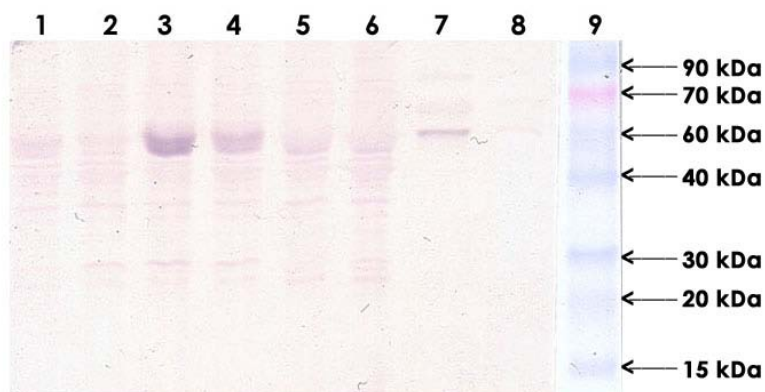


Figura 8.7 Western blot que muestra una ligera expresión de catepsina H en corteza e hipocampo. Se colocaron 50  $\mu$ g de proteína total para cada muestra. (1) Corteza de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (2) Hipocampo de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (3) Corteza de rata sacrificada 5 minutos Post-TCE; (4) Hipocampo de rata sacrificada 5 minutos post-TCE; (5) Corteza de rata sin TCE; (6) Hipocampo de rata sin TCE; (7) LCR de rata sacrificada 24 hrs. Post-TCE; (8) LCR de rata sin TCE; (9) PM.

Se decidió entonces incluir al plexo coroideo en los ensayos posteriores, debido a que el LCR es producido en casi su totalidad por este tejido. Por lo tanto se evaluaron 2 catepsinas en el siguiente ensayo las cuales fueron: catepsina B (Figura 8.8) y catepsina H (Figura 8.9), utilizando los siguientes tejidos: Plexo coroideo, hipocampo, corteza y LCR, de los cuales solo se identificó una señal cuantificable de catepsina H en la muestra de plexo coroideo.

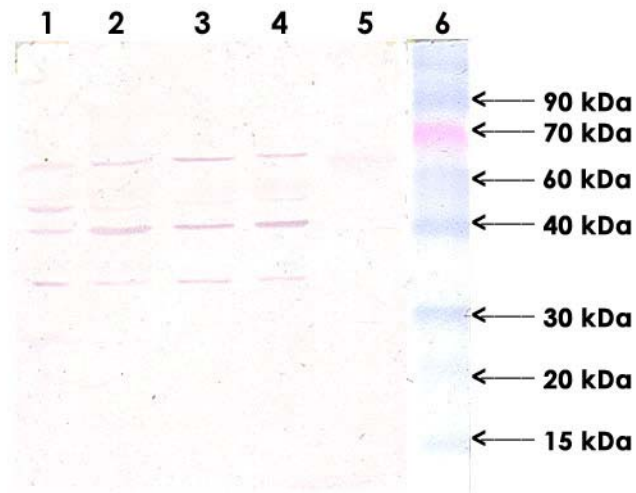


Figura 8.8 Western blot que muestra una expresión nula de catepsina B en diversos tejidos cerebrales de ratas sin TCE. 50  $\mu$ g de proteína total por carril. (1) Plexo Coroideo; (2) Hipocampo; (3) Puente; (4) Corteza; (5) LCR; (6) PM.

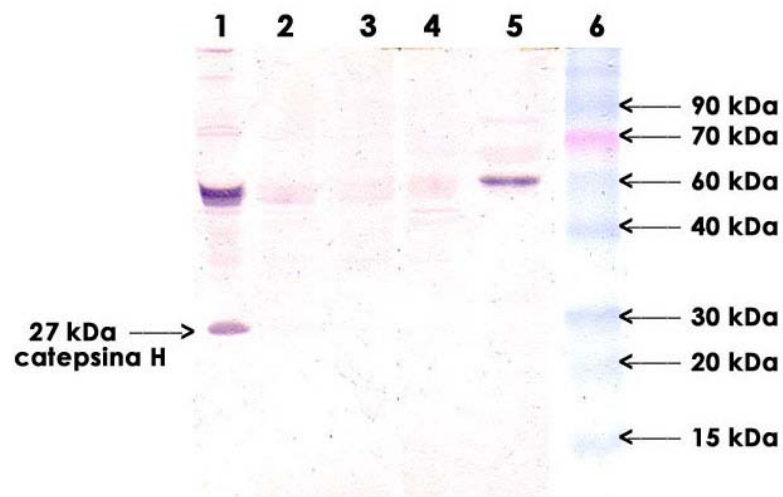


Figura 8.9 Western blot que muestra la presencia de catepsina H en plexo coroideo de rata sin TCE. 50  $\mu$ g de proteína total por carril. (1) Plexo coroideo; (2) Hipocampo; (3) Puente; (4) Corteza; (5) LCR; (6) PM.

Tomando en cuenta el plexo coroideo como tejido adecuado para la identificación de catepsinas, se realizaron las determinaciones de catepsina H, B y L en extracto de plexo coroideo de ratas sin TCE (Figura 8.10) y con TCE (Figura 8.11). Con estos ensayos se demostró

claramente que la catepsina H es la única que se puede identificar y cuantificar en estas condiciones.

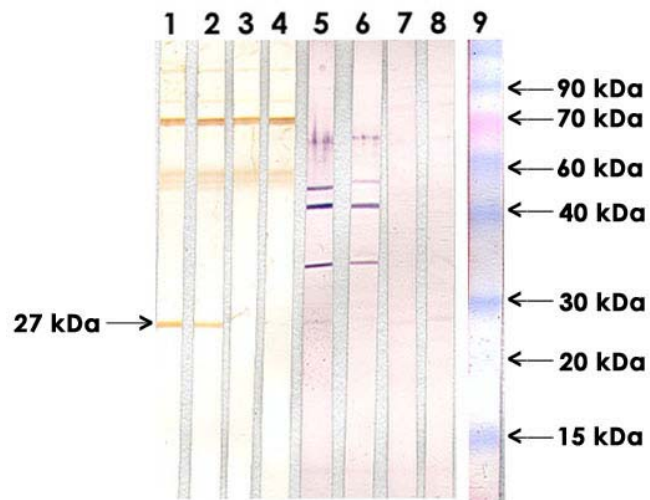


Figura 8.10 Western blot donde se contrasta la detección de catepsina H y la expresión nula de catepsinas B y L en plexo coroideo de rata sin TCE. Ensayo realizado a dos concentraciones distintas de anticuerpo de detección. (1 y 2) catepsina H; (3, 4, 5 y 6) catepsina B; (7 y 8) catepsina L; (9) PM; (1, 3, 5 y 7) dilución del anticuerpo de detección 1: 500; (2, 4, 6 y 8) dilución del anticuerpo de detección 1: 1000.



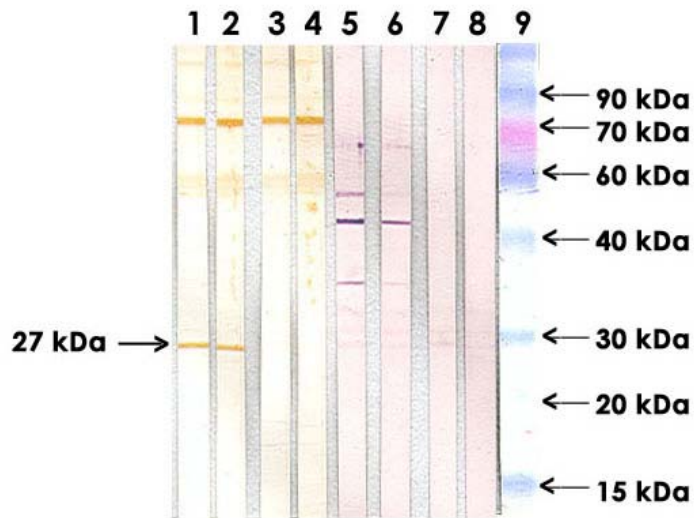


Figura 8.11 Western blot donde se contrasta la detección de catepsinas H, y la expresión nula de catepsinas B y L en plexo coroideo de rata sacrificada 5 minutos post-TCE. Ensayo realizado a dos concentraciones distintas de anticuerpo de detección. (1 y 2) catepsina H; (3, 4, 5 y 6) catepsina B; (7 y 8) catepsina L; (9) PM; (1, 3, 5 y 7) Concentración del anticuerpo de detección 1: 500; (2, 4, 6 y 8) Concentración del anticuerpo de detección 1: 1000.

Retomando la finalidad inicial del estudio, la cual era determinar la expresión diurna de las catepsinas y suponiendo que la expresión de estas aumentaba a ciertas horas del día en los tejidos estudiados, se determinó la expresión durante el periodo de 24 horas a intervalos de 4 horas, teniendo así seis muestras, en estas se determinó catepsina H (Figura 8.12), los tejidos que se estudiaron fueron plexo coroideo y corteza para determinar si en realidad durante todo el periodo de 24 horas la detección de catepsina H era nula en corteza y solo se detectaba en plexo coroideo.

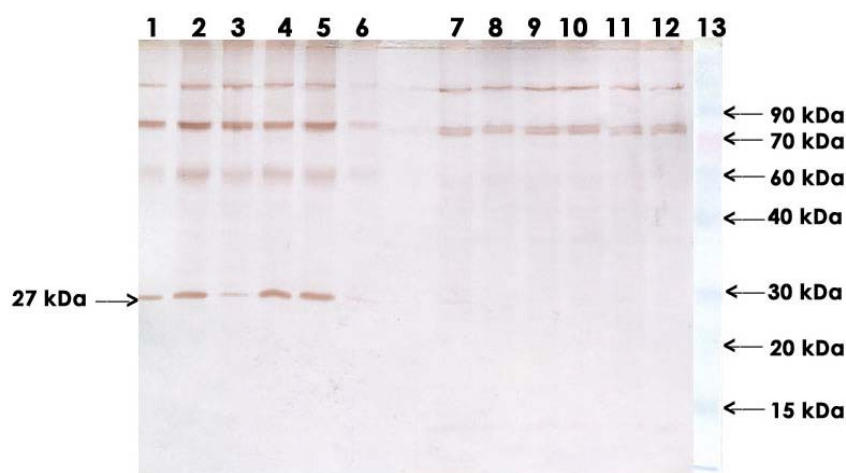


Figura 8.12 Western blot donde se contrasta la expresión de catepsina H en dos tejidos cerebrales de rata sin TCE. 50  $\mu$ g de proteína total por carril. (1, 2, 3, 4, 5 y 6) Plexo coroideo; (7, 8, 9, 10, 11 y 12) Corteza. A diversas horas del día. (1 y 7) 9:00; (2 y 8) 13:00; (3 y 9) 17:00; (4 y 10) 21:00; (5 y 11) 01:00; (6 y 12) 5:00; (13) PM.

Finalmente se determinó la expresión diurna de la catepsina H en el plexo coroideo de la rata (Figura 8.13)

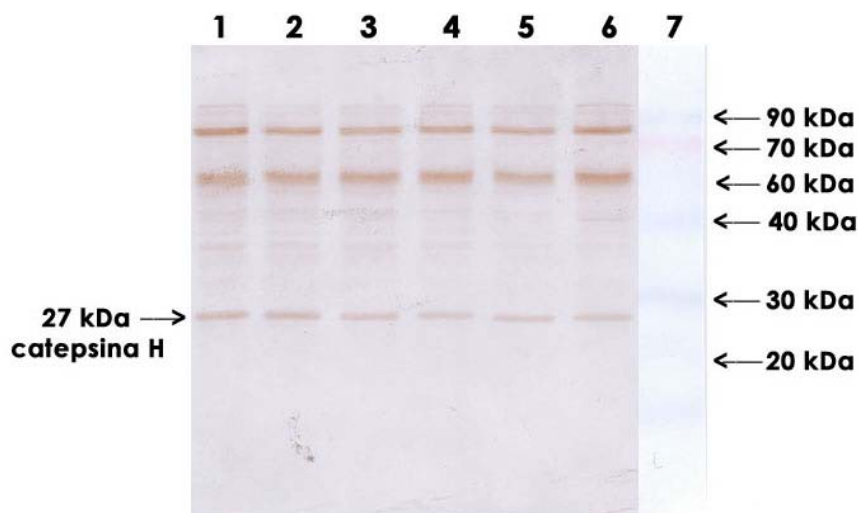


Figura 8.13 Western blot que muestra la expresión diurna de la catepsina H en el plexo coroideo de rata. 50  $\mu$ g de proteína total por carril. (1) 9:00; (2) 13:00; (3) 17:00; (4) 21:00; (5) 01:00; (6) 05:00; (7) PM.

Se realizaron 5 ensayos y se incluyó a la  $\beta$ - tubulina como control, para corroborar que la intensidad en las bandas observadas no fuera

resultado de exceso en el cargado de los carriles del gel de electroforesis.

Teniendo la certeza de la carga uniforme de las muestras por el procedimiento anterior, Se procedió a obtener los valores de catepsina H, a cada uno de los seis tiempos analizados durante las 24 horas del día mediante densitometría óptica de las bandas en los blots. Estos resultados se analizaron estadísticamente para obtener la determinación final de la expresión diurna de catepsina H en plexo coroideo de rata (Figura 8.14).

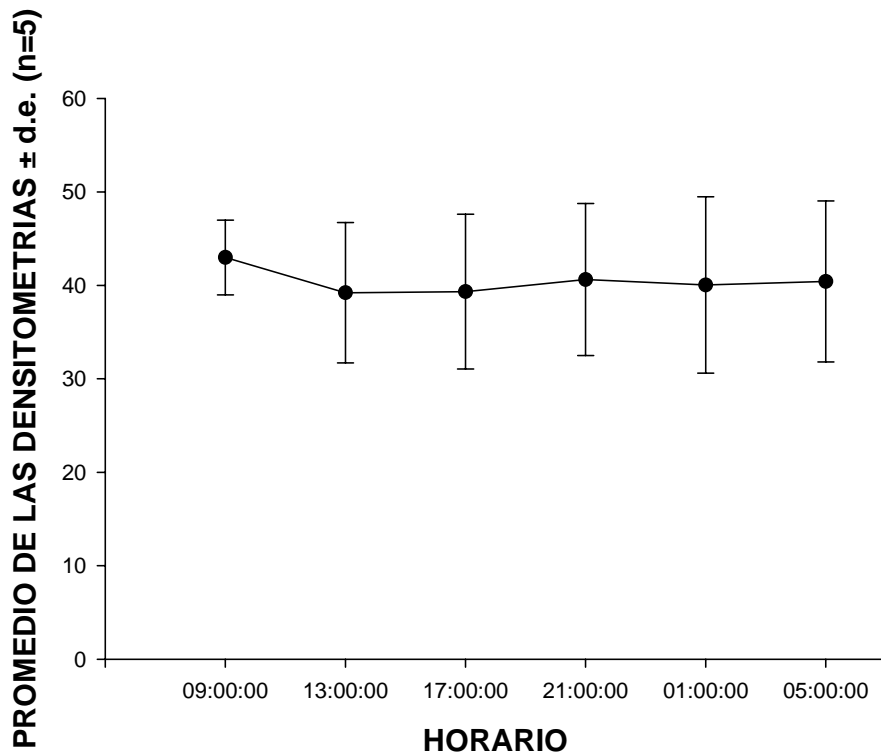


Figura 8.14 Gráfica que muestra la expresión diurna de la catepsina H en plexo coroideo de rata sin TCE.

Se estimó también la relación existente entre la expresión de catepsina H y de cistatina C, ambas determinadas mediante densitometría óptica durante el curso temporal de 24 horas para estimar modificaciones en el cociente derivado de estos (Figura 8.15).

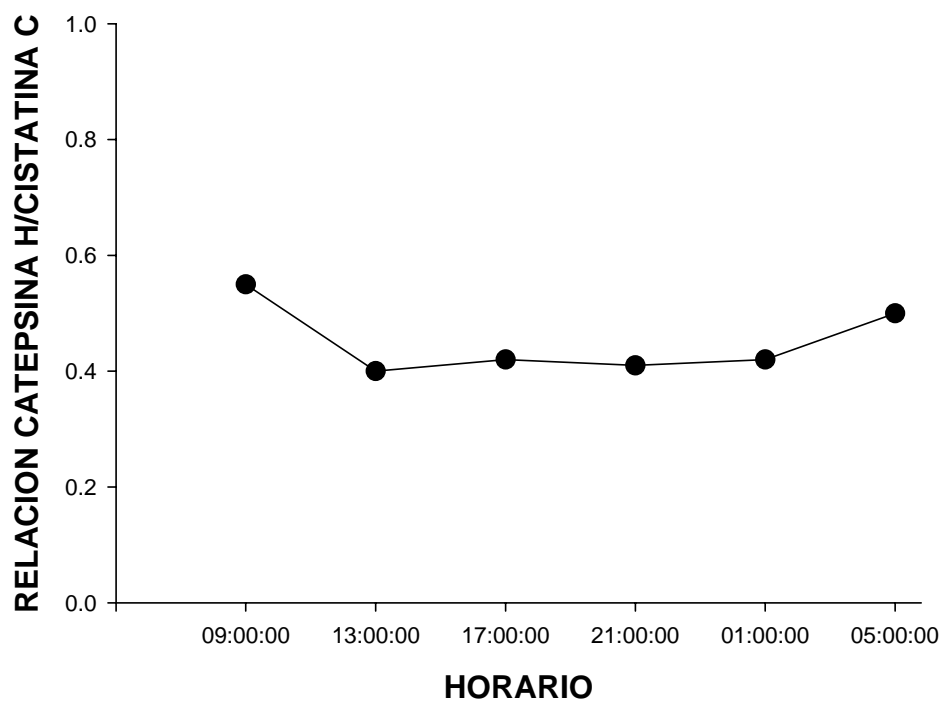


Figura 8.15 Relación en la expresión diaria de catepsina H /  
cistatina C en tejido cerebral de rata.

## 9. DISCUSIÓN.

La determinación de la catepsina B por el método de ELISA indirecto tipo sándwich, para este caso particular, resultó inadecuada, debido a que los anticuerpos utilizados tienen afinidad por otras moléculas además de la catepsina B. Esto provoca que la detección de estas moléculas, que se ve manifestada por una reacción colorida, no sea una señal específica para la molécula que se deseaba determinar, si no por la suma de todas las moléculas detectadas por el anticuerpo.

Esta técnica se ve limitada a la detección y cuantificación de moléculas específicas con anticuerpos que no dan reacción cruzada, lo que no ocurrió en nuestro caso.

Realizando los ensayos de western blot se demostró que los anticuerpos empleados reconocen más moléculas, además de las catepsinas hacia las que estaban dirigidos. En primera instancia se determinó que la catepsina B y la catepsina L no presentaban resultados favorables en su determinación en las muestras de tejidos cerebrales estudiadas. La inespecificidad de los anticuerpos quedó demostrada al obtener diversas bandas en los blots, además de no observar la banda correspondiente en el peso molecular para la catepsina B (28 kDa), tampoco pudimos observar la banda para la catepsina L (38 kDa). Se logró observar que los plexos coroideos del tercer ventrículo y del ventrículo lateral son los tejidos más adecuados para el estudio de la catepsina H. Se entiende que estos tienen como función primordial la producción de LCR y siendo que en el LCR se encuentran cantidades significativas de cistatina C (González-Rivera y cols., 2003), la cual es el inhibidor endógeno de las catepsinas, era de esperarse una cantidad significativa de catepsina H en estos tejidos.

Conforme a lo propuesto en la hipótesis nula, al realizar el análisis estadístico, se determinó que no existía un cambio de la expresión de catepsina H en la variación diurna en plexo coroideo de ratas en estado fisiológico.

En cuanto a la relación entre las cantidades de catepsina H con respecto a las cantidades de cistatina C, estimadas de manera indirecta por las densitometrías, en las mismas horas del día, para ambas moléculas, encontramos que no existe un cambio significativo en el cociente derivado de esto. Los datos anteriormente mencionados, sugieren que en condiciones fisiológicas la relación permanece constante a lo largo de las 24 horas del día.

Después de conocer la expresión de las moléculas de catepsina H y cistatina C y su relación proporcional en un estado fisiológico, se puede proponer estudiar la expresión de las moléculas frente a una condición patológica, por ejemplo, un evento de TCE. Esto pudiera informar si la variación en alguna de estas moléculas está directamente relacionada con el daño inducido a los tejidos cerebrales. Además se observaría si el cociente de la relación catepsinaH/cistatina C presenta un cambio que fuese provocado por el aumento de la expresión de cualquiera de las dos moléculas, determinando cuál se expresa más y a que tiempo posterior al evento de TCE.

## 10. CONCLUSIONES.

1.- La metodología más adecuada que nos permite la detección y estudio de la catepsina H en este caso particular, son conjuntamente las técnicas de electroforesis en poliacrilamida, y posterior western blot.

2.- Con la metodología montada la detección de la catepsina H se da en el plexo coroideo.

3.- No se observa la existencia de una variación en la expresión diurna de catepsina H en el plexo coroideo de la rata en condiciones fisiológicas.

4.- El cociente derivado de la estimación indirecta entre la relación de catepsina H / cistatina C, en ratas, en condiciones fisiológicas, permanece constante, por lo que no se observa una variación diurna en un periodo de 24 horas de dicho cociente.

## 11. GLOSARIO.

**Apoptosis:** Proceso de muerte celular programada en el cual la célula se contrae y la membrana superficial adquiere un aspecto característico, con formación de ampollas y vesículas rotas. El material genético del núcleo, se condensa y toda la célula se disgrega en fragmentos apoptóticos que finalmente son fagocitados por células vecinas.

**Catecolaminas:** hormonas derivadas de la tirosina que presentan un grupo catecol.

**Citocinas:** moléculas liberadas a partir de procesos agudos o crónicos.

**Corteza cerebral:** Es el tejido cerebral donde tiene lugar la percepción y el pensamiento lógico y donde se procesa la información necesaria para las funciones cerebrales más complejas como el pensamiento reflexivo y la memoria.

**Electroforesis:** Técnica que en general permite la separación de moléculas como consecuencia de su diferente movilidad en un campo eléctrico, donde la velocidad de movilidad depende del tamaño de la molécula.

**Endonucleasas:** Enzimas que rompen el ADN y el ARN en su parte media.

**Esclerosis Múltiple:** Enfermedad del sistema nervioso central en que la mielina se destruye de forma gradual, con el desarrollo de múltiples lesiones en el cerebro y la médula espinal.



Hipocampo: Parte del sistema límbico que está situado en la superficie media del lóbulo temporal. Su principal función es la consolidación de memoria y aprendizaje.

Isquemia: interrupción del suministro de sangre a una pequeña parte del cerebro.

Lipasas: enzima que acelera la degradación de lípidos.

Metástasis leptomeningeal: proceso neoplásico maligno o infeccioso localizada en la leptomeninges subsecuente a una lesión primaria.

Necrosis: muerte celular debida a un evento de isquemia.

Neuroprotector: sustancia que promueve la protección neuronal evitando daños progresivos.

Papaína: enzima proteolítica que se encuentra comúnmente en el látex de papaya.

Proteasa: Enzima que se encarga de la hidrólisis de proteínas.

Puente disulfuro: Enlace cruzado covalente entre dos cadenas polipeptídicas formado por un residuo de cistina.

Trombólisis: degradación de un trombo formado en el torrente sanguíneo.

Reperusión: Retorno de circulación normal después de una obstrucción parcial o total.

Western blot: es una técnica inmunoenzimática que se utiliza para la detección de moléculas específicas. Este método utiliza como soporte antigénico filtros de nitrocelulosa, donde las proteínas del antígeno han sido previamente transferidas, manteniendo total o parcialmente sus propiedades antigénicas.

## 12. ANEXOS.

### A. Preparación de soluciones.

#### Amortiguador de carbonatos 1 Litro

Pesar

1.59 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,

2.93 g de  $\text{NaHCO}_3$ , y

0.2 g de  $\text{NaN}_3$ .

Colocar estos reactivos en un matraz aforado de 1 litro y aforar con agua destilada.

Ajustar el pH a 9.6 con  $\text{NaOH}$  ó  $\text{HCl}$  según fuese el caso.

#### Amortiguador de fosfatos (PBS) 1 Litro

Pesar.

8.0 g de  $\text{NaCl}$

0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2.9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0.2 g de  $\text{KCl}$  y

0.2 g de  $\text{NaN}_3$

Colocar estos reactivos en un matraz aforado de 1 litro y aforar con agua destilada, ajustar el pH a 7.4 con  $\text{NaOH}$  ó  $\text{HCl}$  según fuese el caso

#### Amortiguador de fosfatos con detergente Tween-20 (PBS-Tween) 1 Litro

Pesar.

8.0 g de  $\text{NaCl}$

0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2.9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0.2 g de  $\text{KCl}$  y

0.2 g de  $\text{NaN}_3$

Colocar estos reactivos en un matraz aforado de 1 litro y aforar con agua destilada, ajustar el pH a 7.2 con  $\text{NaOH}$  ó  $\text{HCl}$  según fuese el caso

A esta solución adicionar 1 mL de Tween 20.

### **Amortiguador Tris-HCl.**

Pesar 1.576 g de Tris-HCl, colocar el reactivo en un matraz aforado de 1 litro y aforar con agua destilada, ajustar el pH a 9.5

### **Sustrato para fosfatasa alcalina.**

Para 10 mL

Pesar:

46.14 mg de 4-nitrofenilfosfato

1.051 g de dietalonamina y

50 mg de MgCl<sub>2</sub>

Colocar estos reactivos en un matraz aforado de 10 mL y aforar con amortiguador Tris-HCl ajustar el pH a 7.4 con NaOH ó HCl según fuese el caso.

### **Para preparar 4 geles de poliacrilamida para electroforesis.**

Fracción separadora del gel (12%). Reactivos Gibco BRL.

Reactivo	(mL)
Acrilamida 30% - bisacrilamida 8%	8.0
Tris 1.5M pH 8.8	5.0
Tris 0.5 pH 6.8	0.0
Agua	6.82
SDS 10%	0.4
Persulfato de amonio 10%	0.132
TEMED	0.012

Fracción concentradora del gel (4%). Reactivos Gibco BRL.

Reactivo	(mL)
Acrilamida 30% - bisacrilamida 8%	8.0
Tris 1.5M pH 8.8	5.0
Tris 0.5 pH 6.8	0.0
Agua	6.82
SDS 10%	0.4

Persulfato de amonio 10%	0.132
TEMED	0.012

### **Amortiguador de inhibición.**

Pesar  
 21.88 g de sacarosa  
 0.0952g de MgCl<sub>2</sub>

Colocar los reactivos en un matraz y adicionar  
 2 mL de Tris base 1M pH 6.8 y 0.8 mL de EDTA 0.5 M.

Aforar a 200 mL con agua destilada.

Por cada 10 mL de amortiguador adicionar: 1µL de aprotinina, 1µL de DTT y 12 µL de PMSF.

### **Solución de Lowry.**

- A) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro al 2% en NaOH 0.1M ..... 9.8 mL
- B) KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> – 4H<sub>2</sub>O al 2% en agua destilada.....0.1 mL
- c) CuSO<sub>4</sub> – 5 H<sub>2</sub>O al 1% en agua destilada.....0.1 mL

Mezclando las soluciones A, B y C se obtienen 10 mL de solución de Lowry.

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

Chapman H A, Riese R J, Shi G P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59: 63-88, 1997.

Cimerman N, Meško Brguljan P, Krašovec M, Šuškovič S, Kos J. Twenty-four hour variations of cystatin C and total cysteine proteinase inhibitory activity in sera from healthy subjects. *Clin Chim Acta* 291: 89-95, 2000.

Cimerman N, Meško-Brguljan P, Krašovec<sup>1</sup> M, Šuškovič S, Janko Kos J. Circadian rhythms of cysteine proteases and cystatins, potential tumor markers in normal sera. *Radiol Oncol* 36:180-2, 2002.

Clark B, Engvall E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspects. En Maggio E. T. editor, *Enzyme-Immunoassay*, Boca ratón Florida: CRC press, 1987:167- 179.

Deng A, Irizarry M C, Nitsch R M, Growdon J H, Rebeck G W. Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, 159: 1061, 2001.

González-Rivera R. Identificación y caracterización bioquímica de proteínas de secreción con expresión diferencial durante el sueño de movimientos oculares rápidos (sMOR). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, 2003.

González-Rivera R, Martínez-Vargas M, Murillo-Rodríguez E, Landa A, Prospero-García O, Navarro L. 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, 2003. November 8-12, New Orleans.

Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wieczerzak E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozack M, Jaskólski M, Grubb A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochemica Polonica* 48: 1-20, 2001.

INEGI. Estadísticas Demográficas Cuaderno No. 14, Edición 2002.

Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdamar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia-reperfusion. *Brain Res* 843:18-24, 1999.

Koninami E, Tsukahara T, Bando Y, Katunuma N. Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J Biochem* 98: 87-93, 1985.

Kaplan H.M., Brewer N.R., Blair W.H. Physiology. En : Foster H.L., Small D.S., Fox J. G. eds. *The Mouse in biomedical research. Normative Biology, Immunology and Husbandry*, volume III. San Diego Ca: Academic Press Inc., 1983: 248-292.

Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685, 1970.

Laterza O F, Price C P, Scott M G. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate. *Clin Chem* 48: 699-707, 2002.

Lee K S, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemic. *PNAS USA* 88: 7233, 1991.

Leker R R, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities *Brain Research Reviews* 39: 55–73, 2002.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Boil Chem* 193: 265 -275, 1951.

Markgraf C G, Velayo V N, Johnson M P, McCarty D R, Medi S, Koehl J R Chimielewski P A, Linnik M D. Six hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29: 152, 1998.

Marler J. Circadian variation in stroke onset. In: Deedwania PC (ed). *Circadian Rhythms of Cardiovascular Disorders*. Futura publishing Co Inc. Armonk NY. pp 163-172, 1993.

Nagai A, Murakawa Y, Terashima M, Shimode K, Umegae N, Takeuchi H, Kobayashi S. Cystatin C and cathepsin B in CFS from patients with inflammatory neurologic disease. *Neurol* 55:1828, 2000.

Nagai A, Terashima M, Harada T, Shimode K, Takeuchi H, Murakawa Y, Nagasaki M, Nakano A, Kobayashi S. Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in CFS from patients with leptomenigeal metastasis. *Clin Chim Acta* 329:53, 2003.

Navarro L, Martinez-Vargas M, Venado-Estrada A, Escobar de la Garma V, González-Rivera R, Muñoz-Sánchez S, Cisneros-Martínez M, Prospero-García O. The recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations. Society for Neurosciences 33rd Annual Meeting, 2003. November 8-12, New Orleans Abstratc 743.18.



Nestler E J, Hyman S E, Malenka R C. Seizures and Stroke. In: Molecular Neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience. McGraw-Hill, NY, pp 479-503, 2000.

Palm D E, Knuckey N W, Primiano M J, Spangenberg A G, Johanson C E., Cystatin C, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia. Brain Res 691: 1-8, 1995.

Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. Nature 413: 527-531, 2001.

Programa Nacional de Salud 2001-2006. Programa de Acción para Prevención y Rehabilitación de discapacidades. PreveR-Dis. Secretaria de Salud.

Rusak B Vertebrate behavioral rhythms. In Aschoff : Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4. Biological Rhythms. New York, Plenum, pp 182 – 214, 1980.

Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S. Markers of axonal injury in post mortem human brain. Acta Neuropathol (Berl). 88: 433-439, 1994.

Vinall P E, Kramer M S, Heinel L A, Rosenwasser R H. Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult. J Neurosurg 93: 82-89, 2000.

Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. Prog Neurobiol. 62:273-95, 2000.